ISSN 2186-7976

March 5, 2012
平成２４年３月５日発行

Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2012

大会講演要旨集

■２０１２年度（平成２４年度）大会［京都］■



社団法人日本農芸化学会

Japan Society for Bioscience,
Biotechnology, and Agrochemistry
http://www.jsbba.or.jp/

© Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

目次

授賞式、受賞者講演、受賞者----------3
一般講演番号の見方----------6
一般講演プログラム----------7
一般講演要旨----------94
大会シンポジウムプログラム----------2, 478
大会シンポジウム要旨----------2, 487
ランチョンシンポジウムプログラム----------2, 649
ランチョンシンポジウム要旨----------2, 650
ランチョンセミナープログラム----------2, 654
ランチョンセミナー広告要旨----------2, 656

日本農芸化学会
（2012 年度）学会賞等授賞式，受賞者講演，受賞者一覧

日　時：2012 年 3 月 22 日（木）午後 1 時から午後 6 時
会　場：ウェスティン都ホテル京都「山城の間」（京都市東山区三条けあげ）
次　第：

（13:00）　2012 年度学会賞等授賞式
　　1　授賞選考委員長報告
　　2　日本農芸化学会賞等授与
（13:25）　2011 年 BBB 論文賞及び Most-Cited Paper Award 表彰式
　　1　英文誌編集委員長報告
　　2　BBB 論文賞表彰
　　3　Most-Cited Paper Award 表彰
（13:40）　第 9 回農芸化学研究企画賞表彰式
　　1　産学官学術交流委員長報告
　　2　農芸化学研究企画賞表彰
（13:45）　会長祝辞
（13:55）　＊＊＊＊＊＊　休 憩 5 分 間　＊＊＊＊＊＊
（14:00）　日本農芸化学会賞受賞者講演（2 件，各 25 分）
（14:50）　日本農芸化学会功績賞受賞者講演（2 件，各 25 分）
（15:40）　農芸化学技術賞受賞者講演（2 件，各 15 分）
（16:10）　＊＊＊＊＊＊　休憩 10 分間　＊＊＊＊＊＊
（16:20）　農芸化学奨励賞受賞者講演（10 件，各 10 分）
（18:00）　終了予定
（18:30～21:00）　懇親会　ウェスティン都ホテル京都「瑞穂の間」

受賞者：

【日本農芸化学会賞】（2 件，50 音順）

伊藤　幸成　（理化学研究所基幹研究所）
　　「糖タンパク質の機能解析をめざす複合科学的研究」
河野　憲二　（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科）
　　「蛋白質の合成・成熟・品質管理を基盤とした分子生物学・細胞工学的研究」

【日本農芸化学会功績賞】（2 件，50 音順）

山根　久和　（東京大学生物生産工学研究センター）
　　「植物に含まれる生理活性物質の化学と生理機能に関する研究」
依田　幸司　（東京大学大学院農学生命科学研究科）
　　「有用微生物の細胞機能に関する分子遺伝生化学的研究」

【農芸化学技術賞】（2 件，順不同）

善本 裕之[1]・吉田 聡[2]・金井 圭子[1]・小林 統[1]　（[1]キリンビール株式会社・[2]キリンホールディングス株式会社）
　　「品質工程改善のためのビール酵母の総合的基盤解析技術の開発」
杉山 圭吉[1]・村越 倫明[1]・小野 知二[1]・星野 達雄[2]　（[1]ライオン株式会社・[2]株式会社 NRL ファーマ）
　　「腸溶加工技術に着目したラクトフェリン含有機能性食品の開発」

【農芸化学奨励賞】（10 件，50 音順）

安藤　弘宗　（岐阜大学応用生物科学部）
　　「構造が複雑なシアル酸含有糖鎖および糖脂質の合成化学的研究」

石丸　喜朗（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「酸味受容体の発見とその味覚伝達機構の解明」
倉持　幸司（京都府立大学大学院生命環境科学研究科）
「生物活性の探索と解明を指向した有用化合物の合成研究と化学生物学的研究」
齊藤安貴子（大阪電気通信大学工学部）
「天然物合成を基軸とした小分子プローブ創成と化学生物学研究」
薩　　秀夫（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「腸管における食品因子の吸収及び機能性・安全性に関する細胞生物学的研究」
佐藤　　努（新潟大学大学院自然科学研究科）
「セスクアテルペン（C_{35} テルペン）の探索と生合成に関する研究」
善藤　威史（九州大学大学院農学研究院）
「新奇乳酸菌バクテリオシンの探索とその構造と機能に関する研究」
仲川　清隆（東北大学大学院農学研究科）
「食品と生体の生理活性成分のスピアヘッド分析法の開発と応用」
丸山　潤一（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「“多細胞生物”麹菌の細胞間連絡を制御するオルガネラ Woronin body に関する研究」
南　　博道（石川県立大学生物資源工学研究所）
「微生物発酵法による植物アルカロイド生産とその応用」

【2011 年（Vol.75）B.B.B. 論文賞（掲載順）】

pp.128～135　Yoshinori Sugai, Sho Miyazaki, Shinichiro Mukai, Isamu Yumoto, Masahiro Natsume, and Hiroshi Kawaide
Enzymatic Total Synthesis of Gibberellin A_4 from Acetate

pp.396～400　Jun Nojima, Rika Ishii-katsuno, Eugene Futai, Noboru Sasagawa, Yuichiro Watanabe, Taiji Yoshida, and Shoichi Ishiura
Production of Anti-Amyloid β Antibodies in Mice Fed Rice Expressing Amyloid β

pp.748～751　Tetsuro Matsunaga, Ayumi Nakayuki, Yuki Saito, Akio Kato, Yuichiro Noiri, Shigeyuki Ebisu, and Hiroyuki Azakami
Genomic Recombination through Plasmid-Encoded Recombinase Enhances Hemolytic Activity and Adherence to Epithelial Cells in the Periodontopathogenic Bacterium *Eikenella corrodens*

pp.1275～1282　Shu Kaneko, Kenji Kumazawa, and Osamu Nishimura
Isolation and Identification of the Umami Enhancing Compounds in Japanese Soy Sauce

pp.1325～1334　Kazutake Hirooka and Yasutaro Fujita
Identification of Aromatic Residues Critical to the DNA Binding and Ligand Response of the *Bacillus subtilis* QdoR (YxaF) Repressor Antagonized by Flavonoids

pp.1588～1593　Takumi Chinen, Yu Ota, Yoko Nagumo, Hiroshi Masumoto, and Takeo Usui
Construction of Multidrug-Sensitive Yeast with High Sporulation Efficiency

pp.1702～1707　Tsutomu Hashidume, Takashi Sasaki, Jun Inoue, and Ryuichiro Sato
Consumption of Soy Protein Isolate Reduces Hepatic SREBP-1c and Lipogenic Gene Expression in Wild-Type Mice, but Not in FXR-Deficient Mice

pp.1813～1817　Ryuya Fujii, Atsushi Minami, Tae Tsukagoshi, Natsuko Sato, Takehiko Sahara, Satoru Ohgiya, Katsuya Gomi, and Hideaki Oikawa
Total Biosynthesis of Diterpene Aphidicolin, a Specific Inhibitor of DNA Polymerase *α*: Heterologous Expression of Four Biosynthetic Genes in *Aspergillus oryzae*

【Most-Cited Paper Award】 被引用回数 15 回
Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 73, pp.1175～1179
Masashi Kiyohara, Asaki Tachizawa, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka, Hisashi Ashida, and Kenji Yamamoto
Prebiotic Effect of Lacto-*N*-biose I on Bifidobacterial Growth

【第 9 回農芸化学研究企画賞】
重点研究領域①「天然物の医薬・農薬」
増田　誠司（京都大学大学院生命科学研究科）
「mRNA 成熟阻害活性を指標とする抗ガン化合物の探索と産業利用」

重点研究領域②「機能性食品素材および食品」
中村　浩蔵（信州大学農学部）
「ソバを原料とする降圧食品の開発と降圧メカニズムの解明」

重点研究領域③「グリーンバイオテクノロジー」
（1）バイオマス資源の生産・供給・利用（有用物質生産プロセス等）に関わるテクノロジー
（2）省資源・省エネルギープロセスに関わるバイオテクノロジー
（3）環境浄化・資源循環に関わるバイオテクノロジー
田丸　浩（三重大学大学院生物資源学研究科）
「セルロソーム生産菌ゲノム情報を活用した CBP 型バイオ燃料生産微生物の創製」

2012 京都大会

一般講演番号の見方

○ 講演番号の

最初の１桁の数字は講演発表日

２ ⟶ ３月２３日（金）
３ ⟶ ３月２４日（土）
４ ⟶ ３月２５日（日）

次のアルファベットは建物、次の２桁の数字は会場

Ａ　　Ａ校舎
Ｊ　　Ｊ校舎
Ｂ　　Ｂ校舎
Ｃ　　Ｃ校舎

（例：Ｊ１３　→　Ｊ校舎１３会場、Ｃ３４　→　Ｃ校舎３４会場）

次の桁の小文字アルファベットは

ａ　は　午前の部
ｐ　は　午後の部

次の数字は、その会場での講演の順番

たとえば、**２Ａ０９ｐ０６**は、
３月２３日（金）、Ａ校舎０９会場、午後の部、６番目　の講演です。

○ 講演開始の時間は、次の通りです。

ａ［ａｍ］（午前）

１．9：00	２．9：11	３．9：22	４．9：33
５．9：44	６．10：05	７．10：16	８．10：27
９．10：38	１０．10：49	１１．11：10	１２．11：21
１３．11：32	１４．11：43	１５．11：54	

（9:55-10:05, 11:00-11:10：入れ替え、チェック）

ｐ［ｐｍ］（午後）

１．13：49（特別な場合を除いてこの枠は使わない）			
２．14：00	３．14：11	４．14：22	５．14：33
６．14：44	７．15：05	８．15：16	９．15：27
１０．15：38	１１．15：49	１２．16：10	１３．16: 21
１４．16：32	１５．16：43	１６．16：54	１７．17：15
１８．17：26	１９．17：37	２０．17：48	
２１．17：59（特別な場合を除いてこの枠は使わない）			

（14:55-15:05, 16:00-16:10, 17:05-17:15：入れ替え、チェック）

一般講演発表プログラム

1. 講演時間は 1 題につき，11 分（発表 8 分，討論 2 分 30 秒，交代時間 30 秒）.
2. °は講演者（登壇者）を示す.
3. 座長は，29〜31 ページの座長一覧をご覧ください.
4. 講演番号 1 文字目（数字）は講演日（2: 3 月 23 日，3: 3 月 24 日，4: 3 月 25 日），2〜4 文字目は講演会場（C01〜C34），5 文字目（英字小文字 1 字）の a は午前，p は午後，6〜7 文字目（数字 2 桁）は講演順番（01〜21）.（例）「2A07p06」は，3 月 23 日，A07 会場，午後の部，6 番目の講演となります.

||||||||||||||||||| 第 2 日（3 月 23 日）|||||||||||||||||||

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

C01 会場　午後の部（14:00〜17:59）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C01p02　Pseudomonas putida 由来(R)-ヒドラターゼの基質認識アミノ酸の同定と基質特異性改変
14:00 °石塚洸也，佐藤　俊[1]，柘植丈治（東工大院・総理工，[1]産総研）

2C01p03　グリセロール濃度がポリヒドロキシアルカン酸生合成に与える影響
14:11 °神　貴志，柘植丈治（東工大院・総理工）

2C01p04　ロイシンを前駆体とした側鎖分岐型ポリエステルの生合成
14:22 °雜賀あずさ，渡辺世利子，阿部英喜[1]，柘植丈治（東工大院・総理工，[1]理研）

2C01p05　*Corynebacterium glutamicum* の細胞表層提示技術を用いたデンプンからのポリヒドロキシブタン酸（PHB）の直接生産
14:33 °津田春奈，宋　育陽，松本謙一郎，大井俊彦，近藤昭彦[1]，田口精一（北大院・工・生機高，[1]神戸大院・工・応化）

2C01p06　アセトアセチル CoA レダクターゼ高活性変異体の解析とそれを用いた *Corynebacterium glutamicum* による PHB 生産の増強
14:44 °渡辺剛志，宋　育陽，松本謙一郎，大井俊彦，田口精一（北大院・工・生機工）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C01p07　組換え大腸菌による(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸の生産
15:05 °大井俊彦，松本謙一郎，大慶岳洋，本間以祝，渡辺剛志，田口精一（北大院・工・生機高）

2C01p08　進化工学による新規乳酸重合酵素の探索
15:16 °越智杏奈，大場貴史，坂井浩平，松本謙一郎，柘植丈治[1]，田口精一（北大院・工・生機高，[1]東工大・総理工）

2C01p09　Biosynthesis of novel lactate(LA)-based polyester incorporating unsaturated monomer unit by using recombinant *Escherichia coli*.
15:27 °Jian Sun,　Fumi Shozui,　Ken'ichiro Matsumoto, Seiichi Taguchi（Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.）

2C01p10　組換え大腸菌による乳酸およびグリコール酸ベース新奇バイオプラスチックの生合成と物性解析
15:38 °斯波哲史，石山絢子，松本謙一郎，田口精一（北大院・工・生機高）

2C01p11　*Gluconobacter frateurii* によるグリセリン酸生産におけるメタノールの影響
15:49 °佐藤　俊，羽部　浩，北本　大，榊　啓二（産総研）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C01p12　Halomonas sp. KM-1 による微好気条件における 3-ヒドロキシ酪酸の分泌生産
16:10 °河田悦和，石　蓮花，川崎一則，茂里　康（産技総研健康工学）

2C01p13　遺伝子組換えメチロトローフによるアルコールからのポリヒドロキシアルカン酸生合成
16:21 °折田和泉，Nur budianto，中村　聡，福居俊昭（東工大院生命理工・生物プロセス）

2C01p14　RNA シーケンシングによるポリエステル生産菌 *Ralstonia eutropha* のトランスクリプトーム解析
16:32 °清水理恵，折田和泉，鈴木　穣[1]，中村　聡，福居俊昭（東工大院生命理工・生物プロセス，[1]東大院新領域・先端生命科）

2C01p15　代謝工学のための大腸菌染色体 DNA への遺伝子多重導入法
16:43 °駒　大輔，山中勇人，森芳邦彦，大本貴士，酒井清文（阪市工研）

2C01p16　シキミ酸経路の拡張による芳香族化合物の生産
16:54 °酒井清文，駒　大輔，山中勇人，森芳邦彦，大本貴士（阪市工研）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2C01p17　遺伝子組換えコリネ型細菌によるフェノール生産 I: フェノール生合成経路の代謝設計
17:15 °須田雅子[1,2]，山本省吾[1,2]，郡司　渉[1,2]，茂木康浩[1,2]，平賀和三[1,2]，乾　将行[1,2]，湯川英明[1,2]（[1]GP 技術研究組合，[2]RITE）

2C01p18　遺伝子組換えコリネ型細菌によるフェノール生産 II. 還元条件下におけるフェノール生成試験
17:26 °山本省吾[1,2]，須田雅子[1,2]，渡辺恵郎[1,2]，茂木康浩[1,2]，平賀和三[1,2]，乾　将行[1,2]，湯川英明[1,2]（[1]GP 技術研究組合，[2]RITE）

2C01p19　*Saccharomyces cerevisiae* におけるイソブタノール生産性向上のための Ehrlich 経路強化と炭素フラックス改変戦略
17:37 °手塚裕紀，近藤貴志[1]，石井　純[1]，松田史生[1]，近藤昭彦（神戸大院・工，[1]神戸大・研究環）

2C01p20　シリングアルデヒドから水溶性の黒色色素を生産する微生物 *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1
17:48 °滝口　肇，濱口　俊，松藤　寛[1]，岩淵範之，砂入道夫（日大・生資科・応生科，[1]日大・生資科・食生）

C02 会場　午後の部（14:00〜17:59）

環境—資源変換，資源再生利用，環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C02p02　海藻多糖ウルバンからの新規ソフトマテリアル
14:00 °菅野憲一，渡部祐介，幸村慎太郎（近大・産業理工）

2C02p03　レモン果皮を用いたエタノール製造のための酵素糖化に及ぼす反応条件の影響
14:11 °高橋紀博，渡邉義之，山本泰平[1]，野村正人（近畿大院・システム工，[1]中国醸造）

2C02p04　組換え *Ralstonia eutropha* を用いた，独立栄養条件下での D-乳酸生産
14:22 °丸山高廣，半澤　敏，佐藤由也[1]，石井正治[1]，五十嵐泰夫[1]（東ソー株式会社，[1]東京大・農）

2C02p05　セルロースアセテートのバイオリサイクルを目指した好熱菌由来エステラーゼの探索
14:33 °森芳邦彦，駒　大輔，山中勇人，大本貴士，酒井清文（阪市工研）

2C02p06　Inhibition of Ethanol Fermentation from Cassava Pulp by a Thermotolerant Yeast, Kluyveromyces-marxianus Y2 strain
14:44 °Prapassorn Rugthaworn[1,2],　Yoshinori Murata[1],

Waraporn Apiwatanapiwat[2], Pilanee Vaithanomsat[2], Akihiko Kosugi[1], Takamitsu Arai[1], Akiko Hirooka[1], Yutaka Mori[1]（[1]JIRCAS, [2]Kasetsart University）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C02p07　幌延地域における深部地下環境由来の微生物集積培養物によるフミン酸の分解

15:05 ◦上野晃生，清水　了，玉村修司，遠藤　亮，高田迪彦，大味　泰，長沼　毅[1]（幌延地圏環境研究所，[1]広島大院･生物圏科学）

2C02p08　*α*-キチンのメカノケミカル粉砕と酵素分解による *N*-アセチルグルコサミンの製造

15:16 ◦戸谷一英，中川裕子，長田光正，貝原巳樹雄，二階堂満，粉川　潤[1]，猪股尚治[1]，増井彩乃[2]，山村昭博[2]，川口光朗[2]，又平芳春[2]（一関高専･物化工，[1]アーステクニカ，[2]焼津水産化学工業）

2C02p09　イカ軟骨の直接酵素分解による *N*-アセチルグルコサミンの製造

15:27 ◦樋口雄大，三石秋愛，古関健一，中川裕子，長田光正，二階堂満，石村惣一[1]，田代勝男[1]，戸谷一英（一関高専・物化工，[1]丸辰カマスイ）

2C02p10　高温高圧水を利用した N-アセチルグルコサミン誘導体の合成

15:38 ◦長田光正，吉田康平，戸谷一英，尾形　慎[1]，碓氷泰市[1]（一関高専・物化工，[1]静岡大農・応生化）

2C02p11　有機質肥料活用型養液栽培における根部病害抑止効果の保持条件の解明

15:49 ◦藤原和樹，青山ちひろ[1]，小川　順[2]，加藤康夫[3]，宮本憲二[4]，高野雅夫[1]，寺見文宏，篠原　信（農研機構，[1]名大院・環境，[2]京大院農・応用生命，[3]富山県大・生物工，[4]慶大・理工）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C02p12　有機質肥料活用型養液栽培(有機養液栽培)によるトマトの実用規模栽培とその解析

16:10 ◦青山ちひろ，藤原和樹[1]，高野雅夫，篠原　信[1]（名大院･環境，[1]農研機構）

2C02p13　硝化特性を指標とした有機養液栽培に有用な微生物群の探索

16:21 ◦小川　順[1]，安藤晃規[2,1]，犬飼龍矢[1]，池本成美[3]，島　純[3]，宮本憲二[4]，加藤康夫[5]，篠原　信[6]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学，[3]京大・微生物科学，[4]慶大・理工，[5]富山県大・生物工，[6]農研機構）

2C02p14　有機養液栽培に有用な高い硝化活性を示す微生物群の解析

16:32 安藤晃規[1,2]，◦犬飼龍矢[2]，池本成美[3]，島　純[3]，宮本憲二[4]，加藤康夫[5]，篠原　信[6]，小川　順[2]（[1]京大・生理化学，[2]京大院農・応用生命，[3]京大・微生物科学，[4]慶大・理工，[5]富山県大・生物工，[6]農研機構）

2C02p15　ウキクサから単離した微生物の同定と機能解析

16:43 ◦中尾英二[1]，安藤晃規[1,2]，島　純[3]，藤田朋宏[4]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学，[3]京大・微生物科学，[4]ネオ・モルガン研究所）

2C02p16　安定同位体標識技術を用いた複合微生物系による植物バイオマスの分解・代謝過程の比較解析

16:54 ◦小倉立己[1]，伊達康博[1,2]，坪井裕理[3]，菊地　淳[1,2,4,5]（[1]横市大院生命，[2]理研 PSC，[3]理研 ASI，[4]名大院生命農，[5]理研 BMEP）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2C02p17　琵琶湖深湖底からのセレンオキサニオン還元性微生物の探索

17:15 ◦阪口利文，平岡達也，田邊伸康，有馬寿英，宮下英明[1]（県立広島大・環境，[1]京大院・地球環境学堂）

2C02p18　セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I を用いたセレン酸および亜セレン酸還元の最適化

17:26 ◦成田尚宣，鏡つばさ[1]，黒田真史[1]，惣田　訓[1]，池　道彦[1]，山下光雄（芝工大・SIT 総研，[1]阪大院・工）

2C02p19　*Rhodococcus erythropolis* PR4 株のアルカン相への転移における *groES-EL1* 遺伝子の影響

17:37 ◦瀧原速仁，松浦千明，荻原　淳[1]，岩淵範之，砂入道夫（日大生資科・応生科，[1]日大生資科・生化科）

2C02p20　*Rhodococcus rhodochrous* の培地 / アルカン二相培養系における細胞の局在性への *groEL2* 遺伝子の影響

17:48 ◦松浦千明，瀧原速仁，岩淵範之，砂入道夫（日大･生資科）

B03 会場　午前の部（11:10〜11:43）

環境―バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー―

a11〜a13 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2B03a11　白色腐朽菌 *Trametes versicolor* による C5･C6 糖の発酵

11:10 ◦内井敦史，綱島彩子，簗瀬英司，岡本賢治（鳥取大工・生応工）

2B03a12　乳糖発酵性担子菌による廃棄乳やホエーからのエタノール生産

11:21 ◦金涌龍一，中川紗季，簗瀬英司，岡本賢治（鳥取大工・生応工）

2B03a13　デンプン発酵性担子菌による生ごみからの直接的エタノール生産

11:32 ◦岡本賢治，米田元輝，簗瀬英司（鳥取大工・生応工）

B03 会場　午後の部（14:00〜17:59）

環境―バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2B03p02　リグニン分解酵素発現におけるカルモデュリンの働き

14:00 ◦阪本鷹行，矢尾祐樹，上田美波，本田与一[1]，亀下　勇[2]，鈴木一実，入江俊一（滋賀県大・環，[1]京大・生存研，[2]香大・農）

2B03p03　担子菌ラッカーゼ発現によるイネ稈の細胞壁組成変化

14:11 高橋麻紀，澤口知歩，渡辺藍子，濁川　睦[1]，古川佳世子[1]，飯村洋介[2]，梶田真也[3]，小口太一[4]，伊藤幸博[1]，◦園木和典（弘前大農学生命・分子生命，[1]東北大院農・環境，[2]産総研つくばセ，[3]東農工大院 BASE，[4]筑波大 GRC）

2B03p04　多次元 NMR 法による ^{13}C 標識化リグノセルロースの解析戦略

14:22 ◦小松功典[1]，奥下慶子[1]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横市大院生命ナノ，[2]理研 PSC，[3]理研 BMEP，[4]名大院生命農学）

2B03p05　Dissolution of ball-milled woody biomass in ionic liquid systems at room temperature: HSQC NMR analysis

14:33 ◦QU Chen，KISHIMOTO Takao，HAMADA Masahiro，NAKAJIMA Noriyuki（Toyama Prefectural University）

2B03p06　溶液 NMR 法による木質バイオマスの定量と精密構造解析

14:44 ◦西村裕志[1,2,3]，岡村英保[1,3]，小澤　佑[1]，渡辺隆司[4,3]，片平正人[1,3]（[1]京大・エネルギー理工学研究所，[2]JSPS，[3]CREST，[4]京大・生存研）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2B03p07　木材腐朽菌による木質バイオマス分解過程の NMR 法を用いた解析

15:05 ◦小澤　佑[1]，西村裕志[1,2,3]，片平正人[1,2]，渡辺隆司[2,4]（[1]京大･エネルギー理工学研究所，[2]CREST，[3]JSPS，[4]京大・生存研）

2B03p08　リグノセルロースバイオリファイナリーのための単離リグニンの FT-ICR MS

15:16 ◦吉岡康一[1]，渡辺隆司[1,2]（[1]京大・生存研，[2]CREST）

2B03p09　ヒノキ高効率酵素糖化の為のアルコールオルガノソルブ処理法の検討

15:27 ◦秀野晃大，川嶋文人[1]，遠藤貴士[2]，本田克久[1]，森田昌敏[1]（愛媛大・上級研究員セ，[1]愛媛大・農，[2]産総研・バイオマス研セ）

2B03p10　植物内生菌由来酵素を利用したアルカリ前処理稲わらの効率的糖化

15:38 ◦岩井崇郎，伊藤由美，工藤綾子，田中みち子，阿部　歩，曾根輝雄，　城間　力[1]，　徳安　健[1]，　矢部希見子[1]，　長島　實[1]，浅野行蔵（北大院農・応生科，[1]食総研）

2B03p11　濾紙を基質とした中高圧条件下でのセルラーゼ反応について

15:49 ◦藤田智之，栗原　聖[1]，濱田龍馬[1]，来山哲二[2]，采女信二郎[2]（信州大院・農，[1]信州大・農，[2]ポエック）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2B03p12　ルーメン細菌 Fibrobacter succinogenes S85 株由来アセチルキシランエステラーゼ FSUAxe6B の生化学的解析

16:10 ◦吉田昭介，　マッキーロデリック[1]，　カーンアイザック[1]（慶応大理工，[1]イリノイ大）

2B03p13　ヘミセルラーゼ高生産を目的とした *Humicola insolens* ATCC26908 株の培養条件の検討

16:21 ◦西田奈緒子，松本　和[1]，小山善幸[2]，荻原　淳[1]，加藤　順[2]，春見隆文[1]（日大生資科・農化，[1]日大院生資研究科・生資利用，[2]日大生資科・生命化）

2B03p14　麹菌由来 *Aspergillus oryzae* 由来ヘミセルラーゼによるソフトバイオマスの糖化促進効果の検討

16:32 ◦村山浩一，久田博元，堤　浩子，秦　洋二，近藤昭彦[1]，植田充美[2]（月桂冠・総研，[1]神戸大院・工・応化，[2]京大院・農・応生）

2B03p15　海洋性超好熱菌 *Thermotoga neapolitana* 由来耐熱性β-1,3- キシラナーゼの構造安定性

16:43 ◦岡崎文美，仲島菜々実[1]，荻野千秋[1]，近藤昭彦[1]（神戸大・自，[1]神戸大院・工）

2B03p16　海洋性超好熱菌 *Thermotoga neapolitana* 由来 β-1,3- キシラナーゼの耐熱性を導く要因の解析

16:54 ◦山崎清志，岡崎文美[1]，荻野千秋[2]，近藤昭彦[2]，三上文三[3]，樽林陽一，鶴田宏樹（神戸大・応構，[1]神戸大・自，[2]神戸大院・工，[3]京都大院・農）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2B03p17　Screening and Isolation of Thermophilic Cellulolytic Anaerobic Bacteria and Microbial Community Analysis by DGGE Method in Vietnam Natural Environment

17:15 Ngo Duc Duy，Dao Thi Thu Hien，Tran Thi Thu Thao，Chihaya Yamada[1]，Makoto Atou[1]，Kouji Yoshida[2]，Yasuo Igarashi[1]，◦Hoang Quoc Khanh（ITB-VAST，[1]Grad. Sch. of Agri. Life Sci. The Univ. of Tokyo，[2]IIS The Univ. of Tokyo）

2B03p18　ナノ材料を用いたセルロース分解菌の選択的スクリーニング

17:26 ◦小出　修，津留美紀子，内村康祐，出口　茂（海洋研究開発機構）

2B03p19　深海起源のセルロース分解菌が生産するセルラーゼの機能と特異性の解明

17:37 ◦内村康祐，津留美紀子，小林　徹，小出　修，出口　茂（海洋研究開発機構）

2B03p20　新規に分離した糸状菌の分泌する稲わら特異的セルラーゼ

17:48 ◦青山晃久，松浦　明，堤内　要，倉根隆一郎，永井和夫（中部大・応生）

A04 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機―天然物 – 単離構造決定 – 植物―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2A04a01　ゴマリグナン sesamolin，samin の異性化に関する研究

9:00 ◦山本諭志[1]，松本恵実[1]，渡邉紀之[2]，舟橋　智[2]，柳瀬笑子[2]，中塚進一[1,2]（[1]長良サイエンス，[2]岐阜大・応生）

2A04a02　細辛リグナン Sesamin の立体異性体に関する研究

9:11 ◦松本恵実, 牧岡富広, 山本諭志, 中塚進一（長良サイエンス）

2A04a03　円石藻 *Pleurochrysis carterae* のココリスに含まれる基質タンパク質に関する研究

9:22 ◦遠藤博寿，笠島大貴，藤原祥子[1]，都筑幹夫[1]，猿渡和子[2]，小暮敏博[2]，長澤寛道（東大院・農生化・応生化，[1]東薬大・生科，[2]東大院・理）

2A04a04　ソロモン諸島産プロポリスに関する化学的研究

9:33 ◦乾沙王里，島村裕子，増田修一，白藤謙一[1]，Reuben T Moli[2]，熊澤茂則（静岡県大　食品栄養，[1]特定非営利活動法人 APSD，[2]NPO APSD SOLOMON）

2A04a05　ベチバー，スターアニス及びミルラの抽出物の性質

9:44 ◦緑川直弥，　長谷川登志夫，　清宮はるな[1]，　松永　祐[1]，山田英夫[2]（埼玉大院・理工，[1]埼玉大・理，[2]山田松香木店）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2A04a06　黄色タマネギ乾燥外皮由来の新規キサンチリウム色素の単離および構造決定

10:05 ◦坂本祐実[1,2]，伊藤裕才[1]，佐野　明[2]，山崎　壮[1]，穐山　浩[1]（[1]国立医薬品食品衛生研，[2]東理大院・薬）

2A04a07　黄色タマネギ乾燥外皮の黄色色素の形成における酸化過程の必須性

10:16 ◦伊藤裕才[1]，坂本祐実[1,2]，山崎　壮[1]，穐山　浩[1]（[1]国立医薬品食品衛生研，[2]東理大院・薬）

2A04a08　根寄生雑草 *Striga gesnerioides* 種子発芽誘導物質 alectrol の単離と構造決定

10:27 ◦野村早紀[1]，上野琴巳[1]，村中　聡[2]，水谷正治[1]，滝川浩郷[1,3]，杉本幸裕[1,3]（[1]神戸大院・農，[2]国際熱帯農業研究所，[3]JST/JICA SATREPS）

2A04a09　エンバクが生産する新規ストリゴラクトンの探索

10:38 ◦謝　肖男，米山香織，高根沢恵子，野村卓史，来生貴也，金　賢一，Pichit Khetkam，内田健一[1]，横田孝雄[1]，野村崇人，米山弘一（宇都宮大・雑草センター，[1]帝京大・バイオ）

2A04a10　植物寄生性線虫の生産する CLE ペプチド

10:49 ◦開出智美，永井あゆみ，得字圭彦[1]，近藤竜彦，坂神洋次（名大院生命農・応用分子生命科，[1]帯広畜産大学）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2A04a11　タバココナジラミに抵抗性を有するトマト近縁野生種の探索とその要因の解明

11:10 ◦北村登史雄, 武田光能, 中島修平[1]（農研機構　野菜茶研，[1]岡山大院　自科）

2A04a12　ハッサクの傷害葉に含まれる二次代謝物質の単離と同定

11:21 ◦浅井智紀，松川哲也，石原　亨[1]，梶山慎一郎（近畿大院生物理工・生物工，[1]鳥取大農・生資環）

2A04a13　野菜ジュースからの植物疫病菌の無性生殖促進物質

11:32 ◦岩井里佳, Sudhakar V. S. Govindam[1], 小鹿　一[1]（名大・農，[1]名大院・生命農）

2A04a14　Isolation of Antitrypanosomal Compounds from Myanmar Medicinal Plant

11:43 ◦NYUNT KHINESWE，Ahmed Elkhateeb，Yusuke Tosa[1]，Kensuke Nabeta，Ken Katakura，Hideyuki Matsuura（Hokkaido Univ.，[1]Hokkaido Univ.）

2A04a15　植物由来 MEP 経路阻害物質の単離と構造解析

11:54 ◦北原一治，高橋俊哉[1]，越野広雪[1]，佐々木康幸，矢嶋俊介（東農大応生科・バイオ，[1]理研　基幹研）

A04 会場　午後の部（13:49〜18:10）

有機―天然物 – 単離構造決定 – 微生物―

p01〜p06 発表者の接続時間④ 13:39〜13:49

2A04p01　*Discosia* sp. が生産する Photinide A,B の構造訂正と新規誘導体の単離

13:49 ○安村良子，金丸沙樹，田中和明，根平達夫[1]，橋本　勝（弘前大・農学生命，[1]広島大院・総合科学）

2A04p02　Plipastatin と Fengycin の構造混乱終結(2)

14:00 ○橋本　勝，本間美保，田中和明，紺野勝弘[1]，柘植謙爾[2]，奥野智旦[3]（弘前大農生，[1]富山大・和漢研，[2]慶應大学生命科学研究所，[3]秋田看福大）

2A04p03　Aflatoxin production inhibitory activity of a bacterium

14:11 ○Usuma Jermnak，Ryo Kawai，Hiromichi Nagasawa，Shohei Sakuda（Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo）

2A04p04　糸状菌が生産するアフラトキシン生合成阻害物質

14:22 ○山崎寧之，石原　亨[1]，矢部希見子[2]，中島廣光[1]（鳥取大院・農，[1]鳥取大・農，[2]食総研）

2A04p05　コムラサキシメジ由来の植物成長調節物質による植物成長の分子機構の解明

14:33 ○関口周兵[1]，崔　宰熏[2]，道羅英夫[3]，本橋令子[4]，平井浩文[1]，河岸洋和[1,2]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・創造，[3]静大・遺伝子，[4]静大農・共生バイオ）

2A04p06　コムラサキシメジ由来の植物成長調節物質とそれらの代謝産物に関する化学的研究

14:44 ○竹田翔伍，崔　宰熏[1]，山川泰広，越野広雪[2]，浅井辰夫[3]，平井浩文，河岸洋和[1]（静大農・応生化，[1]静大院・創造，[2]理研，[3]静大農・バイオ）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2A04p07　コムラサキシメジが産生するフェアリーリング惹起物質の植物内生の証明

15:05 ○崔　宰熏[1]，山川泰広[2]，関口周兵[2]，竹田翔伍[2]，大西利幸[1]，森田明雄[2]，本橋令子[3]，平井浩文[2]，河岸洋和[1,2]（[1]静大院・創造，[2]静大農・応生化，[3]静大農・共生バイオサイエンス）

2A04p08　ナラタケ(*Armillaria mellea*)が産生する多感作用物質の化学的解明

15:16 ○小堀　一，関谷　敦[1]，平井浩文，河岸洋和[2]（静大農・応生化，[1]森林総研，[2]静大院・創造）

2A04p09　新規ナフトキノン化合物 JBIR-85 の単離，構造決定および生合成に関する研究

15:27 ○泉川美穂，本橋慶一郎，佐藤龍太朗[1]，永井　文，大西康夫[1]，高木基樹，新家一男[2]（JBIC，[1]東大院・農生科，[2]産総研）

2A04p10　微生物代謝産物フラクションライブラリーと MP plot を活用した新規化合物の探索

15:38 ○野川俊彦，岡野亜紀子，田中健一，浦本昌和，高橋俊二，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

2A04p11　微生物代謝産物からの MRSA に対するアルベカシン耐性克服物質の探索

15:49 ○須賀拓弥[1]，石井貴広[1,2]，岩月正人[2]，山本　剛[2]，野中健一[2]，松本厚子[2]，増間碌郎[1,2]，高橋洋子[1,2]，花木秀明[2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大感染制御科学，[2]北里大生命研）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2A04p12　脳梗塞治療薬候補 SMTP の新規同族体

16:10 ○大竹新也，小川哲弘，長谷川啓子[1]，西村直子[1]，鈴木絵里子，蓮見恵司（東農工大農・応生科，[1]ティムス）

2A04p13　哺乳類 DNA ポリメラーゼを阻害する新規アザフィロンの単離と構造決定

16:21 ○明畠佑典，竹内倫文，倉持幸司[1]，紙透伸治，栗山磯子[2]，吉田弘美[2]，水品善之[2]，菅原二三男（東理大理工・応生，[1]京都府大院・生命環境，[2]神戸学院大栄養・栄養）

2A04p14　ミミズ糞土中のイネいもち病菌に効果を示す物質の探索

16:32 ○高木修太郎，津田菜友美，佐藤義大，菅原二三男，鎌倉高志（東理大院理工・応生科）

2A04p15　*Penicillium* sp. FKI-5329 が生産する NADH-フマル酸還元酵素阻害化合物

16:43 大山公成[1]，○森美穂子[1,2]，増間碌郎[1,2]，高橋洋子[1,2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院・感染制御，[2]北里大・生命研）

2A04p16　微生物二次代謝産物からの赤痢アメーバ原虫特異的含硫アミノ酸代謝酵素阻害物質の探索

16:54 ○増田祐衣[1]，森美穂子[1,2]，野崎智義[3]，筒井　歩[2]，砂塚敏明[1,2]，増間碌郎[1,2]，高橋洋子[1,2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大院感染制御，[2]北里大生命研，[3]国立感染研）

p17〜p21 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2A04p17　植物から分離された希少放線菌の生産する新規物質の探索

17:15 ○富田智宏[1]，岩月正人[2]，奥山竜輝[1]，中島琢自[3]，松本厚子[2]，高橋洋子[1,2]，森美穂子[1,2]，大村　智[2]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大感染制御，[2]北里大生命研，[3]北里大感染制御研究機構）

2A04p18　*Penicillium* sp. FKI-5249 の生産する新規アザフィロン化合物の構造及び活性

17:26 ○新妻　恵[1]，森美穂子[1,2]，岩月正人[1]，中島琢自[3]，野中健一[1]，増間碌郎[1,2]，大村　智[1]，塩見和朗[1,2]（[1]北里大生命研，[2]北里大院感染制御，[3]北里大感染制御研究機構）

2A04p19　イオンモビリティー質量分析装置を利用した天然物化合物の構造解析

17:37 ○小曽根郁子，高木基樹，新家一男[1]（JBIC，[1]産総研）

2A04p20　植物病原細菌の flagellin 糖鎖構造の解明：P. syringae の flagellin 糖鎖について

17:48 ○山本雅信，知久和寛，石井　忠，亀山眞由美，小野裕嗣，吉田　充，田口富美子[1]，一瀬勇規[1]（農研機構・食総研，[1]岡山大院・自然科学）

2A04p21　*Pseudomonas syringae* の D-Rha と L-Rha 生合成関連遺伝子破壊株中の LPS 構造と運動性への影響

17:59 ○知久和寛，常見和彦[1]，山下祐佳里[1]，山本雅信，亀山眞由美，小野裕嗣，吉田　充，田口冨美子[1]，岩城雅子[1]，一瀬勇規[1]，石井　忠（農研機構・食総研，[1]岡山大院・自然科学）

A05 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機—天然物 – ケミカルバイオロジー，作用機構—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2A05a01　細胞周期 G2/M 期に作用する小分子化合物の構造活性相関研究

9:00 ○高木隆吉[1,2]，清水　猛[1]，川谷　誠[1]，青野晴美[1]，近藤恭光[1]，本田香織[1]，柴　隆一[2]，長田裕之[1]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー，[2]東電大院工・物質工）

2A05a02　Xanthohumol の autophagy 制御機構解析

9:11 ○金壎周平，笹澤有紀子，田代　悦，野川俊彦[1]，室井　誠[1]，近藤恭光[1]，長田裕之[1]，井本正哉（慶応大理工，[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

2A05a03　理研・天然化合物バンク(NPDepo)を利用したコレステロール代謝・分布を変化させる化合物のスクリーニング

9:22 ○斎藤臣雄，石塚玲子[1]，小林俊秀[1]，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー，[1]理研基幹研・脂質生物学）

2A05a04　プロテオーム解析を用いた Terpendole 類縁体の作用解析

9:33 ○室井　誠[1]，石井康之[1,2]，近藤久恵[1]，本山高幸[1]，長田裕之[1]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー，[2]法政大・工）

2A05a05　p38 γ および p38 δ 特異的阻害剤探索のための化合物アレイの改良

9:44 ○近藤恭光，須藤龍彦，本田香織，内田素子，林　輝雄，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2A05a06　抗腫瘍性 Aplysiatoxin 単純化アナログの側鎖の構造活性相関を目的とした合成経路の確立

10:05 ○朱　裕姫，柳田　亮[1]，徳田春邦[2]，鈴木信孝[2]，入江一浩（京大院農，[1]香川大農，[2]金沢大院医）

2A05a07　日本産フサコケムシに含まれるブリオスタチン類の同定と活性評価

10:16 ○植野紗代，柳田　亮[1]，村上一馬，村上　明，徳田春邦[2]，

鈴木信孝[2]，藤原健史[3]，入江一浩（京大院･農，[1]香川大･農，[2]金沢大院・医，[3]OP-BIO Factory）

2A05a08　国内流通タイム（*Thymus suturoides*）に含有される CYP 阻害活性物質（第 2 報）

10:27　◦山里実央，Zeineb Brahimi，松井真央，大久保将啓，重藤桜子，草刈悠奈，丹羽　瞳，菅谷紘一，小野瀬淳一，阿部尚樹（東農大応生科・栄養）

2A05a09　Potent Mechanism-based Inhibition of Human P450 CYP3A4 and CYP2D6 in vitro by Tunisian Thyme, *Thymus algeriensis*

10:38　◦Zeineb Brahmi，Hitomi Niwa，Mio Yamasato，Sakurako Shigeto，Yuna Kusakari，Kouichi Sugaya，Jun-ichi Onose，Naoki Abe（Tounoudai）

2A05a10　二糖類のインスリン様作用に関する研究

10:49　◦木村太郎，山崎一諒，飛鋪亮吾，加藤英介，川端　潤（北大院農）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2A05a11　フラボノイド-ネオヘスペリドース複合体のインスリン様活性に対するグリコシド結合の影響

11:10　◦飛鋪亮吾，山崎一諒，加藤英介，川端　潤（北大院農）

2A05a12　インスリン様作用を有する二糖ネオヘスペリドースの作用部位解析に向けた蛍光標識化研究

11:21　◦新田貴大，加藤英介[1]，川端　潤[1]（北大農・生機科，[1]北大院農・応生科）

2A05a13　2-アミノレゾルシノールの α-グルコシダーゼ結合部位の解明に向けたプローブ分子の合成

11:32　◦辻　裕貴，及川健一[1]，加藤英介[1]，川端　潤[1]（北大農，[1]北大院農）

2A05a14　植物生長抑制作用を有する希少糖誘導体の親水性官能基が生物活性に与える影響

11:43　◦柳田　亮，山足陽和，橋谷矩史，川浪康弘（香川大･農）

2A05a15　酸化型タキシフォリンによるアミロイド β の凝集抑制機構

11:54　◦佐藤瑞穂，　村上一馬，　井久保遥子，　片山寿美枝[1]，赤木謙一[1]，入江一浩（京大院農・食生科，[1]医薬基盤研究所）

A05 会場　午後の部（13:49〜18:10）

有機―天然物 – ケミカルバイオロジー，作用機構―

p01〜p06 発表者の接続時間④ 13:39〜13:49

2A05p01　カイコ細菌感染症モデルを用いて治療効果を指標に単離した新規抗生物質，カイコシンの構造と作用機構解析

13:49　◦浦井　誠[1]，浜本　洋[1]，Atmika Paudel[1]，村上和久[2]，堀江　亮[1]，浜瀬健司[3]，関水和久[1,2]（[1]東大院薬，[2]ゲノム創薬研究所，[3]九大院薬）

2A05p02　HL60 細胞における山菜由来のエンドパーオキサイド化合物のアポトーシス誘導メカニズム

14:00　◦坂本良美，上杉祥太，土屋英子[1]，長田裕之[2]，木村賢一（岩手大院・農，[1]広島大院・先端物質，[2]理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

2A05p03　久慈産琥珀由来の新規 Ca^{2+} シグナル伝達阻害物質 kujigamberol の HL60 細胞に対する生物活性

14:11　◦南川裕樹，叶　躍奇[1]，高橋俊哉[1]，越野広雪[1]，新田久男[2]，宮川都吉[3]，木村賢一（岩手大院･農，[1]理研･基幹研，[2]久慈琥珀(株)，[3]広島大院・先端物質）

2A05p04　酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 変異株を用いた新規スクリーニング系の検討

14:22　◦上杉祥太[1]，喜多島萌[2,3]，川村悠実[2]，高木博史[3]，木村賢一[1,2]（[1]岩手大院・農，[2]岩手大・農，[3]奈良先端大・バイオ）

2A05p05　ハンカチノキ（*Davidia involucrata*）に含まれる生物活性物質の構造と活性

14:33　◦木村賢一[1,2]，　川村悠実[1]，　上杉祥太[2]，　久保田辰徳[1]，奥田恵子[1]，渡辺牧子[1]，越野広雪[3]，米山　操[3]，伊藤昭博[3]，吉田　稔[3]（[1]岩手大・農，[2]岩手大院・農，[3]理研・基幹研）

2A05p06　中国産食用茸ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有 vialinin 類の KU812 細胞における TNF-α 発現阻害活性に関する研究

14:44　◦飯田恭兵，和田真実，矢嶋俊介[1]，矢島　新[2]，越野広雪[3]，菅谷紘一，小野瀬淳一，阿部尚樹（東農大応生科・栄養，[1]東農大応生科・バイオ，[2]東農大応生科・醸造，[3]理研）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2A05p07　ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有 TNF-α 発現阻害物質 vialinin A の蛍光プローブを用いた RBL-2H3 細胞における標的分子の探索法の検討

15:05　◦吉岡泰淳，叶　躍奇，矢嶋俊介[1]，矢島　新[2]，越野広雪[3]，高橋俊哉[3]，谷口佳代子[2]，岡田　潔[1]，菅谷紘一，小野瀬淳一，阿部尚樹（東農大応生科・栄養，[1]東農大応生科・バイオ，[2]東農大応生科・醸造，[3]理研）

2A05p08　中国産食用茸ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有 vialinin 類による T 細胞サイトカイン産生制御に関する研究

15:16　◦関谷文葉，矢嶋俊介[1]，矢島　新[2]，越野広雪[3]，菅谷紘一，小野瀬淳一，阿部尚樹（東農大応生科・栄養，[1]東農大応生科・バイオ，[2]東農大応生科・醸造，[3]理研）

2A05p09　*Trichoderma* sp. USF-2690 産生生理活性物質 bisorbicillinol の DNA マイクロアレイを用いた TNF-α 発現阻害活性の解析

15:27　◦野中美寿々，中島希望，原口菜央，清水寛之，菅谷紘一，小野瀬淳一，阿部尚樹（東農大応生科・栄養）

2A05p10　中国産食用茸コウタケ（*Sarcodon aspratus*）に含有される生体機能調節物質

15:38　◦柿本菜月，大橋　薫，清塚洋美，有里　優，叶　躍奇，越野広雪[1]，菅谷紘一，小野瀬淳一，阿部尚樹（東農大応生科・栄養，[1]理研）

2A05p11　ツバキ種子エキス由来サポニンによる正常ヒト皮膚繊維芽細胞への影響

15:49　◦史　文磊，野崎　勉，吉田祐理子，秋本　亮，船曳涼子，石原健夫（ビーエイチエヌ(株)）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2A05p12　アフリカ伝承民間薬止瀉成分 Voacangine は TRPV1 の競合的拮抗薬である

16:10　◦寺田祐子，堀江俊治[1]，高山廣光[2]，佐藤　努，渡辺達夫（静岡県大院生活健康・食栄，[1]城西国際大・薬，[2]千葉大院・薬）

2A05p13　渦鞭毛藻ヘテロカプサ・サーキュラリスクアーマの海洋細菌に対する影響

16:21　◦竹下哲史，山口健一[1]，小田達也[1]（長崎大･産連戦略本部，[1]長崎大・水）

2A05p14　紅藻からの新規プロスタグランジン代謝物の単離，構造決定とマウス組織中での同定

16:32　◦金井良和，廣木禎彦，越野広雪[1]，此木敬一，長由扶子，Cayme Mirriam[2]，福代康夫[3]，山下まり（東北大院・農，[1]理研・基幹研，[2]フィリピン国立水産研，[3]東大アジアセ）

2A05p15　放線菌代謝産物から得られた新規プロスタグランジン放出阻害物質 sacchathridine A に関する研究

16:43　◦中栄功一，倉田育子，小島蕗子，五十嵐雅之，波多野和樹，澤　竜一，久保田由美子，安達勇光，野本明男（微化研）

2A05p16　コガタルリハムシ *Gastrophysa atrocyanea* の防御物質によるアリ忌避活性

16:54　◦薬丸亮太，渡邉良祐[1]，清水伸泰[1]，桑原保正[1]，秋野順治（京工繊大繊維・応生，[1]京都学園・バイオ環境）

p17〜p21 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2A05p17　エラグ酸によるタンパク質 SUMO 化阻害

17:15　米山　操[1,2]，　広浜美香子[1,3]，　木村賢一[4]，　半田　宏[2]，◦伊藤昭博[1,3]，吉田　稔[1,3]（[1]理研・基幹研，[2]東工大院・生命理工，[3]科技機構・CREST，[4]岩手大農・応生）

2A05p18　加水分解デラウエア果皮エキスの DNA 修復促進作用

17:26　萩野　輝，田畑光正[1]，池田英史，◦西浦英樹（日本コルマー(株)，[1]島根県産業技術センター）

2A05p19　微生物由来低分子化合物 SMTP-7 による脳梗塞治療効果発現の分子基盤解析

17:37　◦鈴木絵里子，松本直欣，蓮見恵司（東農工大・農）

2A05p20　原核生物 Hsp90 の機能に影響を与える天然小分子化合物の解析

17:48　横山雄平，Jantan Ibrahim[1]，◦仲本　準（埼玉大・理，[1]Kebangsaan Malaysia 大・薬）

2A05p21　ヤセウツボ(Orobanche minor)由来化合物のアミロイド β 凝集阻害活性に関する研究

17:59　◦栗栖真奈美[1]，宮前友策[1,2]，村上一馬[3]，Han Junkyu[1,4]，礒田博子[1,4]，入江一浩[3]，繁森英幸[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]京大生命統合生命，[3]京大院農食品生物，[4]筑波大 ARENA）

A06 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機―天然物 – 生合成，代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2A06a01　糸状菌 *Phomopsis amygdali* が生産するフシコクシン(FC)生合成マシナリーの機能解明-3-

9:00　野池基義，小野裕介，◦長野竜郎，濱野吉十[1]，樋口雄介[2]，豊増知伸[3]，佐々武史[3]，加藤修雄[2]，大利　徹（北大・院工，[1]福井県大・生物資源，[2]阪大・産研，[3]山形大・農）

2A06a02　フタロシン(FL)経路の解析

9:11　◦池田駿介，柏崎恭平，小野裕介，池田安由美，佐藤康治，矢島　新[1]，瀬戸治男[1]，大利　徹（北大院・工，[1]東農大・応生科）

2A06a03　バクテリアにおける新規葉酸生合成経路の解明

9:22　◦佐藤康治，大利　徹（北大院・工）

2A06a04　糸状菌 *Phomopsis amygdali* が生産するフシコクシン(FC)生合成マシナリーの機能解明 -1-

9:33　◦野池基義，小野裕介，谷尾　亮，豊増知伸[1]，佐々武史[1]，加藤修雄[2]，大利　徹（北大院・工，[1]山形大・農，[2]阪大・産研）

2A06a05　糸状菌 Phomopsis amygdali が生産するフシコクシン(FC)生合成マシナリーの機能解明-2-

9:44　野池基義，荒木祐治，◦劉　成偉，小野裕介，濱野吉十[1]，樋口雄介[2]，豊増知伸[3]，佐々武史[3]，加藤修雄[2]，大利　徹（北大院・工，[1]福井県大・生物資源，[2]阪大・産研，[3]山形大・農）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2A06a06　糸状菌由来休眠型生合成遺伝子の活性化によるペプチド系天然物合成システムの構築

10:05　◦佐藤道大，中沢威人，野口博司，守屋央朗[1]，渡辺賢二（静岡県大・薬，[1]岡山大学異分野融合先端研究コア）

2A06a07　糸状菌ゲノムの酵母を宿主とした発現によるペプチド系抗生物質の合成

10:16　◦石川格靖，恒松雄太，杉本　覚，石内勘一郎，守屋央朗[1]，野口博司，渡辺賢二（静岡県大・薬，[1]岡山大学・コア）

2A06a08　二次代謝研究を指向した糸状菌 Chaetomium globosum の分子遺伝学実験システムの整備

10:27　◦中沢威人，杉本　覚，五反田康考，野口博司，渡辺賢二（静岡県大・薬）

2A06a09　サフラマイシン生合成酵素の機能解析

10:38　◦鰐渕清史，猿渡隆佳，北野達也，野口博司，守屋央朗[1]，渡辺賢二（静岡県立大学薬，[1]岡山大学異分野コア）

2A06a10　生合成遺伝子の異種発現による抗腫瘍性生物活性物質サフラマイシンの合成

10:49　◦猿渡隆佳，鰐渕清史，北野達也，野口博司，守屋央朗[1]，渡辺賢二（静岡県立大薬，[1]岡山大学 異分野融合先端研究コア）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2A06a11　生合成遺伝子群の転写因子発現による azaphilone 系天然物の合成

11:10　◦杉本　覚，石内勘一郎，中沢威人，恒松雄太，石川格靖，野口博司，守屋央朗[1]，渡辺賢二（静岡県大・薬，[1]岡山大・異分野コア）

2A06a12　Spirotryprostatin 類の生合成研究

11:21　◦恒松雄太，石川格靖，野口博司，守屋央朗[1]，渡辺賢二（静岡県大薬，[1]岡山大異分野コア）

2A06a13　*Talaromyces stipitatus* 由来スチピタチン酸生合成経路の解析

11:32　◦橋元　誠，上田未希，藤井　勲（岩手医大・薬）

2A06a14　糸状菌の二成分情報伝達系攪乱による二次代謝産物生産誘導

11:43　◦本山高幸，林　敏明，廣田　洋，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

2A06a15　機能未知生合成遺伝子を活用したポリケタイド系天然物の合成

11:54　◦石内勘一郎，中沢威人，大熊貴士，野口博司，守屋央朗[1]，渡辺賢二（静岡県大・薬，[1]岡山大学異分野融合先端研究コア）

A06 会場　午後の部（14:00〜17:59）

有機―天然物 – 生合成，代謝―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2A06p02　Quinocarcin 生合成における tetrahydroisoquinoline 骨格構築機構の解明：第一報

14:00　◦平塚知成，金子峻輔，纐纈健人，南　篤志，大栗博毅，及川英秋（北大院理）

2A06p03　糸状菌発現系を用いた糸状菌由来生物活性天然物の汎用的物質生産法の開発

14:11　◦藤居瑠彌，南　篤志，藤田悠太，五味勝也[1]，及川英秋（北大院理，[1]東北大院農）

2A06p04　インドールジテルペン・パキシリンの生合成研究；生合成遺伝子の異種発現による生産検討

14:22　◦田上紘一，南　篤志[1]，笛木周平[1]，七條好宏[1]，及川英秋[1]（北大理，[1]北大院理）

2A06p05　リベロマイシン生合成における多段階酵素反応の再構築

14:33　◦熊野匠人，高橋俊二，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

2A06p06　サクシニル化に関わるリベロマイシン生合成遺伝子の機能解析

14:44　◦高橋俊二，熊野匠人，大輪田恵利，高木　海，浦本昌和，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2A06p07　2-アルキルマロニル-CoA 生合成機構の解析

15:05　◦宮澤　岳[1,2]，高橋俊二[1]，大輪田恵利[1]，林　輝雄[1]，清水　猛[1]，野川俊彦[1]，松本幸次[2]，長田裕之[1,2]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー，[2]埼玉大院・理工）

2A06p08　β-carboline compounds as biomediator of secondary metabolism in *Streptomyces reveromyceticus*

15:16　◦Suresh Panthee，Shunji Takahashi，Teruo Hayashi，Takeshi Shimizu，Yushi Futamura，Hiroyuki Osada（Chem. Biol., RIKEN ASI）

2A06p09　新規ヌクレオシド系抗生物質 A-94964 の生合成遺伝子の同定

15:27　◦白石太郎，葛山智久，西山　真（東大生物工学セ）

2A06p10　ヌクレオシド系化合物 caprazamycin 生合成における Cpz23 の機能解析

15:38　◦廣　　昇，五十嵐雅之[1]，葛山智久，西山　真（東大生物工学セ，[1]微化研）

2A06p11　16 員環マクロライド bafilomycin 生合成における修飾酵素遺伝子の同定

15:49　◦橋本拓哉，沼田　淳，池田治生[1]，葛山智久，西山　真（東大生物工学セ，[1]北里大北里生命研）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2A06p12　Lavanducyanin 生合成における N-プレニル化酵素の同定
16:10　◦尾崎太郎，葛山智久，西山　真（東大生物工学セ）
2A06p13　放線菌由来新規ジテルペン環化酵素の機能解析
16:21　◦目黒亜由子，池田治生[1]，大村　智[2]，西山　真[3]，葛山智久[3]（東大生物工学セ，[1]北里大・北里生命研，[2]北里大，[3]東大・生物工学セ）
2A06p14　Functional analysis of phenylglycine biosynthetic genes in production of virginiamycin S, a streptogramin type B antibiotic
16:32　◦Fitria NINGSIH, Shigeru Kitani, Eriko Fukushima, Takuya Nihira（Osaka University）
2A06p15　Streptomyces sp. RK95-74 株のゲノム解析と二次代謝産物の生合成遺伝子群
16:43　◦植木雅志[1]，小城尚文[2,1]，高橋俊二[1]，大輪田恵利[1]，豊田　敦[3]，川崎　寿[2]，長田裕之[1]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー，[2]東電大院工・物質工，[3]遺伝研）
2A06p16　新規ポリケチド代謝産物 Linearolides 生合成遺伝子の解析
16:54　◦小城尚文[1,2]，植木雅志[1]，高橋俊二[1]，川崎　寿[2]，長田裕之[1]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー，[2]東電大院工・物質工）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2A06p17　*Streptomyces* sp. RI-18 由来ベンザスタチン類の生合成研究
17:15　◦林　貴之，高木基樹[1]，新家一男[2]，大西康夫（東大院農生科・応生工，[1]JBIC，[2]AIST）
2A06p18　放線菌 *Streptomyces clavuligerus* 由来の linalool/nerolidol 合成酵素の機能解析
17:26　仲野千秋，◦金孝キョン，大西康夫（東大院農生科･応生工）
2A06p19　*Streptomyces rochei* の PQQ 生合成遺伝子破壊株の代謝産物解析
17:37　◦荒川賢治，吉田竜平，曹　志生，木梨陽康（広島大院・先端研）
2A06p20　Hatomarubigin 生合成遺伝子の機能解析
17:48　◦伊澤真澄，前田鮎美，川崎　崇[1]，早川洋一（東理大･薬，[1]神戸大院・農）

A07 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機―合成，反応機構―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2A07a01　リパーゼを用いた 1H, 1H, 2H, 2H-Perfluoro Octyl gallate の酵素合成
9:00　◦宇野喜晴，原田真里嘉[1]，濱本博三[2]，倉田淳志，岸本憲明（近畿大院・農，[1]近畿大・農，[2]近畿大・薬）
2A07a02　Caffeoyl quinic acid と vinyl caffeate から dicaffeoyl quinic acid の酵素合成
9:11　◦松田陽子，宇野喜晴[1]，岩井和也[2]，倉田淳志[1]，岸本憲明[1]（近畿大・農，[1]近畿大院・農，[2]UCC 上島珈琲）
2A07a03　加水分解酵素を用いたシクラメンアルデヒドの不斉合成
9:22　◦川崎正志（富山県立大・工）
2A07a04　クルクミン類の類縁体合成とその化学的性質に関する研究
9:33　◦増田温子，柳瀬笑子，中塚進一[1]（岐阜大・応生，[1]長良サイエンス）
2A07a05　山椒種子中のセロトニン関連配糖体及び類縁体の合成
9:44　◦吉田拓弥，柳瀬笑子，中塚進一[1]（岐阜大・応生，[1]長良サイエンス）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2A07a06　ユズ種子リモノイド類の骨格変換反応
10:05　◦佐藤弘規（岐阜大　応生）
2A07a07　ゼルンボンの位置選択的ハロゲン化と新規多環式化合物への変換
10:16　◦高橋一生，井福　壮[1]，河合　靖[2]，北山　隆（近畿大院農バイオ，[1]近畿大農バイオ，[2]長浜バイオ）
2A07a08　Valerena-4,7(11)-diene の合成研究
10:27　◦妻形博紀，白井貴士[1]，北山　隆（近畿大院農バイオ，[1]近畿大農バイオ）
2A07a09　3-Benzyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin のアナログ合成研究
10:38　◦石原沙也加[1]，　堀川敦史[1]，　土井翔馬[1]，　岡本修平[1]，岡本泰輔[1]，植西譲二[1]，須藤龍彦[2]，長田裕之[2]，齊藤安貴子[1,3]（[1]大阪電通大工・応用化学，[2]理研基幹研　ケミカルバイオロジー，[3]大阪電通大工・環境）
2A07a10　TBDMS を保護基として用いたプロシアニジン-B3 アナログの立体選択的合成と位置選択的脱保護
10:49　◦岡本泰輔[1]，　東野雄祐[1]，　植西譲二[1]，　石原沙也加[1]，岡本修平[1]，土井翔馬[1]，中島範行[2]，齊藤安貴子[1,3]（[1]大阪電通大工・応用化学，[2]富山県大工・生物工学，[3]大阪電通大工・環境）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2A07a11　プロアントシアニジン立体選択的合成における保護基の再検討
11:10　◦植西譲二[1]，　岡本泰輔[1]，　森口正太郎[1]，　岡本修平[1]，土井翔馬[1]，石原沙也加[1]，中島範行[2]，齊藤安貴子[1,3]（[1]大阪電通大工・応用化学，[2]富山県立大工，[3]大阪電通大工・環境科学）
2A07a12　プロシアントシアニジンのプローブ化研究
11:21　◦土井翔馬[1]，　岡本修平[1]，　石原沙也加[1]，　植西譲二[1]，岡本泰輔[1]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大工・応用化学，[2]大阪電通大工・環境）
2A07a13　3-*O*-メチル化ケルセチンの合成とアントシアニジンへの変換反応
11:32　◦加藤　亮，尾山公一[1]，近藤忠雄，吉田久美（名大院・情報科学，[1]名大・物国セ）
2A07a14　アジサイの青色発色に関与するアシル化キナ酸類の効率的合成
11:43　◦渡邉紀之，鈴木昌子，関口由起子，尾山公一[1]，近藤忠雄，吉田久美（名大院・情報科学，[1]名大・物国セ）
2A07a15　3- デオキシペラルゴニジン 5-*O*-(6-*O*-シンナモイルグルコシド)の合成研究
11:54　◦尾山公一，近藤忠雄[1]，吉田久美[1]（名大・物国セ，[1]名大院・情報科学）

A07 会場　午後の部（14:00〜17:59）

有機―合成，反応機構―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2A07p02　オルト-ブロモトシルオキシアリールからオルト-ブロモビアリールの合成
14:00　間瀬智志，◦福士幸治（北大院農）
2A07p03　液相二相合成法を用いた迅速な一容器ペプチド合成システムの構築
14:11　◦小池幹男，岡田洋平，千葉一裕（東農工大農・応生科）
2A07p04　疎水性タグを用いたジスルフィド架橋ペプチドの合成
14:22　◦北田慎吾，藤田秀司[1]，岡田洋平，金　承鶴，千葉一裕（東農工大・農，[1]JITSUBO㈱）
2A07p05　疎水性タグを用いた液相ペプチド合成
14:33　◦藤田裕子，格根塔娜，藤田秀司[1]，岡田洋平，金　承鶴，千葉一裕（東農工大・農，[1]JITSUBO 株式会社）
2A07p06　抗ウイルス活性を有する新規環状デプシペプチド

MA026 の合成研究

14:44 ○志村聡美，石間正浩，太田育恵，筒井悦子，紙透伸治，村田　寛，山崎隆之，鈴木孝洋[1]，倉持幸司[2]，竹内倫文，小林　進[1]，菅原二三男（東理大・理工，[1]東理大・薬，[2]京府大院・生命環境）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2A07p07　Callipeltin E の固相全合成

15:05 ○菊池真理，野坂和人[1]，赤路健一[2]，今野博行（山形大院理工・バイオ化学，[1]兵庫医大，[2]京都薬大）

2A07p08　抗真菌活性を有する Bk-1229 の β-hydroxyTyr 部位の立体化学と合成に関する研究

15:16 ○生駒　恵，大槻雄介，野坂和人[1]，今野博行（山形大院理工・バイオ化学，[1]兵庫医大）

2A07p09　Sargafuran の合成研究

15:27 ○青木一矢，勝田　亮，矢島　新，額田恭郎（東農大応生）

2A07p10　Versipelostatin A 天然型スピロテトロン酸ユニットの合成

15:38 ○勝田　亮，新井一哉，籠原裕磨，矢島　新，額田恭郎（東農大応生）

2A07p11　Versipelostatin マクロ環およびオクタリン構築の検討

15:49 ○山本健人，廣嶋将純，小鷲真衣，勝田　亮，矢島　新，額田恭郎（東農大応生）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2A07p12　Decarestrictine H の合成研究

16:10 ○下平雄一郎，勝田　亮，矢島　新，額田恭郎（東農大・応生）

2A07p13　Tautomycetin の合成研究(5)

16:21 ○今村龍太郎，重冨顕吾，生方　信（北大院農）

2A07p14　8-デオキシテトロドトキシンの立体制御合成

16:32 ○所　聖太，安立昌篤，磯部　稔[1]，西川俊夫（名大院生命農，[1]台湾国立清華大）

2A07p15　テトロドトキシンおよびチリキトキシンの合成研究

16:43 ○榊原　良，安立昌篤，佐竹佳樹，磯部　稔[1]，西川俊夫（名大院生命農，[1]台湾国立清華大）

2A07p16　植物毒素 Tagetitoxin の合成研究

16:54 ○山田ひと美，安立昌篤，西川俊夫（名大院生命農）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2A07p17　抗腫瘍性抗生物質パクタマイシンの合成研究

17:15 ○松本信之，辻本　恭，中崎敦夫，西川俊夫（名大院生命農）

2A07p18　ソラノエクレピン A 右側部分の合成研究

17:26 ○駒田武馬，安立昌篤，西川俊夫（名大院生命農）

2A07p19　ヒトの表皮に含まれるセラミドの合成

17:37 ○田代卓哉，濱中すみ子[1]，森　謙治（理研･RCAI，[1]理研･BSI）

2A07p20　貯穀害虫 dried bean beetle の雄のフェロモン構成成分である(*R*,*E*)-2,4,5- テトラデカトリエン酸メチルと(2*E*,4*Z*)-2,4-デカジエン酸メチルの合成

17:48 ○森　謙治[1,2]（[1]東洋合成，[2]理研・RCAI）

C09 会場　午前の部（9:00〜11:33）

酵素—アミノ酸代謝関連酵素—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2C09a01　*Arabidopsis thaliana* 由来 3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼの活性制御機構に関する研究

9:00 ○岡村英治[1,2]，平井優美[1,2]（[1]理研 PSC，[2]JST CREST）

2C09a02　超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来システイン合成酵素 *O*-Phosphoserine sulfhydrylase(OPSS)の熱安定性と有機溶媒安定性について

9:11 ○中村　卓，浅井伸次，武田瑛美，石川一彦[1]（長浜バイオ，[1]産総研）

2C09a03　X 線結晶構造解析による超好熱性古細菌 Aeropyrum pernix K1 由来のシステイン合成酵素 OPSS の基質認識機構の解明

9:22 ○武田瑛美，中村　卓，石川一彦[1]（長浜バイオ大，[1]産総研）

2C09a04　好気性超好熱アーキア *Aeropyrum pernix* 由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素の構造解析

9:33 ○里村武範，川上竜巳[1]，末信一朗，櫻庭春彦[2]，大島敏久[3]（福井大院・工・生応化，[1]佐賀大・総合分析セ，[2]香川大・農・応生，[3]九大院・農・遺資工）

2C09a05　*Pseudomonas* sp. AIU 813 由来 L-アミノ酸 α-オキシダーゼの変異型酵素 C254I の解析

9:44 ○松井大亮[1]，礒部公安[2]，浅野泰久[1,3]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]岩手大農，[3]JST ERATO）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2C09a06　Streptomyces coelicolor A3(2)の D-アミノ酸オキシダーゼの機能解析

10:05 ○高橋祥司，斎藤弥生，田所南海帆，小林美江子，阿部勝正，解良芳夫（長岡技科大・環境）

2C09a07　細胞性粘菌における D-セリン代謝関連酵素とその生理機能

10:16 ○萩　泰典，伊藤智和，齊藤玉緒[1]，邊見　久，吉村　徹（名大院生命農，[1]上智大理工）

2C09a08　*Pichia pastoris* を宿主とするマサバ由来 L-リジン α-オキシダーゼの発現系構築

10:27 ○大松晃一郎，谷　泰史，由上亮一，中許昆照，斎藤茂樹，川端　潤[1]，上田　誠[1]，三原久明（立命館大・生命科学・生物工，[1]三菱化学科学技術研究センター・バイオ技術研）

2C09a09　*Pseudomonas putida* 由来新奇 D-リジンデヒドロゲナーゼの遺伝子クローニング，精製，および酵素化学的緒性質の解明

10:38 ○中許昆照，谷　泰史，斎藤茂樹，川端　潤[1]，上田　誠[1]，三原久明（立命館大・生命科学・生物工，[1]三菱化学科学技術研究センター・バイオ技術研）

2C09a10　*Thermococcus kodakarensis* におけるリジン・アルギニン生合成経路の解析

10:49 ○吉田彩子[1,2]，富田武郎[2]，跡見晴幸[3]，葛山智久[2]，西山　真[2]（[1]順天堂大医アトピー疾患研究セ，[2]東大生物工学セ，[3]京大院工）

a11〜a12 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2C09a11　Analysis of substrate specificity of homoisocitrate dehydrogenase homolog from *Thermococcus kodakarensis*

11:10 ○Lulu Yin, Takeo Tomita, Haruyuki Atomi[1], Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama（Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo, [1]Grad. School of Engr., Kyoto Univ.）

2C09a12　ロイシンによるグルタミン酸脱水素酵素のアロステリック調節機構の解析

11:21 ○富田武郎，葛山智久，西山　真（東大生物工学セ）

C09 会場　午後の部（13:49〜18:10）

酵素—アミノ酸代謝関連酵素—，—その他—

p01〜p06 発表者の接続時間④ 13:39〜13:49

2C09p01　D-アスパラギン酸酵素定量法の開発

13:49 ○生田智之，加藤志郎，邊見　久，吉村　徹（名大院・生命農）

2C09p02　*Oenococcus oeni* リジンラセマーゼの基質特異性に関する研究

14:00 ○加藤志郎，邊見　久，吉村　徹（名大院生命農）

2C09p03　緑藻 *C. reinhardtii* 由来アラニンラセマーゼ遺伝子のクローニングおよび発現と酵素学的諸性質

14:11 ○佐久田綾，正井三貴，谷川　実，西村克史[1]（日大･理工，[1]日大・短大応化）

2C09p04　生もと由来乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NBRC 102481 のヒスチジンラセマーゼ：部位特異的変異導入による変異型酵素の調製とその酵素科学的性質

14:22　◦郷上佳孝，老川典夫（関大・化学生命工）

2C09p05　乳酸菌由来のアミノ酸ラセマーゼの機能解析

14:33　◦行本丞太郎，松川博昭[1]，土居克実[1]，大島敏久[1]（九大院・生資環，[1]九大院・農）

2C09p06　*Streptomyces murayamaensis* 由来の二次代謝産物生合成に関わるアスパラギン酸キナーゼ(NspJ)の機能解析

14:44　◦辻本　舞，吉田彩子，富田武郎，大西康夫[1]，葛山智久，西山　真（東大生物工学セ，[1]東大院農生科応生工）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C09p07　新規 phosphoserine phosphatase の性状解析と生物内分布

15:05　◦千葉洋子，堀田彰一朗[1]，大塚　淳[1]，新井博之，永田宏次[1]，石井正治，田之倉優[1]，五十嵐泰夫（東大院農生科・応生工，[1]東大院農生科・応生化）

2C09p08　大腸菌 PII ウリジリルトランスフェラーゼ / リムバーゼ(UTase / UR)の機能ドメイン解析

15:16　◦坂口　葵，中村絵美，石川孝博，澤　嘉弘（島根大・生命工）

2C09p09　ナメコ由来チロシナーゼのタンパク質およびペプチドに対する反応性

15:27　◦小西康子，大田睦月，庄田和生，小原涼太[1]，野田文雄[1]（石川県大食品，[1]株式会社スギヨ）

2C09p10　ニワトリ初期胚における血管形成と(プロ)レニン受容体の関係

15:38　◦波多野大樹，荻野寛子[1]，山下賢仁，BISWAS BORON KAZARL，荒井由江，海老原章郎，中川　寅，鈴木文昭（岐大・応生，[1]岐大院・応生）

2C09p11　酵素を用いて合成した L-システイン重合ペプチドの HPLC による解析

15:49　◦奈良井朝子，花石智子，麻生慶一（日獣大・応生）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C09p12　部位特異的変異導入による AMV 逆転写酵素 α サブユニットの熱安定性の向上

16:10　◦小西　篤，保川　清，井上國世（京大院・農）

2C09p13　組換え HIV-1 逆転写酵素の調製と性状解析

16:21　保川　清，◦篠村まゆ[1]，井上國世（京大院･農，[1]京大･農）

2C09p14　好塩性酵素の触媒反応に及ぼす塩の効果

16:32　◦若井　暁, 城所俊一[1], 正木和夫[2], 三本木至宏（広島大院･生物圏，[1]長岡技大・生物，[2]酒類研）

2C09p15　*Aspergillus oryzae*フェルラ酸エステラーゼ B の基質認識に関わるアミノ酸残基の解析

16:43　◦河本かずさ，　鈴木健太郎[1]，　伏信進矢[1]，　若木高善[1]，塩野義人，小関卓也（山形大・農，[1]東大院・農）

2C09p16　水溶性フェルラ酸誘導体の酵素合成に関する研究

16:54　◦菊川昌希, 井田智章[1], 甲斐建次, 居原　秀[1], 阪本龍司（阪府大院　生環科，[1]阪府大院　理）

p17〜p21 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2C09p17　ビタミン K_2(メナキノン 4)生合成酵素 UBIAD1 の酵素化学的性質の解析

17:15　◦澤田夏美，廣田佳久，中川公恵，須原義智[1]，岡野登志夫（神戸薬大・衛生，[1]横浜薬大・環境）

2C09p18　水圏から分離した Burkholderia 属細菌が生産する新規フィチン酸加水分解酵素の酵素学的解析

17:26　◦Eduardo GRAMINHO, 高谷直樹, 中村　顕, 星野貴行（筑波大生命環境）

2C09p19　Organophosphorus hydrolase のアミノ酸置換による改良と精製法の検討

17:37　◦中山公介，大森　毅[1]，瀬戸康雄[1]，有路沙織，石川暁志，川原一芳（関東学院大・工・物質生命，[1]科警研）

2C09p20　Sphingobium sp. MI1205 由来ハロアルカンデハロゲナーゼ LinB の結晶構造解析

17:48　◦岡井公彦，大塚　淳，今井ファビアナリカ，間瀬朋子，森内良太[1]，永田裕二[1]，永田宏次，田之倉優（東大院・農生科，[1]東北大院・生命科）

2C09p21　超好熱性古細菌由来の推定ハロ酸デハロゲナーゼ PH0459 の機能解析

17:59　◦殷　梓蘭，中村　卓（長浜バイオ大）

C10 会場　午前の部（9:00〜11:54）

酵素—脂質代謝関連酵素—，—核酸代謝関連酵素—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2C10a01　脂肪酸 ω 酸化におけるアルコール脱水素酵素アイソザイムの役割

9:00　◦宮尾夕子，山本　覚（福山大生命工・生物工）

2C10a02　ココヤシ由来 Acyl-ACP チオエステラーゼは中鎖脂肪酸の生産に関与する

9:11　◦東條卓人，遠藤圭二[1]，瀧村　靖，尾崎克也[1]，萩原　浩（花王　エコ研，[1]花王　生物研）

2C10a03　*Bacillus* sp. SP-04 株由来のファミリー VIII カルボキシエステラーゼに属するテレフタル酸ジエチル加水分解酵素の構造および生化学的解析

9:22　◦中村　元，村島　惇，牧村美幸，竹原宗範，井上吉教，熊谷　勉（滋賀県大）

2C10a04　*Streptomyces albidoflavus* 由来金属イオン非要求性 phospholipase A_1の大量発現，キャラクタリゼーション，X 線結晶構造解析

9:33　◦加納功大，村山和隆[1]，杉森大助（福大院理工，[1]東北大院医工）

2C10a05　*Streptomyces* sp. NA684 由来新規ホスホリパーゼ B の大量発現とその特性解析

9:44　◦松本優作，杉森大助（福島大院・理工）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2C10a06　ジアシルグリセロールキナーゼ θ の機能解析

10:05　◦上田修司, 桐村悠佑, 山之上稔, 白井康仁（神戸大院･農）

2C10a07　tRNA アグマチニル化反応の構造的基盤

10:16　◦大澤拓生，木村　聡[1]，寺坂尚紘[1]，稲永英子，鈴木　勉[1]，沼田倫征（産総研・バイオメディカル，[1]東大院・工）

2C10a08　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の DNA polymerase B は細胞の生育に必須ではない

10:27　◦櫛田卓志，倉内康行[1]，鳴海一成[2]，藤原伸介[3]，今中忠行[4]，東端啓貴[5]（東洋大院･生命科学，[1]東洋大･生命科学，[2]原子力機構･量子ビーム応用研究部門，[3]関西学院大・理工，[4]立命館大・生命科学，[5]東洋大・バイオナノ）

2C10a09　*Rhodococcus rhodochrous* J1 株由来推定 Vsr エンドヌクレアーゼの機能解析

10:38　◦大内優彦，桑原ふみ[1]，渡辺文昭[1]，喜多恵子（京大農・応用生命，[1]三菱レイヨン）

2C10a10　制限酵素 EcoT38I のドメイン結合リンカー領域の機能解析

10:49　◦喜多恵子（京大院農・応用生命）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2C10a11　超好熱古細菌 RNase P タンパク質の RNA 作用様式の解析

11:10　◦石原雅人[1]，西本悦子[2]，山下昭二[2]，角田佳充[1,2]，木村　誠[1,2]（[1]九大院・システム生命，[2]九大院・農）

2C10a12　超好熱古細菌 RNase P タンパク質 Rpp38-RNA 複合体の熱力学的性質と結晶化

11:21　◦大嶋浩介，中島　崇[1]，濱崎真人，角田佳充[1]，木村　誠[1]

（九大院・生資環，[1]九大院・農）

2C10a13　シロイヌナズナ細胞小器官前駆体 tRNA プロセシング酵素・PRORP1 の調製と結晶化

11:32　◦今井崇喜，中山　郁，角田佳充[1]，木村　誠[1]（九大院・生資環，[1]九大院・農）

2C10a14　電子顕微鏡による超好熱古細菌リボヌクレアーゼ P の三次元再構成

11:43　◦山口浩輝，真柳浩太[1]，角田佳充，木村　誠（九大院･農，[1]九大・生医研）

C10 会場　午後の部（14:00〜18:10）

酵素—糖質代謝関連酵素(アミラーゼ)—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C10p02　乳酸菌由来生澱粉分解 α-amylase の機能解析

14:00　◦齊藤三保，小林達也，岡田早苗，佐藤英一（東農大応生科・化学）

2C10p03　*Lumbricus rubellus* 由来アミラーゼの諸性質の検討

14:11　五十嵐佑樹，雪　真弘[1]，森川　康[1]，小笠原渉[1]，◦赤澤真一（長岡高専・物質工，[1]長岡技科大・生物系）

2C10p04　酵母 *Pichia pastoris* で発現した，組換えメダカ α アミラーゼの結晶構造解析

14:22　◦水谷公彦，豊田真悠子，吉岡宗嗣，大竹雄一郎，三上文三（京大院農・応用生命）

2C10p05　微生物由来プルラナーゼのフレキシブルループ変異酵素の性質

14:33　◦岩本博行，佐藤孝憲，Malle Dominggus[1]，三上文三[2]（福山大・生命工，[1]Pattimura Univ.，[2]京大院・農）

2C10p06　Characterization and solvent engineering of wheat β-amylase for enhancing its activity and stability

14:44　◦Bedada Tadessa，Kenji Kojima，Kuniyo Inouy（Grad. Sch. of Agric., Kyoto univ.）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C10p07　X 線結晶構造解析によるダイズ β-アミラーゼの反応機構の解明

15:05　◦三上文三，奥村覚二，山田壮介，安達基泰[1]，水谷公彦，高橋延行（京大院農・応用生命，[1]原子力機構）

2C10p08　デキストラナーゼに見出された『プロ酵素を介する活性化現象』の分子機構

15:16　キムヨンミン，清水涼子，中井博之，森　春英，奥山正幸，カンミンソン，藤本　瑞[1]，舟根和美[2]，キムドマン[3]，◦木村淳夫（北大・院農，[1]農生資研，[2]農研機構・食総研，[3]全南大・生科工）

2C10p09　*Streptococcus mutans* 由来デキストラナーゼの X 線結晶構造解析

15:27　◦鈴木喜大[1]，金　泳珉[1,2]，藤本　瑞[1]，門間　充[1]，奥山正幸[2]，森　春英[2]，舟根和美[3]，木村淳夫[2]（[1]農生資研，[2]北大･院農，[3]農研機構・食総研）

2C10p10　環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼの活性向上と生成物サイズ特異性の制御

15:38　◦鈴木龍一郎，鈴木喜大[1]，藤本　瑞[1]，門間　充[1]，木村啓太郎，木村淳夫[2]，舟根和美（農研機構･食総研，[1]農生資研，[2]北大･院農）

2C10p11　Alteration of regioselectivity and synthesis of novel transglycosylation product by mutant alpha-glucosidase from *Schwanniomyces occidentalis*

15:49　◦Kyung-Mo SONG[1,2]，Mariko NISHIMURA[1,2]，Masayuki OKUYAMA[1,2]，Haruhide MORI[1,2]，Atsuo Kimura[1,2]（[1]GraduateSchool of Agriculture, [2]Hokkaido University）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C10p12　Functional implication of amino acid residues in conserved region II of European honeybee alpha-glucosidase on substrate specificity, transglucosylation and substrate inhibition

16:10　◦Lukana Ngiwsara，Gaku Iwai，Haruhide Mori，Masayuki Okuyama，Atsuo Kimura（Res. Fuc. Agr.・Hokkaido Univ.）

2C10p13　高活性 α-グルコシダーゼの創出とその酵素特性

16:21　◦岡本　武，丹尾式希[1]（味の素(株)食品研，[1]味の素(株)イノベーション研）

2C10p14　*Bacteroides thetaiotaomicron* 由来 α-galactosidase の求核残基変異酵素が触媒する糖転移反応の解析

16:32　◦渡辺健一，奥山正幸，森　春英，木村淳夫（北大院農）

2C10p15　β-アロシド加水分解活性を示す新規グリコシダーゼの探索

16:43　◦矢吹　悠[1]，三井彩詠子[2]，塚越　匠[1]，平野貴子[2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）

2C10p16　*Cellvibrio* sp. OA-2007 由来の α-アガラーゼの精製とその諸特性

16:54　◦岡本直樹，有賀　修，播本奈央望，中崎清彦[1]（高知工大･環境理工，[1]東工大・国際開発）

p17〜p21 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2C10p17　1,3-1,4-α-L-フコシダーゼの結晶構造解析に基づく基質特異性の構造学的基盤

17:15　◦櫻間晴子，伏信進矢[1]，北岡本光[2]，日高將文[1]，芦田　久[3]，片山高嶺，山本憲二，熊谷英彦（石川県立大・資源研，[1]東大院農生科・応生工，[2]農研機構・食総研，[3]京大院生命・統合生命）

2C10p18　*Aspergillus* sp. N-a 株 α-ガラクトシダーゼの酵素的性質

17:26　◦倉掛昌裕，奥村　匠，森本裕一郎（福山大･生命栄養科学）

2C10p19　*Arthrobacter* sp. K-1 由来 β-fructofuranosidase の X 線結晶構造解析

17:37　◦横井　岳，玉城彰子，宮崎剛亜，市川めぐみ，伊藤哲也[1]，藤田孝輝[1]，大田ゆかり[2]，秦田勇二[2]，西河　淳，殿塚隆史（東農工大院農，[1]塩水港精糖，[2]JAMSTEC）

2C10p20　新規加リン酸分解酵素，3-*O*-α-D-グルコシル-L-ラムノースホスホリラーゼの発見

17:48　◦仁平高則[1,2]，中井博之[1,3]，北岡本光[2]（[1]新潟大・農，[2]農研機構・食総研，[3]新潟大院・自然）

2C10p21　*Ruminococcus albus* NE1 株由来 cellobiose phosphorylase のアクセプター特異性の改変

17:59　◦羽村　健，佐分利亘，森本奈保喜[1]，森　春英，松井博和（北大院・農，[1]株式会社　ADEKA）

J11 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品—生理機能 – その他—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2J11a01　イネ種子に含まれるイネ科植物花粉アレルゲンホモログタンパク質はアレルギー患者 IgE と反応する

9:00　◦平野可奈[1,2]，日野真吾[1,3]，大島健司[1]，岡島徹也[4]，灘野大太[1]，宇理須厚雄[5]，松田　幹[1]（[1]名大院生命農・応用分子生命科，[2]岐阜女子大・健康栄養，[3]静岡大農・応生化，[4]名大院医・生化学第二，[5]藤田保健衛生大・医）

2J11a02　褐藻ツルアラメ抽出物による抗アレルギー効果

9:11　◦杉浦義正，田中竜介，松下映夫（水大校・食品科学）

2J11a03　グルコースがマスト細胞の活性化に及ぼす影響

9:22　◦永井寛治[1,2]，福島達伸[2]，大池秀明[1]，小堀真珠子[1]（[1]農研機構 食総研，[2]三菱レイヨン）

2J11a04　食品抗原によって誘導される免疫応答に腸内共生菌が与える影響

9:33　◦浜本雄次，細野　朗，鴨井大樹，津田真人，八村敏志[1]，百瀬愛佳[1]，平山和弘[1]，伊藤喜久治[1]，高橋恭子，上野川修一（日大生資科，[1]東大院農生科）

2J11a05　テリマグランジンのケミカルメディエーター放出抑制作用

9:44 ○高杉美佳子，高谷祐介[1]，宇都宮紋，甲斐友絵，山岸　喬[1]，新井博文[1]（九産大・工，[1]北見工業大）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2J11a06　人乳ラクトフェリンから派生する lactomedin-2（CFQWQR）の抗不安作用

10:05 ○園田壮司，吉川正明（生産開発科学研究所）

2J11a07　新しい抗うつペプチド Tyr-Leu

10:16 ○水重貴文，大日向耕作（京大院農・食品生物）

2J11a08　酵素的に消化された抗原の経口投与は食品アレルギーを抑制する。

10:27 ○大竹　愛，服部　誠，後藤真生[1]，石川（高野）祐子[1]，好田　正（東農工大農・応生化，[1]食総研）

2J11a09　イチゴ GAPDH による IgE 抗体産生の抑制

10:38 ○岩元　彬，井上愛子[1]，加藤珠樹，井上祐一[1]，川原浩治[1]（九工大・生命体工，[1]北九州高専・細胞工学センター）

2J11a10　牛乳 β-lactoglobulin 由来の新しい精神的ストレス緩和ペプチド

10:49 ○山田絢子，大日向耕作（京大院・農・食品生物）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2J11a11　TCR トランスジェニックマウスを用いた食物アレルギーのアレルゲン由来ペプチドによる抑制法および皮膚炎モデルの検討

11:10 ○平出恵利華[1,2]，足立（中嶋）はるよ[2]，武山　純[2]，上滝隆太郎[1,2]，塩河亜弥[1,2]，北村紀子[3]，佐伯真弓[3]，西村友枝[3]，神沼　修[3]，廣井隆親[3]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]東京都医学総合研・花粉症プロ）

2J11a12　TCR トランスジェニックマウスモデルを用いた食物アレルギーと制御性 T 細胞の関係の解析

11:21 ○芝原恭子[1,2]，足立（中嶋）はるよ[2]，塩河亜弥[1,2]，村上　仁[3]，津田真人[3]，若月芳雄[4]，細野　朗[3]，上野川修一[3]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]日大生資科・食品生命，[4]京大医）

2J11a13　ピーナッツおよびソバアレルゲンの IgE 結合交叉性エピトープの解析

11:32 ○勝山真多，岡田晋治，小林彰子，田辺創一[1]（東大院農生科・応生化，[1]広島大院生物圏科学・生物機能開発）

2J11a14　腸内共生菌による転写因子 C/EBP α を介したマスト細胞の機能制御

11:43 ○笠倉和巳，高橋恭子，布村　聡[1]，羅　智靖[1]，細野　朗，上野川修一（日大・生資科，[1]日大・医）

2J11a15　マウス腸管上皮における Tollip mRNA およびタンパクの発現解析

11:54 ○杉　由高，高橋恭子，栗原健太，中野　興，細野　朗，上野川修一（日大生資科）

J11 会場　午後の部（14:00〜17:59）

食品―生理機能 – その他―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2J11p02　マウスマクロファージ培養細胞 RAW264 における glutamate-cysteine ligase 発現に対する β-カロテンの影響

14:00 赤星哲平，多田紗也花，○山西倫太郎[1]（徳島大院栄養生命科学教育部，[1]徳島大院 HBS 研究部）

2J11p03　リンゴ由来プロシアニジンの抗原提示抑制効果

14:11 ○久木田卓弥，片山　茂，中島翔平[1]，舛田　晋[1]，神田智正[1]，穐山　浩[2]，中村宗一郎（信州大院・農，[1]アサヒグループホールディングス(株)，[2]国立医薬品食品衛生研）

2J11p04　脂質ラフトを介した免疫担当細胞の活性化に対するカロテノイドの影響

14:22 ○眞鍋祐樹，酒井祥太，菅原達也，平田　孝（京大院・農）

2J11p05　デヒドロアスコルビン酸修飾タンパク質の関与する自己免疫応答

14:33 ○近澤未歩，宮下宙士，大瀧菜月，柴田貴広，河合慶親，松田　幹，内田浩二（名大院生命農・応用分子生命科）

2J11p06　γ-ケトアルデヒド化合物が関与する自己免疫応答

14:44 近澤未歩，○宮下宙士[1]，大瀧菜月，柴田貴広，河合慶親，内田浩二（名大院生命農・応用生命科，[1]名大・農）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2J11p07　*Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO に対するヒト樹状細胞の免疫応答

15:05 ○中川良二，内田健治[1]，片野直哉[1]（道総研・食加研セ，[1]よつ葉乳業・中央研）

2J11p08　シビランにおける免疫賦活作用の評価

15:16 ○吉田　泉，福増潤二，渡辺章夫，原田哲平，三嶋　隆，山口昭弘，渡井正俊，三枝隆裕[1]（日本食品分析セ，[1]沖縄高専）

2J11p09　ワサビ抗腫瘍成分 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate(6-MITC)による免疫作動機序に関する研究

15:27 ○熊澤文音，岡田聖裕[1]，野下俊朗[2]，宮内裕美子[3]，宮川拓也[3]，田之倉優[3]，福家洋子（首都大・人間健康科学，[1]戦略研究センター，[2]県立広島大・生命環境，[3]東大院・農学生命科学）

2J11p10　*Lactobacillus brevis* KB290 摂取によるマウス脾臓における細胞傷害活性上昇作用とそのメカニズム解明

15:38 ○佐々木恵理加，福井雄一郎，福家暢夫，石島智子[1]，中井雄治[1]，阿部啓子[1]，矢嶋信浩（カゴメ総研，[1]東大院・農生科・応生化）

2J11p11　pDC 直接活性化能を有する *Lactococcus lactis* JCM5805（プラズマ乳酸菌）のマウスにおける効果

15:49 ○城内健太，杉村　哲[1]，大塩木乃実[1]，井門久美子[1]，阿野泰久[1]，藤原大介[1]（小岩井乳業・開発センター，[1]キリンホールディングス・フロンティア技術研）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2J11p12　*Lactococcus lactis* JCM5805（プラズマ乳酸菌）のヒト pDC 活性に及ぼす影響の検討

16:10 ○杉村　哲，城内健太[1]，大塩木乃実，田中貴章[2]，諏訪昌宏[1]，藤原大介（キリンホールディングス・フロンティア技術研，[1]小岩井乳業・開発センター，[2]小岩井乳業・商品開発部）

2J11p13　*Lactobacillus plantarum* NRIC0380 による $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ T 細胞誘導のメカニズム

16:21 ○藤原　渉，榎本麻衣，服部　誠，杉山　久[1]，下條　学[1]，岡田早苗[2]，好田　正（東農工大院・農・応生化，[1]東洋水産(株)・R & D センター，[2]東農大・菌株保存室）

2J11p14　培地組成による *Lactobacillus gasseri TMC0356* の免疫調節作用への影響

16:32 ○宮澤賢司，何　　方，依田一豊，立山　敦，平松　優（タカナシ乳業(株)・商品研究所）

2J11p15　高い IL-12 誘導活性を有する乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* MoLac-1 による感染防御作用

16:43 ○岩淵紀介，米澤寿美子，田中智弘，小田巻俊孝，清水（肖）金忠，八重島智子，岩附慧二（森永乳業・食基研）

2J11p16　加熱条件が Lactobacillus paracasei MoLac-1 の IL-12 誘導活性に及ぼす影響

16:54 ○田中智弘，岩淵紀介，矢吹博芳[1]，橋本潤一[1]，小田巻俊孝，清水（肖）金忠，八重島智子，武田安弘[1]，高瀬光徳[1]，岩附慧二（森永乳業・食基研，[1]森永乳業・栄科研）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2J11p17　ヒトロタウイルス感染に及ぼすウシ後期初乳 κ-カゼインの防御効果

17:15 ○村西晴香，山本真弓，Cairang zhuoma[1]，稲垣瑞穂[2]，Xi jier[1]，内田健志[3]，川西　貴[3]，矢部富雄[2]，金丸義敬[2]（岐阜大院応生・資源生命，[1]岐阜大院連農，[2]岐阜大院連農 岐阜大応生・食品命，[3]小林製薬(株)　中研）

2J11p18　乳タンパク質のヒトロタウイルス感染阻害メカニズムの比較

17:26 ○稲垣瑞穂，大野翔平，山田佳太[1]，矢部富雄，鈴木　徹[2]，高橋　毅[3]，中村吉孝[3]，松田　幹[4]，中込とよ子[5]，中込　治[5]，金丸義敬（岐阜大応生・食品生命，[1]香川大・医，[2]岐阜大院連農，[3](株)明治・研究本部，[4]名古屋大院・生命農，[5]長崎大院・医歯薬総合）

2J11p19　ロタウイルス下痢症に対するチーズ製造時副産物の in vivo 評価

17:37 ○加藤浩平，桂　知弘，稲垣瑞穂，中村吉孝[1]，高橋　毅[1]，矢部富雄，金丸義敬（岐阜大・応生，[1](株)明治　研究本部）

2J11p20　腸内細菌 Enterococcus faecalis による脱顆粒抑制のメカニズム

17:48 ○伊藤朋子，高橋恭子，笠倉和巳，鴨井大樹，伊藤喜久治[1]，百瀬愛佳[1]，細野　朗，上野川修一（日大・生資，[1]東大院・農生）

J12 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―生理機能 – 免疫，神経，内分泌―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2J12a01　UV 照射ヘアレスマウスへのヒアルロン酸投与による皮膚状態改善効果

9:00 ○川田千夏，渡辺睦人，野村義宏，釣木隆弘[1]，栗原　仁[1]，木村　守[1]（農工大，[1]キューピー(株)）

2J12a02　UV 照射ヘアレスマウスへのヤマブドウ抽出物投与による皮膚状態改善効果

9:11 ○川原美紗江，渡部睦人，野村義宏，高橋　亨[1]，小浜恵子[1]，江見　崇[2]，山下和彦[2]，長澤孝志[3]（農工大･硬蛋白質利用研究施設，[1]岩手県工技センター，[2]ヤエガキ醗酵技研(株)，[3]岩手大・農学部）

2J12a03　ビフィズス菌含有乳酸菌飲料摂取による成人女性に対する肌状態改善作用および整腸作用

9:22 ○米澤寿美子，　山本有紀[1]，　豊澤聖子[1]，　清水(肖)金忠，八重島智子，岩附慧二，古川福実[1]（森永乳業･食基研，[1]和医大･医）

2J12a04　パイナップル果実由来グルコシルセラミドが乾燥肌モデルマウスの皮膚機能に与える影響とその作用機構

9:33 ○湯浅弘樹，西谷洋輔[1]，野嶋　潤[2]，桑原浩誠[2]，水野雅史（神戸大院・農，[1]神戸大・自然先端，[2]丸善製薬(株)・研究開発）

2J12a05　コラーゲンペプチド経口摂取時の皮膚へのペプチド移行性評価

9:44 ○市川聡美，大原浩樹，伊藤恭子，大庭知慧，河端恵子，古賀仁一郎（株式会社　明治・食機能科学研究所）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2J12a06　生もと乳酸菌による皮膚炎症抑制効果

10:05 永汐祐紀，　竹之下柳一朗，　渡辺敏郎[1]，　石　知史[1]，高橋俊成[2]，近藤紗代[2]，鈴木卓弥，○田辺創一（広島大院生物圏，[1]ヤエガキ醗酵技研，[2]菊正宗酒造総研）

2J12a07　生もと乳酸菌を用いた米ヌカ発酵液のヒアルロン酸産生促進効果

10:16 ○近藤紗代，増田康之，高橋俊成，渡辺敏郎[1]，石　知史[1]，田辺創一[2]，溝口晴彦（菊正宗酒造総研，[1]ヤエガキ醗酵技研，[2]広島大院生物圏）

2J12a08　食餌性スフィンゴ脂質の皮膚バリア向上作用の機構解明

10:27 ○段　晶晶，菅原達也，間　和彦[1]，平田　孝（京大院･農，[1]日本製粉(株)）

2J12a09　牛乳由来の極性脂質がマウス毛包構成細胞群の活性に及ぼす影響

10:38 ○澤田　拓，小田洋三[1]，今野　円，小林　謙，玖村朗人（北大院農，[1]北大農）

2J12a10　Val-Pro-Pro，Ile-Pro-Pro を含む食品の摂取が冷え性に与える影響

10:49 ○野中敦子，中村哲平，大木浩司，池谷敏郎[1]（カルピス(株)発酵応用研究所，[1]池谷医院）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2J12a11　抗老化乳酸菌の探索とその機能性に関する研究

11:10 ○原田額郎[1]，Pawat Pattarawat[2]，松本貴之[3]，森松文毅[3]，片倉喜範[2,4]（[1]九大院・シス生，[2]九大院・生資環，[3]日ハム・中研，[4]九大院・農院）

2J12a12　大豆イソフラボンの美白効果

11:21 ○上野省一，鳥居宏右（(株)ノエビア　研究開発部）

2J12a13　カルノソールとロットレリンのメラニン合成阻害作用に関する研究

11:32 ○白杉一郎，榊原陽一[1]，山崎正夫[1]，西山和夫[1]，松井隆史，水光正仁[1]（(株)くらこん，[1]宮崎大・農・応生科）

2J12a14　植物アントシアニジンは骨破壊を抑制する

11:43 ○森脇佐和子，鈴木恵子[1]，井上文秀[2]，村松　昌，野村篤志[2]，新飯田俊平（長寿研･遺伝子蛋白質解析室，[1]昭和大歯･歯科薬理，[2]日本製薬工業(株)）

2J12a15　希少糖 D-プシコースの *C. elegans* 寿命延長効果

11:54 ○佐藤正資，砂古口博文，大石有紗，木下由香，藤沢俊樹，坂下健太，新谷知也[1]，大隈一裕[1]，何森　健[2]（香川大・農，[1]松谷化学工業(株)，[2]香川大・希少糖研究セ）

J12 会場　午後の部（14:00〜17:59）

食品―生理機能 – 免疫，神経，内分泌―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2J12p02　大豆サポニンの抗肥満活性に関する研究

14:00 ○飯塚正浩，白岩雅和（茨城大・農・食品生化）

2J12p03　大豆種子の栽培および保存条件の制御によるサポニン含量の変化

14:11 ○斉藤哲史，白岩雅和，窪田真子，常楽真由美，石川佳奈子，深澤厚子（茨城大・農）

2J12p04　サラシア属植物の α-グルコシダーゼ阻害活性成分およびその LC-MS 定量分析

14:22 ○森川敏生[1]，　三宅荘八郎[2]，　赤木淳二[2]，　二宮清文[1]，Pongpiriyadacha Yutana[3]，吉川雅之[1]，村岡　修[1,2]（[1]近畿大薬総研，[2]近畿大薬，[3]Rajamangala 工科大）

2J12p05　サラシア属植物に含まれるスルホニウム化合物の血糖上昇抑制効果

14:33 ○赤木淳二[1]，森川敏生[2]，二宮清文[2]，三宅荘八郎[1]，吉川雅之[2]，村岡　修[1,2]（[1]近畿大薬，[2]近畿大薬総研）

2J12p06　大麦若葉末の血中コレステロール低下作用

14:44 ○友澤　寛，鍔田仁人，入野信人[1]，近藤隆一郎[2]，古賀良太[1]（(株)大地の力研究所，[1](株)アサヒ緑健，[2]九州大学農学研究院）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2J12p07　イソマルチュロースの骨格筋における糖取り込み促進作用

15:05 ○笹川克己，峰尾　茂，佐藤眞治[1]，西田浩志[1]，小西徹也[1]，平山匡男（ブルボン・健康科学研，[1]新潟薬大・応生）

2J12p08　甘草由来プレニルイソフラバンであるグラブリジンによる筋肉細胞の糖代謝調節作用

15:16 ○澤田圭介，中川　格[1]，芦田　均（神戸大院・農，[1]株式会社カネカ・QOL 事業部）

2J12p09　ローヤルゼリー由来中鎖脂肪酸の AMP キナーゼ活性化作用とその機序解明

15:27 ○滝川雅仁，曽我　実，熊谷　綾，平田晴実，上田　学[1]，芦田　均[1]，津田孝範（中部大・応生，[1]神戸大院・農）

2J12p10　甘藷若葉「すいおう」の血糖値上昇抑制作用と GLP-1 分泌への影響

15:38 ○永峰里花，上野　栞，友澤　寛，鍔田仁人，比良　徹[1]，原　博[1]，津田孝範[2]（(株)東洋新薬，[1]北大院･農，[2]中部大･応生）

2J12p11　マウス脂肪細胞の脂肪代謝に対するカテキンおよびカフェインの影響

15:49 ○杉浦千佳子[1,2]，茶山和敏[2]（[1]浜松大・健プロ，[2]静岡大・創造大学院）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2J12p12　シナモン熱水抽出物の血糖低下作用の解析
16:10　◦沈　燕，本間夏実，細野　崇，関泰一郎（日大・生物資源）

2J12p13　シナモンの 2 型糖尿病予防効果に関する研究
16:21　◦本間夏実，阿部麻衣子[1]，早乙女翠[1]，沈　燕，細野　崇，有賀豊彦，関泰一郎（日大院・応生科，[1]日大・生命化）

2J12p14　発芽玄米由来のアシル化ステロール配糖体，ステロール配糖体が糖尿病モデルマウスに及ぼす影響
16:32　◦野中翔太[1]，　菊澤美沙子[2]，　関根　瞳[2]，　大路拓巳[3]，佐藤明日香[3]，佐藤友宏[3]，池田克幸[3]，小笠原理美[3]，髙安美里夏[3]，臼杵靖剛[4]，Robert K. Yu[4]，伊藤幸彦[1]，細野　崇[2,3]，有賀豊彦[2,3]，関泰一郎[2,3]（[1](株)ファンケル・総研，[2]日大院・生資科・応生科，[3]日大・生資科・生命化，[4]Medical College of Georgia）

2J12p15　マイタケ抽出物摂取によるマウスおよびラットの脂質代謝への影響
16:43　◦川面香奈，西田浩志[1]，佐藤浩二[2]，田中昭弘，鈴木　蘭，佐藤眞治[1]，小西徹也[1]（株式会社雪国まいたけ，[1]新潟薬大　応生科，[2]新潟薬大　薬）

2J12p16　2 型糖尿病モデルマウスに対する柿由来タンニンの効果
16:54　◦松本健司，横山慎一郎[1]（石川県大･生資環，[1]岐阜産技セ･環化）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2J12p17　骨格筋細胞の糖取り込みに対する田七人参由来ダンマラン系トリテルペンの作用解析
17:15　◦岩本　拓，一柳直希，小野知二，岩崎英明，大寺基靖，眞鍋康子[1]，藤井宣晴[1]（ライオン(株)・生命科学研究所，[1]首都大学東京院・人間健康科学研究科）

2J12p18　コーヒー摂取が食餌誘導性肥満モデルマウスにおけるインスリン感受性に及ぼす影響
17:26　◦江頭健二，高橋祥子，阿部啓子，加藤久典[1]（東大院･農，[1]東大・総括）

2J12p19　Anti-diabetic effect of aspalathin and their modes of action in vitro
17:37　◦Myoungjin Son，Yutaka Miura，Kazumi Yagasaki（Applied life science）

2J12p20　糖尿病に対するダイゼインとエクオールの作用解析
17:48　◦古橋慶亮，伊藤克晃，長岡真聡，三浦　豊，矢ヶ崎一三（農工大）

J13 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―生理機能 – 酸化，抗酸化―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2J13a01　リン脂質過酸化物により劣化した分化 PC12 細胞への各種抗酸化剤の効果
9:00　◦山中裕佳子，羽柴澄子，山田　瞳，酒井芙弥子，川口真規子[1]，土井裕司（武庫川女子大･食物栄養，[1]甲子園大･フードデザイン）

2J13a02　神経変性疾患関連タンパク質における脂質過酸化に由来する翻訳後修飾の解析
9:11　◦日坂真輔[1]，林　佳美[2]，田嶋翔一[1]，吉村知優里[1]，赤津裕康[3]，永井(社本)雅代[4,5]，加藤陽二[6]，能勢充彦[1]，丸山和佳子[4]，大澤俊彦[7]（[1]名城大･薬，[2]名大院･生命農学，[3]福祉村病院，[4]長寿医療センター，[5]JSPS 特別研究員 RPD，[6]兵庫県立大学・環境人間，[7]愛知学院大学・心身科学）

2J13a03　皮膚モデル培養細胞への UVA 照射による過酸化コレステロールの生成と膜マイクロドメインへの分布
9:22　◦中村俊之，松井直子，島田祥子，河合慶親[1]，寺尾純二（徳大院・HBS 研究部，[1]名大院・農）

2J13a04　脂質過酸化を誘導したラットへの過酸化物還元活性を有する乳酸菌の投与効果
9:33　◦渡邊昭夫[1,2]，　安富葉子[3]，　室田佳恵子[3]，　古川　令[4,2]，佐藤純一[2]，新村洋一[2]，寺尾純二[3]（[1]大洋香料，[2]東農大応生科・バイオ，[3]徳島大院・ヘルスバイオサイエンス，[4]古川リサーチ & コンサルティング）

2J13a05　親油性 ORAC 測定法の改良による分析精度の向上
9:44　◦渡辺　純，竹林　純[1]，沖　智之[2]，山崎光司[3]，安井明美，石川(高野)祐子（農研機構食総研，[1]国立健栄研，[2]農研機構九州研，[3]太陽化学）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2J13a06　ESR を用いた脂溶性抗酸化物質の評価法の開発
10:05　◦高橋有志，一守康史[1]，岡野和史[2]，後藤浩文，五十嵐友二（日本食品分析セ，[1]ギガテック(株)，[2](株)JEOL RESONANCE）

2J13a07　ビタミン C 欠乏 SMP30/GNL ノックアウトマウスへの経口投与によるオリーブオイルポテトチップス「オリービー」の抗酸化活性の評価
10:16　◦佐久間塁，近藤嘉高[1]，市澤　恵，石原克之，久保美沙子，半田節子[1]，麦田裕之，丸山直記[1]，古賀秀徳，石神昭人[1]（カルビー株式会社，[1]東京都健康長寿医療センター・老化制御）

2J13a08　トコトリエノールによる細胞分裂寿命の延長
10:27　◦永塚貴弘，仲川清隆[1]，西田浩志，倉田忠男，宮澤陽夫[1]（新潟薬大・応生科，[1]東北大院農・機能分子解析）

2J13a09　リコピンによる皮膚中抗酸化物質産生の誘導
10:38　◦久野江梨子，小田由里子，植田文教（富士フイルム株式会社）

2J13a10　亜臨界水抽出による新規嗜好性緑茶の開発に関する化学的研究
10:49　◦宮下知也，衛藤英男[1]（静大創造，[1]静大農）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2J13a11　コーヒー豆の亜臨界抽出に関する研究
11:10　◦加藤久喜，衛藤英男[1]（静大院・農，[1]静大・農）

2J13a12　アントシアニジンの膜脂質過酸化抑制作用
11:21　森定敬雅，神林大樹，◦原口博行（福山大・生命工）

2J13a13　サルナシ(*Actinidia arguta*)果皮の抗酸化成分(2)
11:32　◦松坂裕子，川端　潤[1]（藤女大・食物栄養，[1]北大院農）

2J13a14　高感度分析機器を用いた沖縄県産柑橘類中有効成分の分析比較
11:43　◦當山瑛子，神谷志織[1]，藏屋英介[2]，濱田泰輔[3]，池松真也[3]（沖縄高専　創造システム工学専攻　生物資源工学コース，[1]静大農学部，[2]沖縄高専　技術支援室，[3]沖縄高専　生物資源工学科）

2J13a15　チオレドキシン高含有酵母抽出物による細胞傷害保護効果および口腔内炎症予防効果
11:54　◦伊井野貴史，山下裕輔，堀江健二，金　武祚（(株)ファーマフーズ）

J13 会場　午後の部（14:00〜17:59）

食品―生理機能 – 酸化，抗酸化―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2J13p02　オウゴンエキスの美白効果とその作用機序の解明
14:00　◦工藤倫子，小川達也，小林久美子，内藤健太郎（(株)ディーエイチシー）

2J13p03　セサミン・エピセサミンの代謝および作用メカニズムの比較
14:11　◦安田佳織，生城真一，若山周人[1]，伊藤俊将[1]，山本恵子[1]，鎌倉昌樹，太田美穂[2]，榊　利之（富山県大･工，[1]昭和薬大･創薬，[2]相愛大・人間）

2J13p04　Effective extraction of antioxidants from mangosteen and its utilization for processed food
14:22　◦SUKATTA UDOMLAK[1,2]，　Makiko Takenaka[1]，Kazuko Nanayama[1]，Hiroshi Ono[1]，Seiichiro Isobe[1]（[1]NFRI，[2]Kasetsart University）

2J13p05　ベトナム産植物 Tram に含まれる抗酸化成分の分析および UV-A 照射への効果

14:33　°能見祐理，建守聡子[1]，清水　咲[2]，大塚　譲（お茶大・生環研セ，[1]お茶大院・ライフ，[2]お茶大生科・食物栄養）

2J13p06　乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* YIT 2001 が産生する LDL 酸化抑制成分

14:44　°楠原史朗，佐藤　直，横井稚恵，池邨治夫，外谷英嗣，原田勝寿，木村一雅，宮崎幸司，伊藤雅彦（ヤクルト中研）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2J13p07　ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide の白血病細胞における分子標的の解明

15:05　°須田　峻，木村広慈[1]，細野　崇[1]，細野(深尾)友美[2]，荻原　淳[3]，有賀豊彦[1]，関泰一郎[1]（日大院・生資科・応生科，[1]日大院・生資科・応生科，[2]お茶大・生環セ，[3]日大・生資科・生命化）

2J13p08　Diallyl trisulfide が薬物代謝酵素に及ぼす影響

15:16　°木村広慈，中濱佑亮[1]，須田　峻，渡辺師成[1]，今井孝俊[1]，細野　崇，細野(深尾)友美[2]，有賀豊彦，関泰一郎（日大院・生資科・応生科，[1]日大・生資科・生命化，[2]お茶大生環セ）

2J13p09　大豆サポゲノールによる Nrf2-ARE 経路の活性化作用

15:27　°片山　茂，久志本尚子，中村宗一郎（信州大・農）

2J13p10　酸化ストレスマーカー 8-OHdG の生成に対する黒大豆種皮抽出物の阻害効果

15:38　°張　天順，保田倫子[1]，中村俊之[1]，芦田　均（神戸大院・農，[1]神戸大・自然科学）

2J13p11　開発したウニ魚醤の抗酸化性と香りの特性

15:49　°原田和樹，宮崎泰幸，和田律子，前田俊道，島田和子[1]，松井健二[2]（水大校・食科，[1]山口県大・看護栄養，[2]山口大・院・医学系）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2J13p12　チャガに含まれる syringic acid の細胞過酸化水素感受性増感作用

16:10　°布施佑樹，中島裕希，西田浩志，小西徹也（新薬大・応用生命）

2J13p13　食品由来ペプチドの in vitro 系および食品モデル系での抗酸化活性

16:21　°朴　恩榮，山田聡子，中村考志，佐藤健司（京府大院・生環）

2J13p14　茶葉のオゾン処理によるポリフェノール類の強化

16:32　°渡辺祥子，小川剛史[1]，榊原啓之，下位香代子，小林栄人[2]，中村順行[2]，吉川(小林)知子[3]，小林裕和（静県大院・生活健康，[1]しずおか産業創造機構，[2]静岡県立農林技術研究所茶業研究センター，[3]ケーイーコーポレーション）

2J13p15　カテキンの自動酸化反応による活性酸素種の発生に及ぼす遊離鉄イオンの抑制効果

16:43　°井上　司，濱本勝美，白井　理，加納健司（京大院農・応用生命）

2J13p16　グルコシノレートによるカテキン溶液の褐変化抑制作用

16:54　°横山征也，宇田　靖，橋本　啓（宇都宮大・農）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2J13p17　フラボノイドの抗糖尿病効果とメタボローム解析

17:15　°五十嵐喜治，倉兼静江，臧　延青，及川　彰[1]，曽我朋義[2]（山形大農，[1]理研 PSC，[2]慶応先端生命研）

2J13p18　組織内微小領域における緑茶カテキンの二次元可視化に向けた質量分析イメージング法の開発

17:26　°萩原立春，藤村由紀[1]，金　充喜，行平大地，山口　歩，三浦大典[1]，割石博之[1]，山田耕路，立花宏文（九大院農院･生機科，[1]九大レドックスナビ）

2J13p19　炊飯米を添加した熱水抽出緑茶飲用後の血中エピガロカテキンの増加

17:37　°物部真奈美，江間かおり，徳田佳子，山本(前田)万里（農研機構・野茶研）

2J13p20　フラボノイド類によるオートファジー誘導機構の解析

17:48　石原朋恵，寺尾純二，柴田貴広[1]，内田浩二[1]，°河合慶親[1]（徳島大院ヘルスバイオサイエンス，[1]名大院生命農・応用分子生命科）

J14 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品化学 – 糖質，脂質―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2J14a01　Structural characterization of the oligosaccharides in Yak colostrum and milk

9:00　°Epi TAUFIK, Narapati Dahal[1], Ganzorig Khuukhenbaatar[2], Kenji Fukuda, Tadasu Urashima（OUAVM, [1]NCAH-Bhutan, [2]SCVL-Mongolia）

2J14a02　ヘキソースの加熱処理により合成した新規異性体蔗糖の構造解析

9:11　°山森　昭，福士江里[1]，岡田秀紀，川添直樹，上野敬司[2]，小野寺秀一[2]，川端　潤[1]，塩見徳夫[2]（大高酵素(株)・総合研，[1]北大院農，[2]酪農大院・食品栄養科学）

2J14a03　固相抽出法を用いた食品中のサケ鼻軟骨由来プロテオグリカン定量法の開発

9:22　小泉英誉，永澤桂子，田中真実，岩間直子，°阿部　馨（(地独)青森県産技セ・弘前研）

2J14a04　アミノ酸分析計を用いた食品中のサケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの定量法の開発

9:33　田中真実，小泉英誉，永澤桂子，°岩間直子，阿部　馨（(地独)青森県産技セ・弘前研）

2J14a05　食品成分に誘導される細胞表面ヘパラン硫酸糖鎖構造の変化

9:44　°中野由梨，永見圭太郎，金丸義敬，矢部富雄（岐阜大院・応生科・資源生命）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2J14a06　ペクチンを認識するヒト小腸由来タンパク質の同定

10:05　°本田明里，富田恭子[1]，中村　綾，金丸義敬[1]，加藤宏治[2]，森雄一郎[3]，山元宏貴[3]，伊神孝生[3]，矢部富雄[1]（岐阜大院応生・資源生命，[1]岐阜大応生・食品生命，[2]修文大，[3]三基商事(株)）

2J14a07　抗グリコーゲンモノクローナル抗体における糖特異性の比較解析

10:16　°信田衣里[1]，鶴田(中村)祥子[2]，保田倫子[2]，中村俊之[2,3]，古屋敷隆[4]，角谷　亮[4]，高田洋樹[4]，芦田　均[5]（[1]神戸大・農，[2]神戸大院・自然科学，[3]徳大院・HBS 研究部，[4]江崎グリコ(株)・健康科学研，[5]神戸大院・農）

2J14a08　消化吸収を考慮した酵素合成グリコーゲン(ESG)の機能解明

10:27　°保田倫子[1]，古屋敷隆[2]，角谷　亮[2]，高田洋樹[2]，中村俊之[1,3]，鶴田(中村)祥子[1]，芦田　均[4]（[1]神戸大･自然科学，[2]江崎グリコ(株)･健康科学研，[3]徳大院・HBS 研究部，[4]神戸大院・農）

2J14a09　フェノール酸へのルチノース鎖の導入による抗ウィルス効果の改善

10:38　°山内雄貴，片山　茂，加藤　幸，真壁秀文，中村宗一郎（信州大院・農）

2J14a10　大豆から単離・精製した DNA 合成酵素阻害活性物質

10:49　°水品善之，高橋義洋[1]，竹内倫文[2]，栗山磯子，菅原二三男[2]，吉田弘美（神戸学院大栄養・栄養，[1](株)小倉屋柳本・開発研，[2]東理大院理工・応生科）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2J14a11　エリスリトールが *Porphyromonas gingivalis* のメタボロームに及ぼす影響

11:10　°久保庭雅恵，橋野恵衣，Alghamdi Samar，長　洋[1]，天野敦雄（大阪大・歯，[1]三菱化学フーズ）

2J14a12　酵素による部分分解糖脂質が小麦粉食品に及ぼす影響

11:21 ○増子朝貞，元田兼一郎，長　　洋，深沢徹也（三菱化学フーズ(株)）

2J14a13　混練法により作製したシクロデキストリン水飴賦形剤を用いたパルミチン酸レチノール包括粉末の特質

11:32 ○小枝貴弘，和田　正，吉井英文[1]（フジ日本精糖(株)），[1]香川大農）

2J14a14　糖脂肪酸エステル，リシン結合澱粉の創出

11:43 ○児島結花里，服部　誠，好田　正，神山典樹[1]，市川　淳[1]，高橋幸資（東京農工大・農学府，[1]日本ハム・中研）

2J14a15　オレイン酸結合による澱粉の改質

11:54 ○安渡加奈，服部　誠，好田　正，丹尾式希[1]，高橋幸資（東京農工大・農，[1]味の素イノベーション研）

J14 会場　午後の部（14:00～17:37）

食品―食品化学 – 糖質，脂質―

p02～p06 発表者の接続時間④ 13:50～14:00

2J14p02　ミルクチョコレートに含まれる遊離脂肪酸の定性および定量分析

14:00 ○鈴木大介，吉松大介，中村　愛，釜阪　寛，米谷　俊，栗木　隆，伏木　亨[1]（江崎グリコ(株)健康科学研究所，[1]京大院農・食品生物）

2J14p03　ミルクチョコレートに含まれる遊離脂肪酸と嗜好性の関係

14:11 ○吉松大介，鈴木大介，中村　愛，山崎祥史[1]，釜阪　寛，米谷　俊，栗木　隆，伏木　亨[2]（江崎グリコ株式会社 健康科学研究所，[1]江崎グリコ株式会社 研究企画室，[2]京大院・農）

2J14p04　チーズの苦味抑制活性とその起因となる遊離脂肪酸の解析

14:22 ○本間亮丞[1]，山下治之[1]，舟木淳子[2]，上田玲子[1]，櫻井敬展[1,3]，石丸喜朗[1]，阿部啓子[1]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]福岡女子大・国際文理，[3]日清食品 HD・食総研）

2J14p05　アワビ肝に存在する構成和脂肪酸・ステロールの同定

14:33 ○川島英城（岩手県立大・短大部）

2J14p06　Wax, policosanol and long-chain aldehyde of sugarcane(Saccharum officinarum L.)of different cultivars

14:44 ○Yonathan ASIKIN, Makoto Takahashi[1], Naoto Hirose[2], Kensaku Takara[1], Koji Wada[1]（United Graduate School of Agricultural Science, Kagoshima University, [1]Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, [2]Okinawa Prefectural Agricultural Research Center）

p07～p11 発表者の接続時間⑤ 14:55～15:05

2J14p07　柿ワイン残渣添加飼料を給餌したアユの脂肪酸組成と官能評価

15:05 ○山澤広之，桑田知宣[1]，山澤和子，寺嶋昌代，野澤義則（東海学院大食健康，[1]岐阜県河川環境研）

2J14p08　低温馴化エノキタケ子実体由来脂溶性物質の機能評価とその構造解析

15:16 ○田村淑恵，加藤静香，片倉啓雄，河原秀久，竹森　洋[1]，小出芳栄[2]（関西大化生工，[1]NIBIO，[2]一栄）

2J14p09　エミューオイルの機能性に関する研究

15:27 ○鈴木悠士，加藤由麻，妙田貴生，桜井智野風[1]，藤森　嶺，戸枝一喜，西澤　信（東農大生物産業・食香，[1]東農大生物産業・アクア）

2J14p10　マウス肝臓時計遺伝子リセットに魚油が与える影響

15:38 ○平尾彰子，糸川未紗，長浜敬樹，大津定治，池田祐子，柴田重信（早稲田大 先進理工）

2J14p11　高脂肪食投与による脂肪肝形成に伴う肝細胞 Vanin-1 の発現亢進

15:49 ○吉崎隆之，本村　亘[1]，高橋伸彦[2]，粂井志麻[1]，水上裕輔[1]，張　成宰[1]，高後　裕[1]（鹿児島大・産学官連携推進機構，[1]旭川医大・医，[2]北海道医療大・歯）

p12～p16 発表者の接続時間⑥ 16:00～16:10

2J14p12　柚子由来ナリンギンの肥満予防機能に関する研究

16:10 馬場美那子，室井啓佑，植松大樹，石井宏和，由井一希，○長田恭一，東　知宏，飯田純久[1]（明治大・農・農化，[1]東洋精糖）

2J14p13　β-クリプトキサンチンは表皮においてヒアルロン酸およびアクアポリン 3 産生を促進する

16:21 ○白倉義之，高柳勝彦，向井克之（ユニチカ(株)　中央研究所）

2J14p14　飲料による口腔内油脂残存感の解析

16:32 ○林由佳子，木﨑諭希，村　絵美[1]，呉　性姫，松宮健太郎，松村康生，永井　元[1]（京大院農・農学，[1]サントリービジネスエキスパート）

2J14p15　貯蔵魚肉および畜肉の 4-ヒドロキシアルケナール生成におよぼす Fe イオン添加

16:43 ○境　　正，押川聖胤（宮崎大農・応生科）

2J14p16　リノール酸メチルの自動酸化におけるフラーレン C_{60} 反応生成物

16:54 ○門脇章夫，岩本悟志，山内　亮（岐阜大院連農･生資科）

p17～p18 発表者の接続時間⑦ 17:05～17:15

2J14p17　過酸化脂質生成物 4-ヒドロキシ-2,6-ドデカジエナールによるタンパク質の修飾

17:15 ○浅野　亮，平野啓太，本多和也，柴田貴広，河合慶親，内田浩二（名大院生命農・応用分子生命科）

2J14p18　LC/MS/MS を用いた 4-ヒドロキシ-2-ノネナール-ヒスチジン付加体の定量

17:26 ○平野啓太，柴田貴広，河合慶親，内田浩二（名大院生命農・応用分子生命科）

J15 会場　午前の部（9:00～12:05）

食品―食品化学 – その他―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

2J15a01　SHR の血圧に及ぼす梅酢ポリフェノールの作用(第 2 報)

9:00 ○山崎晋平，岸田邦博，岸岡史郎[1]，堀西朝子，矢野史子，山西妃早子[2]，三谷隆彦（近畿大・生物理工，[1]和医大，[2]和歌山県工技セ）

2J15a02　SHR の血圧に及ぼす梅酢ポリフェノールの作用(第 3 報)

9:11 ○和木田直希，部屋雄一，岸田邦博，岸岡史郎[1]，山崎晋平，川端伴顕，矢野史子，堀西朝子，山西妃早子[2]，三谷隆彦（近畿大・生物理工，[1]和医大　薬理，[2]和歌山県工技セ）

2J15a03　梅酢ポリフェノール画分の化学的性質(第 4 報)

9:22 ○堀西朝子，川端伴顕，岸田邦博，多中良栄[1]，森めぐみ[1]，前田育克[1]，山西妃早子[1]，赤木知裕[1]，矢野史子，三谷隆彦（近畿大・生物理工，[1]和歌山県工技セ）

2J15a04　梅酢ポリフェノール画分の化学的性質(第 5 報)

9:33 ○岸田邦博，田中あゆみ，川端伴顕，野村英作[1]，堀西朝子，山西妃早子[2]，　髙垣昌史[2]，　多中良栄[2]，　森めぐみ[2]，　前田育克[2]，赤木智裕[2]，矢野史子，三谷隆彦（近畿大・生物理工，[1]和歌山県高専，[2]和歌山県工技セ）

2J15a05　沖縄産野生種ベリーのアントシアニン分析と抗酸化活性

9:44 ○久保田通代，石川千絵，杉山靖正[1]，福本修一[2]，宮城　健[3]，熊澤茂則（静岡県大・食品栄養，[1]鹿児島大・水産，[2]株式会社ポッカコーポレーション，[3]沖縄県森林資源研究センター）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

2J15a06　紅茶テアフラビン類の蛋白質に対する反応性

10:05 ○林　美香，石井剛志，平松未宇，中山　勉（静岡県大・食品栄養）

2J15a07　骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少における equol 鏡像異性体の効果の比較

10:16 ○君羅好史，勝間田真一，石見佳子[1]，上野友美[2]，内山成人[2]，鈴木和春，上原万里子（東農大・応生・栄養，[1]国立健康・栄養研・食品保健機能，[2]大塚製薬(株)・佐賀栄養製品研）

2J15a08　加熱調理によるアピオスの主要イソフラボン含量の変化
10:27　◦奈良一寛（東京家政学院大・現代生活）
2J15a09　ポリフェノールとシステイン誘導体との DPPH ラジカルによる酸化反応（ポリフェノールと生体成分チオールとの化学相互作用研究 I）
10:38　◦藤本　彩，増田俊哉（徳島大院・総合）
2J15a10　チオール物質存在下でのカフェ酸，ジヒドロカフェ酸の酸化・抗酸化反応（ポリフェノールと生体成分チオールとの化学相互作用研究 II）
10:49　藤本　彩，◦稲井美由紀，中村光裕，増田俊哉（徳島大院・総合）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2J15a11　大腸菌と黄色ブドウ球菌におけるカテキンと相互作用する菌体表層タンパク質の同定
11:10　◦島谷佳奈果，中山素一，重宗尚文，継国孝司，人見　潤，徳田　一，倉八正篤[1]，野中　愛[1]，宮本敬久[1]（花王(株)・安全評価研，[1]九大院・農）
2J15a12　カテキン類のベロ毒素活性阻害に関する研究
11:21　◦豊福星洋，木村悦子，立木成美，中山素一[1]，重宗尚文[1]，人見　潤[1]，徳田　一[1]，本城賢一，宮本敬久（九大院・農，[1]花王(株)・安全評価研）
2J15a13　NMR を用いたテアフラビンとシクロデキストリンとの相互作用解析
11:32　◦西澤正人，黒田哲矢，杉山靖正[1]，熊澤茂則（静岡県大院，[1]鹿児島大）
2J15a14　内在性ポリフェノール成分による精麦品質の評価
11:43　◦神山紀子（農研機構・作物研）
2J15a15　タンパク質固定化アフィニティークロマトグラフィーによるプロアントシアニジンとエラジタンニンの迅速な分離調製
11:54　◦古内　亮[1,2]，松嶋全人[1]，横山忠幸[1]，平山匡男[1,2]（[1]ブルボン・健康科学研，[2]新潟薬大・応生）

J15 会場　午後の部（14:00〜18:10）

食品―食品化学 – その他―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2J15p02　梅酢ポリフェノール画分の化学的性質（第 6 報）
14:00　◦高垣昌史，山西妃早子，野村英作[1]，岸田邦博[2]，堀西朝子[2]，多中良栄，森めぐみ，前田育克，赤木知裕，矢野史子[2]，三谷隆彦[2]（和歌山県工技セ，[1]和歌山県高専，[2]近畿大・生物理工）
2J15p03　梅果実中の核の化学的性質について
14:11　◦川端伴顕，堀西朝子，多中良栄[1]，森めぐみ[1]，前田育克[1]，高垣昌史[1]，山西妃早子[1]，赤木知裕[1]，岸田邦博，矢野史子，三谷隆彦（近畿大・生物理工，[1]和歌山県工技セ）
2J15p04　梅酢ポリフェノールの消化管吸収に関する研究
14:22　◦田中あゆみ，岸田邦博，川端伴顕，矢野史子，堀西朝子，赤木友裕[1]，三谷隆彦（近畿大・生物理工，[1]和歌山県工技セ）
2J15p05　梅酢ポリフェノールの抗菌作用に関する研究
14:33　◦中林良彦，太田佳菜，川端伴顕，岸田邦博，堀西朝子，石井営次，池本重明[1]，稲葉伸也[2]，山西妃早子[1]，赤木知祐[1]，矢野史子，三谷隆彦（近畿大・生物理工，[1]和歌山県工技セ，[2]和歌山県農産物加工研）
2J15p06　有色素米登熟中の機能性成分の変化
14:44　岩間　巧，石井利行[1]，上野直也[1]，◦奥田　徹，廣瀬裕子[2]（山梨大・ワイン研，[1]山梨県総農技セ，[2]山梨大・教育）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2J15p07　イソチオシアネート熱分解物によるポリフェノールオキシダーゼ活性の抑制
15:05　◦橋本　啓，萩原めぐみ，渋江佳子，宇田　靖（宇都宮大・農）
2J15p08　スフィンゴシンキナーゼ阻害剤による緑茶カテキン EGCG 誘導性アポトーシスの増強
15:16　◦塚本俊太郎，黄　宇慧，鈴木貴視，上田直樹，山田耕路，立花宏文（九大院農院・生機科）
2J15p09　乳タンパク質カゼインによる茶飲料の渋味抑制機構の解析
15:27　◦御手洗晴日，石井剛志，北村実穂，中山　勉（静岡県大院・食品栄養）
2J15p10　ポリフェノールの渋味評価法の開発
15:38　◦石井剛志，渡辺紀和子，山田　弓，御手洗晴日，上園博美，山田　智[1]，中山　勉（静岡県大・食品栄養，[1]日油(株)）
2J15p11　発酵乳の嗜好性向上に与える乳酸菌および酵母の役割
15:49　◦川口恭輔，小谷　恵，中村英志[1]，前野正文（カルピス(株)・発酵応用研究所，[1]味の素(株)・イノベーション研究所・フロンティア研究所）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2J15p12　清酒の疎水性呈味化合物について
16:10　◦橋爪克己，伊藤俊彦，下橋美沙子，小北篤史，常盤野哲生，奥田将生[1]（秋田県大・生物資源，[1]酒総研）
2J15p13　動物行動学に基づいた間接的苦味マスキング効果の定量的解析
16:21　◦河合崇行，日下部裕子（農研機構）
2J15p14　甲州種ワインの苦味化合物の官能特性
16:32　◦斉藤史恵，山本祐梨子，恩田　匠[1]，久本雅嗣，奥田　徹（梨大・ワイン研，[1]山梨県工技セ）
2J15p15　ハバネロ系唐辛子（*Capsicum chinense*）の香気成分の解析
16:43　◦深見治一，尼岡大輝，尾張嘉平，矢野善久（京都学園大学）
2J15p16　ブラジル産グリーンプロポリスに含まれる辛味成分
16:54　◦秦　健敏，田澤茂実，太田象三，柳　美羅[1]，三坂　巧[2]，市原賢二（アピ株式会社　長良川リサーチセンター，[1]韓国食品研究院，[2]東大院農生科・応生化）

p17〜p21 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2J15p17　牛乳における溶存酸素とアミノレダクトンの関係性
17:15　◦勝野眞也，井澤　登，島村智子[1]，柏木丈拡[1]，受田浩之[1]（雪印メグミルク(株)，[1]高知大・農）
2J15p18　メイラード反応最終生成物メラノイジンのコク味への寄与
17:26　◦安田佳代，松本朋大[1]，渡辺寛人[1]，早瀬文孝（明治大農・農化，[1]明治大農・生命科）
2J15p19　3-deoxyxylosone 由来メイラード反応生成物の同定
17:37　◦石渡まどか，　臼井照幸[1]，　阿久津貴大，　渡辺寛人[2]，早瀬文孝（明治大農・農化，[1]昭和学院短大・ヘルスケア栄養，[2]明治大農・生命科）
2J15p20　グリセルアルデヒド修飾タンパク質の配列解析
17:48　◦山岸　理，臼井照幸[1]，増田喜恵，渡辺寛人[2]，早瀬文孝（明治大農・農化，[1]昭和学院短大・ヘルスケア栄養，[2]明治大農・生命科）
2J15p21　グアニジノ化合物によるグリセルアルデヒド由来グリケーション生成物の形成抑制
17:59　◦木村圭一，臼井照幸[1]，渡辺寛人[2]，早瀬文孝（明治大農・農化，[1]昭和学院短期大・ヘルスケア栄養，[2]明治大農・生命科）

J16 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品化学 – タンパク質，アミノ酸―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2J16a01　ウシラクトフェリンに対する数種のマウスモノクローナル抗体の作製
9:00　◦新本洋士，渡辺剛士，中村智代，川口　剛，今井大樹，柳田由美，冨田信一（玉川大・農）
2J16a02　Crystal structure of the major peanut allergen Ara h 1
9:11　◦Cerrone Cabanos，Hiroyuki Urabe，Mary Rose Tandang-

Silvas, Taro Masuda, Reiko Urade, Shigeru Utsumi, Bunzo Mikami[1], Nobuyuki Maruyama（Laboratory of Food Quality Design and Development, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji, Kyoto, Japan, [1]Laboratory of Applied Structural Biology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University）

2J16a03　エビアレルゲンタンパクのメイラード反応とアレルゲン性変化

9:22　◦金澤圭二，Andreas L. Lopata[1]，菰田俊一（宮城大学，[1]James Cook university）

2J16a04　タンパク質工学的手法による β-ラクトグロブリン(BLG)の免疫原性の低減化

9:33　◦遠藤倫生，石井ケイ慧，岩本　拓[1]，清水　誠[1]，戸塚　護[1]，服部　誠（東農工大院農・応生化，[1]東大院農生科・応生化）

2J16a05　ε-ポリリシンとの複合体化による β-ラクトグロブリンの機能改変

9:44　◦清水麻美，好田　正，高橋幸資，服部　誠（東京農工大院・農）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2J16a06　米の低アレルゲン化に対する浸漬溶液および酵素処理の効果

10:05　◦安田果倫，神川尚大，貝塚千尋，中村静佳[1]，深石光男[1]，赤尾　真，熊谷日登美（日大・生資科・生化，[1]大塚薬品）

2J16a07　ラクトフェリン及びその活性ペプチドの抗菌活性を増強する乳タンパク質(MR15)の同定

10:16　◦村田麻衣，若林裕之，山内恒治，樋田知宏，岩附慧二（森永乳業食基研）

2J16a08　イネ由来抗菌タンパク質の同定とヒト病原菌に対する抗菌活性の評価

10:27　◦落合秋人[1,2]，原田　計[1]，柴田一駿[2]，三ツ井敏明[1,3]，田中孝明[1,2]，谷口正之[1,2]（[1]新潟大院・自然科学系，[2]新潟大・工，[3]新潟大・農）

2J16a09　ラクトパーオキシダーゼシステムを含有する凍結組成物の口腔内病原菌に対する抗菌活性および保存安定性

10:38　◦中野　学，新光一郎，山内恒治，樋田知宏，岩附慧二，小川康一[1]，弘中祥司[2]（森永乳業食基研，[1]クリニコ，[2]昭和大・歯）

2J16a10　カゼイン由来ペプチドの ACE および DPP-4 阻害活性検討

10:49　◦越智大介，桜井琢磨，山田明男，樋田知宏，岩附慧二（森永乳業食基研）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2J16a11　クマモリシンによる魚鱗の分解とその分解産物の DPP-IV 阻害活性

11:10　◦尾山　廣，井上直樹[1]，小泉聖子[1]，杉原富人[1]，居場嘉教，芳本　忠（摂南大・理工，[1]新田ゼラチン・ペプチド開発部）

2J16a12　Brie Cheese 分離菌 GG66A 株由来 Glutamyl aminopeptidase の精製と性質

11:21　◦伊藤淳雄，山里一英，前橋健二，柏木　豊（東農大院･醸造）

2J16a13　Western blotting detection of granule-bond starch synthase I and its application in examining the nonglutinous cereals

11:32　◦Gang-hua Lang, Yukari kagiya, Kazumi Kitta National Food Research Institute）

2J16a14　米糠タンパク質の構造と機能性に対する加熱処理の影響

11:43　◦関　璟韜，虎谷康平，高井龍之介，永沼孝子，小川智久，村本光二，毛利　哲[1]，藤井智幸[2]，Hyun Chi[3]，Seong-Jun Cho[3]（東北大院・生命，[1]宮城県産技総セ，[2]東北大院農，[3]CJ Foods R & D）

2J16a15　タンパク質とポリマーに結合したカルボキシル基との相互作用に及ぼす pH の影響-カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂によるタンパク質の脱アミド化に関連して-

11:54　◦中西良博，清水詩織，伊地知南，赤尾　真，熊谷　仁[1]，熊谷日登美（日大・生資科・生化，[1]共立女大・家政・食物栄養）

J16 会場　午後の部（14:00〜17:59）

食品―食品化学 – タンパク質，アミノ酸―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2J16p02　味覚修飾タンパク質ネオクリンのシステインバリアント作製とその機能解析

14:00　◦金田康平，中島健一朗，小泉太一，朝倉富子，阿部啓子，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

2J16p03　味覚修飾タンパク質ネオクリンにおける pH 依存的構造変化の NMR による検出

14:11　◦小泉太一，寺田　透[1]，中島健一朗，小島正樹[2]，金田康平，朝倉富子，阿部啓子，三坂　巧（東大院農生科・応生化，[1]東大院農生科・アグリバイオ，[2]東京薬科大・生命科学部）

2J16p04　ヒト甘味受容体と甘味タンパク質の間における直接相互作用のキネティクス解析

14:22　◦尹　滔文，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

2J16p05　点変異甘味受容体が甘味タンパク質ソーマチンとの相互作用に与える影響

14:33　◦田口若奈[1]，太田圭介[2]，佐野文音[3]，桝田哲哉[1,4]，北畠直文[5]，谷　史人[1,4]（[1]京大院・農・食品生物，[2]京大ア資セ，[3]京大・農・食品生物，[4]京大院・地球環境，[5]ノートルダム清心女大）

2J16p06　高分解能 X 線結晶構造解析による甘味タンパク質ソーマチンの甘味発現機構の解明

14:44　◦桝田哲哉[1,2]，太田圭介[3]，三上文三[4]，北畠直文[5]，谷　史人[1,2]（[1]京大院・農・食品生物，[2]京大院・地球環，[3]京大ア資セ，[4]京大院・農・応用生命，[5]ノートルダム清心女大）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2J16p07　甘味タンパク質ソーマチンの苦味抑制機構の検討

15:05　◦塚原礼恵[1]，桝田哲哉[1,2]，北畠直文[3]，谷　史人[1,2]（[1]京大院・農・食品生物，[2]京大院・地球環，[3]ノートルダム清心女大）

2J16p08　コク味受容体の発見〜カルシウム感知受容体を介するコク味受容機構の解明

15:16　◦北島誠司，大洲竹晃，網野裕右，長崎浩明，山中智彦，竹下　亘，畑中敏宏，丸山　豊，宮村直宏，江藤　譲（味の素(株)）

2J16p09　コク味を有する新規γグルタミルペプチドの創出

15:27　◦田原優樹，大洲竹晃，金子　恵，中沢正和，宮村直宏，網野裕右，江藤　譲（味の素）

2J16p10　コク味物質による味覚の開拓〜官能評価法による新規 γ グルタミルペプチドの有用性確認

15:38　◦宮木貴志，大洲竹晃，長崎浩明，網野裕右，宮村直宏，江藤　譲（味の素(株)）

2J16p11　苦味抑制作用を有するリボフラビン結合タンパク質フラグメントの微生物生産

15:49　◦柳田　哲[1]，朴　徽涓[1]，篠田直人[2]，鵜高重三[3]，柏木　豊[1,2]，前橋健二[1,2]（[1]東農大院・醸造，[2]東農大応生・醸造，[3]名古屋大学）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2J16p12　*Bacillus* sp. Y18 アミノペプチダーゼによる脱苦味処理は ACE 及びレニン阻害活性を保持する

16:10　◦韮澤　悟，程　永強[1]，李　里特[1]，後藤　猛[2]，高橋砂織[3]（国際農研，[1]中国農大・食品科学，[2]秋田大学・工学資源，[3]秋田県総食研セ）

2J16p13　米乳酸発酵液の高血圧自然発症ラットにおける血圧降下作用とそのペプチド成分

16:21　◦市村年昭，岩井大悟[1]，高橋俊成[1]，吉田和利[2]，丸山　進（産総研，[1]菊正宗，[2]兵庫県工技セ）

2J16p14　分子サイズの変化による α-ラクトアルブミンの腸細胞の増殖制御

16:32　◦希吉爾，CAIRANG ZHUOMA，稲垣瑞穂[1]，岩本悟志[1]，矢部富雄[1]，金丸義敬[1]（岐阜大院連農・生資科，[1]岐阜大応生・食品生命）

2J16p15　レクチンによる食品機能成分の吸収調節のメカニズム
16:43　◦仲田　創，山本進太郎，永沼孝子，小川智久，村本光二（東北大院生命科）
2J16p16　乳脂肪球皮膜タンパク質 MFG-E8 は乳脂肪含量の制御に関与する
16:54　◦安枝武彦，中谷　肇，大島健司，灘野大太，長田重一[1]，松田　幹（名大・院生命農，[1]京大・院医）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2J16p17　濃縮乳清活性タンパクは JNK-ATF4 経路を介して骨形成を促進する
17:15　◦内藤健太郎，Jack Ralph W.[1]（(株)ディーエイチシー，[1]Seperex Nutritionals（Hong Kong）Ltd）
2J16p18　大豆からの 2S アルブミンの単離と特性
17:26　◦佐野まどか，佐藤瑠依[1]，湯川真衣[1]，永沼孝子[1]，小川智久[1]，村本光二[1]（東北大農，[1]東北大院生命科）
2J16p19　エミュー卵白 TENP の精製及び性質
17:37　◦上田　恵[1]，股野麻未[2]，武内純子[3]，内野昌孝[4]，渡部俊弘[3]，柏木　豊[1,5]，前橋健二[1,5]（[1]東農大院・醸造，[2]東農大応生・醸造，[3]東農大・生物産業・食香，[4]東農大応生・化学，[5]東農大応生・醸造）
2J16p20　緑豆由来の不凍タンパク質の分離とその諸性質
17:48　◦中地　学，片倉啓雄，河原秀久，荒井直樹[1]（関西大化生工，[1](株)カネカ）

J17 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品工学 – 物性，分析―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2J17a01　F_2-selective 2D NMR 法による食品の非破壊的な代謝物分析法
9:00　◦甲田政則，降旗一夫，魏　菲菲，宮川拓也，田之倉優（東大院・農生科）
2J17a02　野生種トウガラシの完熟果実におけるカロテノイドプロファイルの比較解析
9:11　◦伊藤　隆，鈴木宗典[1]，永田典子[2]，坂　智広，村中俊哉[1]（横浜市大木原研，[1]阪大院工学，[2]日本女子大理学）
2J17a03　科特異的プライマーを用いた食品原材料判別法の開発
9:22　Ulziichimeg Jambaldorj，　河村沙也加，　◦内野昌孝，入澤友啓[1]，野口治子，高野克己（東農大・応生，[1]理研・JCM）
2J17a04　自動 LED 計数装置による大豆加工食品中の大腸菌群数の迅速計測
9:33　◦片瀬　満，坪井成緒，津村和伸（不二製油　食品安全分析センター）
2J17a05　食品中の着色度を代用特性とするアクリルアミド含有量の測定-ポテトチップスを例として-
9:44　◦石原克之，米澤弥矢子，中田民枝，久保美沙子，古賀秀徳，堤内　要[1]，本庄　勉[2]，漆山哲生[3]，浮穴学宗[3]（カルビー(株)，[1]中部大，[2](株)森永生科学研究所，[3]農林水産省）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2J17a06　各種食用油の加熱劣化時における揮発性成分の比較
10:05　◦佐野貴士，武波慎也，今義　潤，白砂尋士，田島郁一（(株)J－オイル油脂研）
2J17a07　乾熱処理小麦粉中グルテン区分の RVA プロフィール変化への影響
10:16　◦小澤美貴，中村智英子，瀬口正晴[1]（神女短・食栄，[1]神女大・家政）
2J17a08　ショ糖脂肪酸エステルを用いた乾熱処理小麦デンプン粒表面疎水化の定量について
10:27　◦田原　彩，平野　晃[1]，松井悠子[1]，瀬口正晴（神女大院・家政，[1]森永製菓）
2J17a09　澱粉およびタンパク質変異に関わる新形質米の品質評価
10:38　町田恵佑，本間佑介，中村澄子，三浦清之[1]，笹原英樹[1]，重宗明子[1]，長岡一朗[1]，◦大坪研一（新潟大，[1]農研機構中央農研）
2J17a10　澱粉糊化とジェランガムゲル化の順序の異なる共存ゲルの破壊構造の比較
10:49　◦藤原祥愉，森口奈津美[1]，小林佳祐[1]，青山博明，猶塚雄太[1]，中村　卓（明治大農・農化，[1]明治大院農・農化）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2J17a11　両連続相構造を持つタンパク質・多糖類共存ゲルにおける構造破壊過程の可視化
11:10　◦青山博明，森口奈津美[1]，中村　卓（明治大農・農化，[1]明治大院農・農化）
2J17a12　ゼラチン / マルトデキストリン共存ゲルの構造と物性への配合とデキストロース当量の影響
11:21　◦齋藤健太，中村　卓（明治大院農・農化）
2J17a13　卵白・寒天共存系における連続相の異なるゲルへの油脂添加の影響
11:32　◦森口奈津美，中村　卓（明治大院農・農化）
2J17a14　ポリグリセリン脂肪酸エステル / 水 / 食用油系の X 線散乱測定
11:43　◦合谷祥一，池田新矢，片山円佳（香川大・農）
2J17a15　加工デンプン添加がプロセスチーズの物性・構造に与える影響
11:54　◦芳　一尚，山住　弘，小杉達也，磯貝朋之，武藤高明，佐藤早華[1]，中村　卓[1]（雪印メグミルク株式会社・ミルクサイエンス研究所，[1]明治大農・農化）

J17 会場　午後の部（14:00〜17:48）

食品―食品工学 – 物性，分析―，―食品工学 – その他―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2J17p02　ハイアミロース小麦粉の加工特性と美味しさについて
14:00　◦前田智子，田中香織[1]，森田尚文[2]（兵教大院，[1]兵教大，[2](株)FUDAI）
2J17p03　各種米粉の製パンおよび製菓特性について
14:11　前田智子，◦森田尚文[1]（兵教大院，[1](株)FUDAI）
2J17p04　グミキャンディの物性への甘味糖の種類の影響
14:22　◦山下朋子，奥本泰一[1]，村山浩昌[1]，関口直樹[1]，加来俊治[1]，中村　卓（明治大院農・農化，[1]カンロ(株)）
2J17p05　糖-リン酸 2 成分水溶液の組成比によるガラス転移温度の異常上昇
14:33　◦中島美沙子，渡辺　学，川井清司[1]，鈴木　徹（海洋大・海洋科，[1]広大院・生物圏科学）
2J17p06　Rheological and Thermal Properties of Arenga and Sago Starches
14:44　◦Dede Adawiyah[1,2]，Tomoko Sasaki[1]，Kaoru Kohyama[1]（[1]NFRI-NARO, [2]BAU）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2J17p07　凍結含浸法による形状保持軟化素材の力学物性
15:05　◦中津沙弥香，神山かおる[1]，渡邊弥生，柴田賢哉，坂本宏司（広島総研・食品工技セ，[1]農研機構・食総研）
2J17p08　凍結含浸法により調製した食品の咀嚼筋筋電図
15:16　◦神山かおる，　中津沙弥香[1]，　渡邊弥生[1]，　柴田賢哉[1]，坂本宏司[1]（農研機構・食総研，[1]広島総研・食品工技セ）
2J17p09　大豆タンパク質凍結変性の速度論的解析
15:27　◦西野裕貴，宮脇長人（石川県大・生資環）
2J17p10　κ-カラギーナンのゾル・ゲル転移における低分子共存溶質の影響
15:38　◦松平景子，宮脇長人（石川県大院・生資環）
2J17p11　高分子水溶液の Newtonian domain での見かけの粘度と極限粘度の解析
15:49　◦佐藤之紀，宮脇長人[1]（県立広島大・生命環，[1]石川県大・生資環）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2J17p12　アイスクリームの製品特性に対する高圧処理の効果
16:10 ○角掛久美子, 上西　信, 井上恵介, 谷口真奈美, 岩井　大, 竹塚真義, 市橋信夫, 井倉則之[1], 下田満哉[1]（森永乳業・食総研, [1]九州大院・農）

2J17p13　アイスクリームの製造条件が製品特性に与える影響
16:21 ○井上恵介, 石射陽介, 岩井　大, 竹塚真義, 市橋信夫（森永乳業　食総研）

2J17p14　シクロデキストリンと界面活性剤の併用によるコエンザイム Q10 の可溶化
16:32 ○上梶友記子[1,2], 城　文子[2], 中田大介[2], 寺尾啓二[2], 吉井英文[1]（[1]愛媛大連合農学, [2]シクロケムバイオ）

2J17p15　発芽玄米の使用割合が日本酒の酒質に与える影響
16:43 ○佐野智哉, 山下　隆[1]（東京工科大院・バイオニクス, [1]東京工科大・応用生物）

2J17p16　Viili から分離された乳酸菌により産生された菌体外多糖の糖組成解析
16:54 ○古座野智弘, 栃原孝志, 守重美香, 竹田保之（酪農大･食科）

p17〜p19 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2J17p17　アルギニン経口投与による腸内常在菌を介した大腸内プトレッシン濃度上昇の誘導
17:15 ○村松幸治, 澤木笑美子, 木邊量子[1], 栗原　新[2], 坂井友美[2], 鈴木秀之[2], 根本直樹[2], 辨野義己[1], 松本光晴（協同乳業･技術開発, [1]理研・辨野研, [2]京工繊大院・応用生物）

2J17p18　魚肉練り製品を使用した新規水産発酵食品の創生
17:26 ○福田　翼, 中田多恵, 古下　学, 芝　恒男（水大校・食品科学）

2J17p19　原子吸光分析装置と多変量解析を用いた豚肉製品の分類に関する検討
17:37 ○合田元清, 小島洋一郎（苫小牧高専）

B18 会場　午前の部（9:00〜11:54）

微生物―物質生産 – 発酵(二次代謝産物，抗生物質)―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2B18a01　油糧微生物 Mortierella alpina の分子育種による希少ステロール生産(1)
9:00 ○島田良美, 櫻谷英治, 清水　昌[1], 小川　順（京大院農・応用生命, [1]京都学園大・バイオ環境）

2B18a02　油糧微生物 *Mortierella alpina* の分子育種による希少ステロール生産(2)
9:11 島田良美, ○櫻谷英治, 安藤晃規[1], 清水　昌[2], 小川　順（京大院農・応用生命, [1]京大・生理化学ユニット, [2]京都学園大・バイオ環境）

2B18a03　油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 に由来する Sterol acyltransferase ホモログ遺伝子のクローニングと機能解析
9:22 ○村上　武, 島田良美, 櫻谷英治, 清水　昌[1], 小川　順（京大院農・応用生命, [1]京都学園大・バイオ環境）

2B18a04　*Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii TUA4408L* による発酵豆乳中の粘性物質について
9:33 ○吉田早希, 江草信太郎[1], 田中尚人[2], 佐藤英一, 都築公子[1], 本多芳孝[1], 岡田早苗（東農大応生科・化学, [1]マルサンアイ(株), [2]東農大・菌株）

2B18a05　*Bacillus* sp. HK-1 株の生産する抗真菌物質の単離・精製
9:44 ○谷中貴則, 司馬　肇, 細野邦昭（日本大学 生物資源科学）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2B18a06　出芽酵母の遺伝子多重破壊株によるトリコテセン感受性の解析
10:05 ○山根由美, 山内皓太, 関本陽介, 渡井智裕, 峯岸宏明[1], 宇佐美論[2], 安藤直子[2]（東洋大・工, [1]東洋大・バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター, [2]東洋大・理工）

2B18a07　土壌から単離されたピロロキノリンキノン高生産菌の再分類と生産条件の検討
10:16 ○外山博英, 樋口あや, 橋場倫子, 渡邉泰祐（琉球大農・亜熱生資）

2B18a08　*Penicillium purpurogenum* IAM15392 株における type I polyketide synthases(PKS)の機能解析
10:27 ○梅村彩良, 川島淳士, 加藤　順[1], 春見隆文, 荻原　淳（日大院生資研究科・生資利用, [1]日大生資科・生命化）

2B18a09　変異型 loxP 配列を用いた麹菌における多重遺伝子導入法の確立
10:38 ○江原直樹, 水谷　治[1], 新谷尚弘, 五味勝也（東北大院農, [1]酒総研）

2B18a10　麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド(1)－デフェリフェリクリシン大量生産技術の開発－
10:49 ○松村憲吾, 戸所健彦, 山中寛之, 福田克治, 入江元子, 秦　洋二（月桂冠総研）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2B18a11　麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド(2)－デフェリフェリクリシン高生産株の育種および培地の改良－
11:10 ○戸所健彦, 福田克治, 松村憲吾, 入江元子, 秦　洋二（月桂冠総研）

2B18a12　麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド(3)－フェリクリシンの摂取がマウスの体内の特異的な鉄分布と持久力向上に及ぼす影響－
11:21 ○鈴木佐知子, 福田克治, 入江元子, 秦　洋二, 安井裕之[1]（月桂冠総研, [1]京都薬科大・代謝分析）

2B18a13　麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド(4)
11:32 ○入江元子, 福田克治, 秦　洋二, 市川　寛[1], 内藤裕二[2], 吉川敏一[2]（月桂冠総研, [1]同志社大学, [2]京都府立医科大学大学院）

2B18a14　麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド(5)－培養細胞および皮膚モデルにおけるデフェリフェリクリシンの美白効果－
11:43 ○大浦　新, 堤　浩子, 秦　洋二（月桂冠総研）

B18 会場　午後の部（14:00〜17:59）

微生物―物質生産 – 発酵(二次代謝産物，抗生物質)―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2B18p02　新規グルタチオン排出トランスポーター発現酵母を用いた細胞外グルタチオン生産
14:00 ○原　清敬, 桐山健太郎[1], 福田秀樹, 近藤昭彦[1]（神戸大･自然, [1]神戸大・工）

2B18p03　バクテリア細胞内でのイノシトール立体異性体相互変換の可能性
14:11 ○吉田健一, 村上絢野, 竹中慎治（神戸大・農）

2B18p04　食品(納豆)を用いた微生物農薬の開発
14:22 ○澤野沙耶佳, 村田大地, 岡南政宏, 阿野貴司（近畿大学大学院・生物理工学研究科）

2B18p05　非リボソーム型ペプチド合成酵素間の選択的分子間相互作用の試験管内再構成
14:33 ○長瀬裕美, 渡部謙二, 平野展孝, 春木　満（日大・工・生命応用化）

2B18p06　抽出液面固定化システムを用いたメバスタチンの発酵生産
14:44 ○小田　忍, 野口奈津貴, 大箸信一（金沢工大･ゲノム研）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2B18p07　リファンピシン耐性付与による放線菌の抗生物質生産性の増加と二次代謝の活性化に関する研究
15:05 ○田中幸徳, 越智幸三（広島工大）

2B18p08　大腸菌での代謝経路再構築によるアーキア型膜脂質の生産
15:16 ○磯部圭祐, 横井　宇, 吉村　徹, 邊見　久（名大院生命農・応用分子生命科）

2B18p09　畜産草地研究所保有乳酸菌による発酵乳の機能性探索
15:27 ○吉村　望，萩　達朗[1]，橘内克弘[1]，成田卓美[1]，田島淳史，野村　将[1]（筑波大院生命環境，[1]農研機構・畜産草地研）

2B18p10　ジャガイモ由来 Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca におけるフェナジン生産およびクオラムセンシングの解析
15:38 ○諸星知広，須藤伴範，染谷信孝[1]，池田　宰（宇都宮大院・工，[1]北海道農研セ）

2B18p11　紅麹を副原料とした発泡酒の抗酸化活性
15:49 ○玉城愛加，玉城康智（沖縄高専　生物資）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2B18p12　改良型ベンジルイソキノリンアルカロイド生合成系を用いた大腸菌でのレチクリン生産
16:10 ○中川　明，松村栄太郎，小柳　喬，松田元規，南　博道，片山高嶺，佐藤文彦[1]，熊谷英彦，山本憲二（石川県立大，[1]京大院・生命）

2B18p13　放線菌の抗生物質高生産 *rpsL*(S12)変異株の定常期に存在する翻訳活性化因子の解析
16:21 ○岩川千紘，今井　優，渡邉　健，越智幸三[1]，保坂　毅[2]（信州大・農，[1]広工大・情報，[2]信州大・若手拠点）

2B18p14　リボソーム攻撃性薬剤を利用した紅麹菌の潜在的色素生産力の劇的活性化
16:32 水上智也，越智幸三[1]，○保坂　毅[2]（信州大･農，[1]広工大･情報，[2]信州大・若手拠点）

2B18p15　ニホンミツバチ腸内細菌からの抗アメリカ腐蛆病菌活性を有する新規バクテリオシンの探索
16:43 ○杉村祐哉[1]，呉　梅花[2,1]，芳山三喜雄[1]（[1]農研機構･畜草研，[2]筑波大院・生命環境）

2B18p16　二成分性バクテリオシン「ガセリシン T」の発現および GxxxG モチーフが抗菌活性に及ぼす影響
16:54 ○安田成美，川井　泰，伊藤喜之[1]，荒川健佑[2]，中村圭志，西村順子，北澤春樹，齋藤忠夫（東北大院農・生物産業創成，[1]明治・食機科研，[2]岡山大院自科）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2B18p17　N・C 末端がリンクした環状バクテリオシン「ガセリシン A」の生合成機構に関する研究
17:15 中村圭志，荒川健佑[1]，鈴木はるか，安田成美，○川井　泰，伊藤喜之[2]，西村順子，北澤春樹，齋藤忠夫（東北大院農・生物産業創成，[1]岡山大院自科，[2]明治・食機科研）

2B18p18　ランチビオティック nukacin ISK-1 の異常アミノ酸形成酵素 NukM の機能解析
17:26 ○島藤千那津[1]，西江麻美[1]，永尾潤一[2]，園元謙二[1,3]（[1]九大院生資環・生機科，[2]福岡歯大・機能生物，[3]九大・バイオアーク）

2B18p19　Nukacin ISK-1 の ABC トランスポータのドメイン間協調的作用に関する研究
17:37 ○西江麻美[1]，佐々木信[1]，永尾潤一[2]，園元謙二[1,3]（[1]九大院生資環・生機科，[2]福岡歯大・機能生物，[3]九大・バイオアーク）

2B18p20　Ring A of nukacin ISK-1: a lipid II binding motif for type-A(II) antibiotic
17:48 ○Riazul ISLAM[1], Mami Nishie[1], Jun-ichi Nagao[2], Takeshi Zendo[1], Jiro Nakayama[1], Daisuke Kohda[3], Hans-Georg Sahl[4], Kenji Sonomoto[1,5]（[1]Kyushu University, [2]Fukuoka Dental College, [3]Kyushu University, [4]University of Bonn, [5]Kyushu University Bioarch）

B19 会場　午前の部（9:00〜11:43）

微生物―遺伝子 – 構造，機能―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2B19a01　黄麹菌 Aspergillus oryzae の分生子特異的遺伝子の機能解析
9:00 ○辻井　雅，森田寛人，前田　浩，山形洋平，竹内道雄（東農工大院・応生化）

2B19a02　麹菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン HypA, HypB および HypC の機能解析
9:11 ○山川　結，水野佑香，石川絢也，中島春紫（明治大・農・農化）

2B19a03　麹菌 *Aspergillus oryzae* の機能性ハイドロフォービンの調製と吸着
9:22 ○堂前圭佑，加瀬明日香，池田かすみ，大橋信太郎，中島春紫（明治大農・農化）

2B19a04　麹菌 *A. oryzae*における細胞質型ホスホリパーゼ A_2 相同遺伝子 *AoplaA*の機能解析
9:33 ○駒井紀之，小谷昌平，北本勝ひこ，有岡　学（東大院農生科・応生工）

2B19a05　麹菌 *A. oryzae* における選択的オートファジー関連遺伝子 *Aoatg11* の機能解析
9:44 ○田所隆之，菊間隆志，北本勝ひこ（東大院･農生科･応生工）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2B19a06　グラム陰性天然ゴム分解菌 *Methylibium* sp. NS21 株の天然ゴム分解に関わる遺伝子の探索と解析
10:05 ○今井俊輔，村松由貴[1]，笠井大輔，政井英司，福田雅夫（長岡技科大・生物，[1]NITE）

2B19a07　*Pseudomonas stutzeri* PTH10 株における新規フタル酸代謝遺伝子の解析
10:16 永井一輝，○笠井大輔，岩崎卓巳[1]，西　達也[1]，政井英司，福田雅夫（長岡技科大・生物，[1](株)ジナリス）

2B19a08　ferredoxin 及び ferredoxin reductase をコードする *bphA3* 及び *bphA4* の融合と融合酵素の機能解析
10:27 ○福光祐宜，笠井大輔，政井英司，古川謙介[1]，福田雅夫（長岡技科大・生物，[1]別府大・食養科）

2B19a09　*Rhodococcus jostii* RHA1 株のスチレン代謝経路の解明
10:38 ○古澤裕樹，星あゆみ，田中良典，宮澤大輔，下平　潤，笠井大輔，政井英司，福田雅夫（長岡技科大・生物）

2B19a10　*Comamonas* sp. E6 株における新規芳香族カルボン酸トランスポーターの解析
10:49 保坂　大，○木下雅喜，上村直史，笠井大輔，福田雅夫，政井英司（長岡技科大・生物）

a11〜a13 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2B19a11　*Bacillus megaterium* における光誘導性転写調節機構
11:10 ○萩原健太，平田直哉，高野英晃，上田賢志（日大生資科・生命セ）

2B19a12　放線菌 *Streptomyces griseus* における銅イオンに依存した転写抑制機構
11:21 ○藤本正浩，高野英晃，上田賢志（日大生資科・生命セ）

2B19a13　放線菌 *Streptomyces griseus* の気中菌糸形成に関わるアセチル基転移様酵素
11:32 ○勝俣直人，高野英晃，上田賢志（日大生資科・生命セ）

B19 会場　午後の部（14:00〜17:48）

微生物―遺伝子 – 構造，機能―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2B19p02　*Corynebacterium glutamicum* OdhI タンパク質の増殖と代謝における機能
14:00 ○竹内さほ，和地正明（東工大院生命理工･生物プロセス）

2B19p03　*Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸排出に関与する NCgl1221 遺伝子の機能解析
14:11 ○山下周子，和地正明（東工大院･生命理工･生物プロセス）

2B19p04　大腸菌の L-アラニン排出輸送体 YgaW の膜貫通領域に存在する荷電アミノ酸の意義
14:22 ○金　世怜，堀　初弘，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕

（東北大学院・農）

2B19p05　マルチサブユニット型 Mrp アンチポーターの精製と好熱性細菌由来 Mrp ホモログの機能解析

14:33　◦伊藤政博[1,2]，守野正人[1]，鈴木俊治[3]（[1]東洋大院･生命科学，[2]バイオナノ，[3]JST・ICORP・ATP）

2B19p06　ビフェニル資化性ゲノミックアイランド（ICE *bph*）の標的部位と選択性

14:44　◦木村訓清，前田理久（明治大農　農化）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2B19p07　線状プラスミド SAP1 を用いた遺伝子クラスター輸送システムの構築

15:05　松田卓也，◦藤森友真[1]，池田治生[2]，片岡正和（信州大学大学院工学系研究科，[1]信州大学工学部，[2]北里大学生命科学研究所）

2B19p08　*Aspergillus nidulans* のガラクトフラナン生合成に関与する遺伝子の機能解析

15:16　◦岡　拓二，元松　遥，畠山信太郎，浴野圭輔，二神泰基[1]，後藤正利[1]，竹川　薫[1]，野村善幸（崇城大・生物生命・応微工，[1]九大院・農院）

2B19p09　アスペルギルス症原因菌 Aspergillus fumigatus におけるレクチン様タンパク質の機能解析

15:27　◦酒井香奈江，大荒田素子，三浦あゆみ，五ノ井透（千葉大・真菌セ）

2B19p10　イネいもち病菌の発芽管発現遺伝子ライブラリークローン B51 の機能解析

15:38　◦天野香奈子，佐々木健悟，小泉優希，各務佑哉，清田　司，鎌倉高志（東理大院理工・応生科）

2B19p11　イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の変異機構の解明

15:49　竹内紗央里，佐藤佑樹，三木慎介，大塚圭輔，◦曾根輝雄（北大院農・応生科）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2B19p12　分裂酵母の新規接合型の人為的創出と試験管内生殖隔離の証明

16:10　◦清家泰介，中村太郎，下田　親（阪市大院理･生物地球）

2B19p13　分裂酵母ヒストンシャペロン Asf1 と Sim3 の機能的関連性

16:21　◦田苗勝裕，堀内富貴，山川卓也，小村将人，川向　誠（島根大・生物資源・生命工）

2B19p14　野生産膜性酵母が有する *FLO11* 遺伝子の解析と利用

16:32　◦中川洋史，石合美夕貴，戸田康裕[1]，山村英樹，早川正幸，飯村　穣（山梨大院・医工総合・生命，[1]山梨大・工・生命工）

2B19p15　*Zygosaccharomyces rouxii* の *MAT* 遺伝子座近傍における染色体構造の変化

16:43　◦渡部　潤，上原健二，茂木喜信（ヤマサ醤油・醤油研）

2B19p16　Debaryomyces 属酵母のフェノール分解遺伝子の解析

16:54　◦中野晃幸，柴田光治[1]，能木裕一[2]，浜本牧子[1]（明治大院・農，[1]明治大・農，[2]JAMSTEC）

p17〜p19 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2B19p17　枯草菌の主要なアセチル化タンパク質（p47）の解析

17:15　◦古園さおり，鈴木健裕，堂前　直，吉田　稔（理研・基幹研）

2B19p18　好アルカリ性 Bacillus 属細菌から新たに同定されたべん毛モーターの運動性解析

17:26　◦佐野元彦，寺原直也[1]，伊藤政博（東洋大院・生命科学，[1]大阪大院・生命機能）

2B19p19　degenerate PCR を用いた *Bacillus thuringiensis* 由来の殺虫タンパク質遺伝子の検出と単離

17:37　森村夏花[1]，　波多野裕美[1]，　久保友梨佳[2]，　小宮浩史[2]，唐谷ゆふ[1]，東　慶直[1]，◦武部　聡[1,2]（[1]近畿大院・生物理工，[2]近畿大・遺伝子工）

C20 会場　午前の部（9:00〜11:54）

微生物―物質生産 – 醸造，発酵（一次代謝産物）―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2C20a01　発酵黒八女茶由来機能性ポリフェノール X 成分の構造解析およびその機能性

9:00　◦折居千賀，善藤威史，園元謙二，田中俊昭[1]，吉野貴唯[1]，植木達朗[2]，野田義治[2]，馬渡志郎[3]，船津軍喜[3]，藤野武彦[3]（九大院・農，[1]一番食品株式会社，[2]福岡県醤油醸造協同組合，[3]株式会社レオロジー機能食品研究所）

2C20a02　無通風箱培養法による均一培養と酵素生産特性解析

9:11　◦伊藤一成，五味勝也[1]，狩山昌弘[2]，三宅剛史（岡山県工技セ，[1]東北大院農・生物産業創成，[2]フジワラテクノアート）

2C20a03　スポンジケーキを基質とする麹菌培養法の研究

9:22　◦荘　咲子，高田名津美，中村友香，田中　恵，上野義栄[1]，田中克幸[2]，八田　一（京都女子大･食物，[1]京都府中小企業技術セ，[2]奥野製薬工業）

2C20a04　麹菌の *niaD* 自然変異株のスクリーニングとセルフクローニングへの応用

9:33　◦高見英輝，前田　浩，竹内道雄，山形洋平（東農工大院･応生化）

2C20a05　グルコース・エタノール共存下における酢酸菌の酸化発酵挙動の解析

9:44　貝沼（岡本）章子，　◦尹　蓮梅，　石川森夫，　岡田卓也，山上圭吾[1]，小泉幸道（東農大応生科・醸造，[1]ミツカン中研）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2C20a06　次世代シークエンサーを用いたゲノムスケールでの酢酸菌分類の試み

10:05　貝沼（岡本）章子[1]，◦海野祥子[1]，石川森夫[1]，志波　優[2]，吉川博文[2,3]，松谷峰之介[4]，松下一信[4]，山上圭吾[5]，小泉幸道[1]（[1]東農大応生科・醸造，[2]東農大・ゲノムセンター，[3]東農大応生科・バイオ，[4]山口大・農，[5]ミツカン中研）

2C20a07　*Gluconacetobacter xylinus* NBRC3288 における酸素欠乏応答に関する研究

10:16　◦渡辺誠司，白井睦訓[1]，大西康夫（東大院農生科･応生工，[1]山口大院・医）

2C20a08　味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株における酸性ホスファターゼ（Aph）遺伝子多重破壊株の作出

10:27　◦安田庄子，長谷川摂，小野奈津子，伊賀佳美[1]，白石洋平[1]，和久　豊[1]，杉本達哉[2]，楠本憲一[3]，北本則行（愛知産技研・食工技セ，[1]ビオック，[2]ナカモ，[3]食総研）

2C20a09　醤油用黄麹菌（*Aspergillus oryzae* RIB915 株）のゲノムシーケンス解析

10:38　◦藤村友明[1]，野村孝典[1]，岩下和裕[1,2]，山田　修[2]（[1]広島大院・先端研，[2]酒総研）

2C20a10　耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* DMB1 のエタノール発酵性

10:49　◦五島徹也，井上宏之，松鹿昭則，矢野伸一（産技総研バイオマス研セ）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2C20a11　花から分離した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のマイクロサテライト解析による遺伝的多様性解析

11:10　◦小野奈津子，安田（吉野）庄子，船越吾郎，加藤雅士[1]，北本則行（愛知産技研・食工技セ，[1]名城大・農）

2C20a12　魚醤油（イカイシル）の発酵熟成過程における乳酸菌数の変化および抗酸化活性成分の変化

11:21　◦鈴木隆元，赤堀早恵香，黒木美咲，小柳　喬，笹木哲也[1]，道畠俊英[1]，中村静夫[1]，熊谷英彦（石川県大，[1]石川工試）

2C20a13　自然界から分離した酵母 Saccharomyces cerevisiae AK 46 のパン生地発酵力の改良

11:32 ○高谷政宏，三雲　大[1]，田村雅彦[1]，折笠善丈，小田有二（帯畜大・食品，[1]日本甜菜製糖・総研）

2C20a14　Saccharomyces cerevisiae によるチーズホエー・デンプン質混合原料からのエタノール生成

11:43 ○藤井秀峰，折笠善丈，小田有二（帯畜大・食品）

C20 会場　午後の部（14:00〜17:59）

微生物―物質生産 – 醸造，発酵（一次代謝産物）―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C20p02　PUT 遺伝子導入株を用いた低プロリン濃度甲州ワインの醸造

14:00 ○三木健夫，安藤直哉，谷本守正（山梨大・院）

2C20p03　ワイン醸造における香気成分生成に関わる酵母の作用に関する解析

14:11 ○藤村朱喜，磯貝宜美，齋藤優生，方壁あゆみ，村中梨紗，妙田貴生，西澤　信，戸枝一喜，大山　徹，永島俊夫，藤森　嶺，中川純一（東農大・食香）

2C20p04　大麦麦芽中の xylanase の阻害物質について

14:22 ○縮　彩佳，金内　誠，亀山眞由美[1]，Charles W. Bamforth[2]（宮城大・食産，[1]食総研，[2]UC Davis）

2C20p05　大麦麦芽中のアスコルビン酸ペルオキシダーゼについて

14:33 ○金内　誠，Bamforth Charles[1]（宮城大　食産業，[1]UC Davis）

2C20p06　下面発酵ビール酵母における接合可能株の単離

14:44 ○横山　亮，星田尚司，尾形智夫[1]，赤田倫治（山口大・医系・応用分子生命，[1]アサヒビール醸造研）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C20p07　液胞プロトンポンプ（V-ATPase）関連遺伝子（*DBF2, VMA41, RAV2*）の過剰発現によるエタノール耐性ビール酵母の作製

15:05 長谷川園子，○尾形智夫[1]，小川　順[2]，高木博史[3]，島　純（京大・微生，[1]アサヒビール・醸造研，[2]京大院農・応用生命，[3]奈良先端大・バイオ）

2C20p08　沖縄県由来黒麹菌の単離と諸性質の検討

15:16 坂元理奈，金城悠希菜，○渡邉泰祐，外山博英（琉球大農・亜熱生資）

2C20p09　宮古島単離酵母 MY17 株による泡盛醸造の検討

15:27 ○京極理人[1,2]，　藤井　力[1,2]，　川本佑太[1,2]，　韓　錦順[2]，金井宗良[2]，　吉田聡子[2]，　福田　央[2]，　山田　修[2]，　砂川拓也[3]，古波蔵春海[4]，喜世盛正春[4]，奥島憲二[4]，家藤治幸[1,2]（[1]広大院・生物圏，[2]酒総研，[3]多良川，[4]りゅうせき）

2C20p10　「The YEASTS 5th」における清酒酵母の分類学的位置

15:38 ○門倉利守，国分萌里，矢島優子，中山俊一，中里厚実（東農大応生科・醸造）

2C20p11　カメルーン熱帯地域における酒造好適酵母の探索と同定

15:49 ○太田圭介[1,2]，　久保亮介[2,3]，　井澤真吾[2,4]，　荒木　茂[1,2]，北畠直文[1,2,5]（[1]京大ア資セ，[2]JST-JICA・SATREPS，[3]京大院・地球環境，[4]京工繊大院・応生，[5]ノートルダム清心女大・食品栄養）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C20p12　清酒酵母における葉酸高蓄積条件の検討

16:10 ○金井宗良[1]，塚本　香[1]，藤井　力[1,2]，山田　修[1]，浜田健一[3]，糟谷健二[3]，神前　健[3]，福田　央[1]，家藤治幸[1]（[1]酒総研，[2]広大院・生物圏，[3]オリエンタル酵母工業(株)）

2C20p13　D-アスパラギン酸高含有日本酒の醸造工程における D-アミノ酸の定量的解析と生成機構の解明

16:21 ○斉藤瑠実，岡田かおり，郷上佳孝，重藤憲史[1]，老川典夫（関大・化学生命工，[1]若戎酒造）

2C20p14　清酒酵母と実験室酵母の交配による S-アデノシルメチオニン及び葉酸蓄積能の解析

16:32 ○河田知子[1,2]，　金井宗良[2]，　藤井　力[1,2]，　山田　修[2]，渡辺大輔[2]，赤尾　健[2]，下飯　仁[2]，家藤治幸[1,2]（[1]広大院・生物圏，[2]酒総研）

2C20p15　清酒もろみ由来の酵母内容物が老香の主成分 Dimethyl trisulfide 生成に与える影響

16:43 ○沖森祐太[1,2]，　西堀奈穂子[2]，　藤井　力[1,2]，　佐々木慧[1,2]，金井宗良[2]，磯谷敦子[2]，神田涼子[2]，後藤奈美[1,2]，山田　修[2]（[1]広大院・生物圏，[2]酒総研）

2C20p16　低グルテリン米清酒の特異香

16:54 ○古川幸子，磯谷敦子[1]，須藤茂俊[1]，松丸克己[1]，若井芳則（黄桜（株），[1]酒類研）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2C20p17　ガスクロマトグラフィを用いた有機酸分析方法の開発

17:15 ○高阪千尋，廣岡青央，山本佳宏，市原謙一[1]（京都市産技研，[1]京府大院・生命環境科学）

2C20p18　酵素法による清酒のカプロン酸エチル簡易推定法

17:26 ○栗林　喬，金桶光起，平田　大[1]，渡邊健一（新潟県醸造試験場，[1]広島大・先端研）

2C20p19　GC-FID 直接注入法による酒類の中鎖脂肪酸とヘキサン酸エチルの同時定量方法

17:37 ○髙橋　圭，後藤奈美（酒類研）

2C20p20　ゲノム構造多型に基づく清酒酵母の醸造特性関連遺伝子の解析

17:48 ○岩田華苗[1,2]，赤尾　健[1]，渡辺大輔[1]，下飯　仁[1,2]（[1]酒総研，[2]広島大院・先端研）

C21 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―遺伝子 – 発現制御，トランスクリプトーム―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2C21a01　ビーズディスプレイ法とクラス I リガーゼ・リボザイムを用いたハイスループットな invitro プロモータースクリーニング法の確立

9:00 ○伊藤祐里恵，兒島孝明，大内将司[1]，中野秀雄（名大院・生命農・生命技術，[1]東大・医科研・基礎医）

2C21a02　麹菌の CreA および HECT ユビキチンリガーゼ HulA 条件的発現株を用いたグルコース抑制機構の解析

9:11 ○田中瑞己，新谷尚弘，五味勝也（東北大院農・生物産業創成）

2C21a03　Characterization of *farA* and other zinc finger transcription factor genes for fatty acid metabolism in *Aspergillus oryzae*

9:22 ○Sharon Marie Garrido, Akira Watanabe, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi（Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai City, Japan）

2C21a04　麹菌 *Aspergillus oryzae* セリンタイプカルボキシペプチダーゼ（CPase）遺伝子の破壊による CPase 遺伝子群の転写への影響

9:33 ○阿保春花，　森田寛人，　前田　浩，　山形洋平，　竹内道雄（東農工大院　応生化）

2C21a05　麹菌の薬剤排出 ABC トランスポーターを制御する転写因子 AtrR と相互作用する Hsp70 ファミリータンパク質 SsaA の機能解析

9:44 ○大場　歩，田中瑞己，新谷尚弘，五味勝也（東北大院農・生物産業創成）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2C21a06　ビーズディスプレーを用いた DNA-転写因子相互作用検出システムに関する研究

10:05 ○王ハン輝，兒島孝明，中野秀雄（名大院・生命農）

2C21a07　出芽酵母のエタノールストレス応答に関わるエピジェネティクス制御系の解析

10:16 ○須田　宙，松田宇央，藤村朱喜，中川純一（東農大院・食品科学）

2C21a08　出芽酵母の Rpd3/HDAC 複合体による減数分裂中期遺伝子群の転写制御

10:27 ◦湯川格史，河村　浩，淺田星太郎，今村優子，土屋英子（広島大院先端物質・分子生命）

2C21a09　出芽酵母の高温耐性能に関与する遺伝子の探索

10:38 ◦中村敏英，山本まみ，安藤　聡，渡邉　樹，島　純[1]（農研機構　食総研，[1]京都大　微生物科学）

2C21a10　分裂酵母におけるグリセロール資化関連遺伝子のエタノールによる発現誘導機構の解析

10:49 ◦松沢智彦，竹川　薫（九大院・生資環）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2C21a11　嫌気性細菌 Clostridium paraputrificum M21 株のキチナーゼ遺伝子の発現とプロモーター解析

11:10 佐藤勇介，中村仁美，中西有斗，黒岩千智，粟冠真紀子，◦木村哲哉，粟冠和郎（三重大院生物資源）

2C21a12　糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるセルラーゼおよびマンナナーゼ生産制御機構

11:21 ◦青山未来，金丸京子，小林哲夫（名大院生命農･生物機構）

2C21a13　Involvement of the MADS box protein McmA in regulation of cellulase genes in filamentous fungi

11:32 Yohei Yamakawa,　◦Nuo Li,　Yoshikazu Endo, Kentaro Miyamoto, Kyoko Kanamaru, Tetsuo Kobayashi（Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ）

2C21a14　麹菌 *Aspergillus oryzae* 金属プロテアーゼ遺伝子の転写解析

11:43 ◦酒井大介，竹内道雄，山形洋平（東農工大・院農・応生化）

2C21a15　*Trichoderma reesei* セルラーゼ高生産株における菌体内 *β*-グルコシダーゼの解析

11:54 ◦山口香織，新田美貴子，中澤　光，志田洋介，森川　康，森　一樹[1]，平川秀樹[1]，久原　哲[1]，小笠原渉（長岡技科大･生物，[1]九大院農院・生機科）

C21 会場　午後の部（14:00〜17:59）

微生物―遺伝子 – 発現制御，トランスクリプトーム―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C21p02　*Streptomyces avermitilis* における異種由来テルペン合成酵素遺伝子発現システムの構築

14:00 ◦山田佑樹，内山琢麻，葛山智久[1]，池田治生（北里大・生命研，[1]東大生物工学セ）

2C21p03　次世代シーケンサーによる放線菌 *Streptomyces griseus* の転写産物の網羅的同定

14:11 ◦手塚武揚，大西康夫（東大院農生科・応生工）

2C21p04　放線菌の定常期への移行と主要シグマ因子発現制御の調節

14:22 ◦大谷啓志，大西康夫（東大院農生科・応生工）

2C21p05　放線菌 Streptomyces griseus の気中菌糸表層タンパク質遺伝子群の転写調節機構に関する解析

14:33 ◦山本祐梨子，平野　節，肥後明佳，堀之内末治，大西康夫（東大院農生科・応生工）

2C21p06　The role of DasR in regulation of chitin metabolism of *Streptomyces coelicolor* grown in soil

14:44 ◦Behnam NAZARI[1,2], Michihiko Kobayashi[1], Takeshi Fujii[2]（[1]Univ. Tsukuba, [2]NIAES Tsukuba）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C21p07　Comprehensive analysis of DeoR-family transcriptional regulators in *Streptomyces avermitilis*

15:05 ◦Dana Ulanova[1,2], Shigeru Kitani[1], Takuya Nihira[1]（[1]Osaka University, [2]Kochi University,）

2C21p08　放線菌 *Streptomyces avermitilis* の抗生物質生産を誘発する新型放線菌ホルモン

15:16 ◦木谷　茂，宮本聖子，高松　智[1]，Elisa Herawati，内田美帆[2]，長光　亨[2]，池田治生[1]，仁平卓也（阪大・生物工学国際交流セ，[1]北里大・生命研，[2]北里大・薬学部）

2C21p09　*Streptomyces avermitilis* における放線菌ホルモン受容体様タンパク質 AvaL1 による二次代謝産物生合成遺伝子群の転写制御

15:27 ◦宮本聖子[1,2]，木谷　茂[1]，池田治生[2]，仁平卓也[1]（[1]阪大・生物工学国際交流セ，[2]北里大・生命研）

2C21p10　Functional analysis of three SARP-family regulators in secondary metabolism of *Streptomyces lavendulae FRI-5*

15:38 ◦Yohanes Novi KURNIAWAN, Shigeru Kitani, Asa Maeda, Takuya Nihira（Osaka University）

2C21p11　メチロトローフ酵母のメタノール誘導性遺伝子発現における CbHap5p の分子特性

15:49 ◦小田沙織，新田暢久，ZHAI Zhenyu，由里本博也，阪井康能（京大院農・応用生命）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C21p12　メチロトローフ酵母におけるメタノール応答性転写活性化因子 CbMpp1p の発現制御と核局在

16:10 ◦田畑一巌，辻　貴大，ZHAI Zhenyu，由里本博也，阪井康能（京大院農・応用生命）

2C21p13　アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* の *n*-アルカン応答に関わる転写制御因子 Yas3 とリン脂質の結合に関する解析

16:21 ◦小林　哲，福田良一，太田明徳（東大院･農生科･応生工）

2C21p14　酵母シグナルペプチドライブラリーを用いたシグナルペプチド最適化ツールの開発

16:32 ◦原　翔一，菅原知宏，佐原健彦[1]，扇谷　悟[1]，河原崎泰昌[2]，兒島孝明，中野秀雄（名大院・生命農・生命技術，[1]産総研，[2]静岡県大院生活健康・食栄）

2C21p15　出芽酵母の遺伝子発現を高める *TPS1* ターミネーター

16:43 ◦山西　守，片平悟史，松山　崇（豊田中研）

2C21p16　麹菌 *Aspergillus oryzae* における染色体大領域重複技術の開発

16:54 ◦高橋　理，佐藤敦史，半谷吉識，小熊哲哉（キッコーマン研究開発本部）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2C21p17　麹菌酸性プロテアーゼ遺伝子のイントロンスプライシングに関する研究

17:15 ◦石田　健，久保島恵，宮本雅史，森田寛人，前田　浩，岡本綾子，山形洋平，竹内道雄（東農工大院・農）

2C21p18　*Aspergillus nidulans* AmyR の誘導物質依存的なリン酸化と分解

17:26 ◦森本翔太，大崎陽央，金丸京子，加藤雅士[1]，小林哲夫（名大院生命農学・生物機構，[1]名城大農・応生化）

2C21p19　*Aspergillus oryzae* の転写因子 AraR の結合配列の決定

17:37 ◦川瀬智美，今枝美奈，加藤雅士[1]，金丸京子，小林哲夫（名大院生命農・生物機構，[1]名城大・農）

2C21p20　*Fusariumu aciaticum* のトリコテセン系かび毒生合成調節に関与する遺伝子の解明

17:48 ◦岩橋由美子，鈴木忠宏（食総研）

C22 会場　午前の部（9:00〜11:43）

微生物―細胞 – 分離，分類，生態―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2C22a01　*Trichoderma* 属の RPB2 遺伝子解析における PCR 条件最適化

9:00 ◦鈴木里江子，鶴海泰久，安藤勝彦（NITE-BRC）

2C22a02　SINE 型レトロトランスポゾン解析に基づくマツタケ類の分子進化の解明

9:11 ◦村田　仁，太田祐子，根田　仁，山口宗義，馬場崎勝彦，山田明義[1]（森林総研，[1]信大）

2C22a03　一細胞レベルの解析によるプラスミドの土壌細菌集団

中における真の宿主域の決定
9:22 ○新谷政己，松井一泰[1]，井上潤一，野尻秀昭[1]，大熊盛也（理研・BRC-JCM，[1]東大・生物工学セ）

2C22a04　鍾乳洞より分離した新種細菌 *Jeongeupia* sp. HS-3 の分類同定
9:33 ○中ノ森慧子，福本　圭，大田　彩，水野康平，古川壮一[1]，深瀬　栄[1]，平山　悟[1]，荻原博和[1]，森永　康[1]，柘植丈治[2]，田中賢二[3]（北九州高専・物化，[1]日大・生物資，[2]東工大・総理工，[3]近大・産理工）

2C22a05　カブトムシ幼虫の腸内に特異的な細菌の探索
9:44 和田典子，竹石英伯[1]，岩淵範之[1]，砂入道夫[1]，中嶋睦安[1]，○安齋　寛（日大・短生，[1]日大生資科・応生科）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2C22a06　津波で被災した海洋微生物コレクションの復旧と再構築
10:05 ○笠井宏朗，中島琢自，勝田麻津子，松本厚子，野中健一，相澤好治，紙野　圭[1]，関口弘志[1]，藤田信之[1]（北里大，[1]製品評価技術基盤機構）

2C22a07　*Stenotrophomonas maltophilia* の Biovar II 群の分類学的研究
10:16 ○黒川祐菜，田中尚人[1]，飯野隆夫[2]，小迫芳正[2]，大熊盛也[2]，佐藤英一，岡田早苗（東農大応生科・化学，[1]東農大・菌株，[2]理研 BRC・JCM）

2C22a08　好酸性硝化リアクターからの従属栄養細菌の分離および系統解析
10:27 ○大石健太郎，花田晶子，山田剛史，平石　明（豊橋技科大　環境生命工学）

2C22a09　脱窒細菌の細胞レベルにおける簡易生菌数計測法の開発
10:38 ○川島淳一，山田剛史，平石　明（豊橋技科大　環境生命工学）

2C22a10　好気的条件下で脱窒を行う能力を有する堆肥由来細菌の単離と同定
10:49 ○大坪和香子，尾形裕明，宮内啓介，遠藤銀朗（東北学院大・工）

a11〜a13 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2C22a11　ポリ乳酸添加固相脱窒リアクター内の脱窒細菌群集の動態と多様性
11:10 ○松岡宏行，山田剛史，辻　秀人，平石　明（豊橋技科大･工）

2C22a12　真核生物における鉄呼吸
11:21 ○上杉正樹，斎木　博，鈴木義規（工科大・バイオ）

2C22a13　青枯病菌 Ralstonia solanacearum の植物関連物質に対する走化性の解析
11:32 ○奥　正太，中里憲司，田島誉久，中島田豊，加藤純一（広島大院先端物質・分子生命）

C22 会場　午後の部（14:00〜17:59）

微生物―物質生産 – 酵素，タンパク質―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C22p02　細胞性粘菌の柄細胞に存在する天然化合物の探索
14:00 ○品川知則，臼杵豊展[1]，齊藤玉緒[1]（上智大院・理工，[1]上智大・理工）

2C22p03　細胞性粘菌における新規柄細胞分化誘導因子の検索
14:11 ○佐藤有紀江，齊藤玉緒[1]（上智大院･理工，[1]上智大･理工）

2C22p04　枯草菌胞子の最外層形成に関与するタンパク質の相互作用の解析
14:22 ○宮部泰輔，大竹つかさ，柏元良介，島祐一郎，新穂淳子，西川恭平，今村大輔，桑名利津子，高松宏治，渡部一仁（摂南大･薬）

2C22p05　ヒト fALS SOD1 の異常化を促進する酸化剤の探索
14:33 ○黒川洋一，松井義隆[1]，桜田真一[1]（福井県大・生物，[1]福井県大院・生物）

2C22p06　*Aspergillus oryzae* 菌体外分泌型アスパルティックプロテアーゼの発現解析
14:44 ○渡邉　格，岡本綾子，竹内道雄，山形洋平（東農工大院･応生化）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C22p07　誘導プロモーターを用いたオートファジー制御による麹菌からの実用的異種タンパク質高生産宿主の造成
15:05 ○菊間隆志，尹　載宇[1]，丸山潤一，北本勝ひこ（東大院･農生科・応生工，[1]啓明大学校・薬）

2C22p08　ペプチド性培養基材は酵母指数増殖期における組換えタンパク質生産性を向上する
15:16 疋田　礼，○伊藤圭祐，河原崎泰昌（静岡県大院生活健康･食栄）

2C22p09　麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いたラクダ科動物由来一本鎖抗体可変部位 V_{HH}分泌生産系の構築
15:27 ○吉栄俊秀，青木淳一，田淵聡一郎，岡崎文美[1]，荻野千秋，田中　勉，久田博元[2]，秦　洋二[2]，近藤昭彦（神戸大院・工，[1]神戸大・自，[2]月桂冠・総研）

2C22p10　大腸菌を宿主とする A 型インフルエンザウイルス核タンパク質の組換え生産技術の構築
15:38 ○室伏敬太，松野正幸，太田俊也（静工技研沼津）

2C22p11　Rare codon supplementation: The way to improve heterologous expression of *Thermus thermophillus* gene in *E. coli*
15:49 ○SUTHITAR SINGKARAVANIT，Tomohiro Handa，Ryuichi Hirota，Takeshi Ikeda，Akio Kuroda（Hiroshima University）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C22p12　好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 における異種耐熱性酵素遺伝子の発現
16:10 ○鈴木宏和，大島敏久，河原林裕（九大院農院）

2C22p13　*Oceanobacillus iheyensis* 由来プロテアーゼの新規 BIC 法を用いた *Brevibacillus choshinensis* での発現系の構築
16:21 ○松崎竜也，山口　類，石橋松二郎，追立尚樹，徳永廣子，徳永正雄（鹿児島大農・生資化）

2C22p14　Brevibacillus 菌体内発現系による大腸菌で封入体化する蛋白質の可溶性高生産
16:32 ○大西廣優，水上　誠，花方　寛，宮内　明（ヒゲタ醤油･研）

2C22p15　*Corynebacterium glutamicum* を用いたタンパク質分泌発現系（CORYNEX(R)）における分泌向上検討－Ser/Thr プロテインキナーゼ / フォスファターゼの高発現が異種タンパク質分泌生産に与える影響－
16:43 ○松田吉彦，菊池慶実（味の素(株)・イノベーション研）

2C22p16　耐熱性ベンズアミド資化性菌に関する研究
16:54 ○猪瀬孝之，坂倉徹哉[1]，青木健次[2]，村上周一郎[1]（明治大院・農，[1]明治大・農，[2]相模女子大・栄養）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2C22p17　大腸菌に発現させた *Aspergillus oryzae* のクチナーゼホモログの遺伝子産物の精製と性質
17:15 ○渡辺久美子，前橋健二，柏木　豊（東農大院・醸造）

2C22p18　*Penicillium* sp. III-1 株由来のプロトカテク酸 3, 4-ジオキシゲナーゼ（P34D）の精製および特性解析
17:26 ○川合史晃，青木健次[1]，村上周一郎[2]（明治大院農・農化，[1]相模女子大栄養・管理栄養，[2]明治大農・農化）

2C22p19　ビタミン D_3水酸化酵素に対する電子供給効率化による 25 位水酸化ビタミン D_3の生産性向上
17:37 ○西岡大樹[1]，山形理紗[2]，井元紀子[3]，安武義晃[4]，田村具博[1,4]（[1]北大・農，[2]北海道ハイテク，[3]八戸大・人間健康，[4]産総研・生物プロセス）

2C22p20　超純水と超音波による簡便な cell-free 翻訳溶液調製
17:48 ○藤原　慶[1]，野村 M. 慎一郎[1,2]（[1]東北大院工・機械系，[2]JST さきがけ）

C23 会場　午前の部（9:00〜11:54）

微生物―細胞 – 栄養，生育，増殖―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2C23a01　海洋深層水を利用した Dunaliella salina の産業的大量培養方法の確立
9:00　◦松田岳大，工藤勇人，花崎金行[1]，金枝栄寿[1]，竹中裕行[2]，山口裕司[2]，津嶋貴弘[3]，林　芳弘[3]，島村智子，柏木丈拡，受田浩之（高知大農，[1]赤穂化成(株)，[2]マイクロアルジェコーポレーション(株)，[3]高知県海洋深層水研究所）

2C23a02　アルカリ性静置培養により生産される *Amphibacillus xylanus* の xylan 分解酵素
9:11　◦西田俊介，佐藤ひかる，望月大地，藤田信之[1]，佐藤純一，川崎信治，新村洋一（東農大応生科・バイオ，[1]NITE）

2C23a03　*Amphibacillus* と乳酸菌の酸素存在下の生育における Fe の影響(第 2 報)
9:22　◦森田円史，望月大地，羽鳥宗佑，藤田信之[1]，安保　充[2]，吉村悦郎[2]，中川純一[3]，佐藤純一，川崎信治，新村洋一（東農大応生科・バイオ，[1](独)製品評価技術基盤機構，[2]東大院農生科・応生化，[3]東農大生物産業・食香）

2C23a04　*Amphibacillus xylanus* における遊離フラビン関与の酸素代謝(第二報)
9:33　◦望月大地，新井俊晃，木俣真弥，中川純一[1]，阿部　晃[2]，佐藤純一，川崎信治，新村洋一（東農大応生科・バイオ，[1]東農大生物生産・食香，[2]札幌医大医・眼科）

2C23a05　メタン資化性細菌の植物葉上での生存戦略
9:44　◦井口博之，佐藤　出，厚主聡美，由里本博也，阪井康能（京大院農・応用生命）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2C23a06　シソに生息する *Methylobacterium* 属細菌の分布とその特性評価
10:05　◦水野雅之，井口博之，谷　明生[1]，由里本博也，阪井康能（京大院農・応用生命，[1]岡山大・資源植物科学研）

2C23a07　適応育種による耐熱性酵母の取得と耐熱性機構の考察
10:16　◦勝山義明，黒田浩一，植田充美（京大院農・応用生命）

2C23a08　出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導
10:27　◦松崎浩明，宮本昭弘，柳本敏彰，秦野琢之（福山大・生命工・生物工）

2C23a09　Ca^{2+} シグナルによる出芽酵母の複製的寿命制御機構の解析
10:38　◦長尾悠広，椿山諒平[1]，水沼正樹[1]，平田　大[1]（広島大･工，[1]広島大院・先端研・分子生命）

2C23a10　出芽酵母における新規寿命制御因子の同定と機能解析
10:49　◦椿山諒平，水沼正樹，久米一規，平田　大（広島大院・先端研・分子生命）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2C23a11　分裂酵母 S. pombe におけるオリゴペプチド・アミノ酸利用を制御するネットワークの解析
11:10　◦北村憲司（広島大・自然科学研セ・遺伝子）

2C23a12　出芽酵母の低親和性トリプトファン輸送体 Tat1 のユビキチン依存分解における細胞質末端の役割
11:21　◦出口弘樹[1]，鈴木麻葉[1]，上村聡志[1,2]，阿部文快[1,2]（[1]青山学院大・理工・化学生命，[2]海洋研究開発機構）

2C23a13　出芽酵母の高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 と Gap1 のキメラを用いた輸送体制御機構の解析
11:32　◦望月貴博，阿部文快（青山学院大・理工・化学生命）

2C23a14　ランダム変異導入法による出芽酵母の高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 の機能解析
11:43　完田奈緒子，◦阿部文快（青山学院大・理工・化学生命）

C23 会場　午後の部（14:00〜17:48）

微生物―物質生産 – 微生物変換，微生物酵素反応―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C23p02　*Clostridium thermocellum* マンナナーゼ Man5A におけるファミリー 32 糖質結合モジュール(CBM32)の機能
14:00　◦水谷公也，栗冠真紀子，木村哲哉，栗冠和郎（三重大･生）

2C23p03　*Raoultella ornithinolytica* MB426 株由来の L-リボースイソメラーゼを用いた L-アロースの生産
14:11　◦寺見優司，吉原明秀[1]，森本兼司[1]，高田悟郎[1]（香川大･農，[1]香川大農・希少糖研セ）

2C23p04　*Aspergillus oryzae* KBN616 株およびその変異株によるキシリトール生産
14:22　◦丸山洋平，有浦淑帆[1]，中村浩平，北本則行[2]，鈴木　徹[3]，高見澤一裕（岐阜大院・応生・資源生命，[1]岐阜大・応生・食品生命，[2]愛知産技研・食品工技，[3]岐阜大・連農）

2C23p05　強アルカリ耐性アルドラーゼと化学的異性化反応を共役させた *N*-アセチルグルコサミンからの *N*-アセチルノイラミン酸の生産
14:33　◦石井康太，日比　慎[1]，永野秀昭[1]，萩下大郎[1]，小川　順，清水　昌，横関健三[1]（京大院農・応用生命，[1]京大院農・産業微生物）

2C23p06　好塩細菌 *Halomonas* sp. H11 株より単離した α-グルコシダーゼの配糖化能評価
14:44　◦小島晃代，相沢健太，山本　健（日本食品化工）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C23p07　ヒト由来硫酸基転移酵素発現出芽酵母を用いた抱合体産生
15:05　◦生城真一，布目基倫，西川美宇，榊　利之（富山県大・工・生物工学）

2C23p08　哺乳動物由来 UDP-グルクロン酸転移酵素発現出芽酵母を用いた抱合体産生
15:16　◦長谷川嵩，西川美宇，生城真一，榊　利之（富山県大・工・生物工学）

2C23p09　薬物代謝酵素発現酵母株を用いた医薬品代謝物調製技術の開発
15:27　◦西川美宇，増山優香，長谷川嵩，鎌倉昌樹，榊　利之，生城真一（富山県大・工・生物工学）

2C23p10　Construction of a chimeric glycolytic pathway for stoichiometrical production of lactic acid using thermophilic enzymes
15:38　◦Xiaoting Ye[1], Takaaki Sakai[1], Kenji Okano[1], Ryuichi Hirota[2], Akio Kuroda[2], Kohsuke Honda[1,3], Hisao Ohtake[1]（[1]Department of Biotechnology, Osaka University, [2]Department of Biotechnology, Hiroshima University, [3]PRESTO, Japan science and Technology Agency (JST)）

2C23p11　合成代謝工学によるバイオアルコール生産
15:49　◦本田孝祐，Borimas KRUTSAKORN，岡野憲司，大竹久夫（阪大院・工・生命先端）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C23p12　炭素間二重結合を還元する耐熱性酵素の探索
16:10　◦辻　直人[1]，本田孝祐[1,2]，岡野憲司[1]，大竹久夫[1]（[1]阪大院･工・生命先端，[2]科学技術振興機 構 さきがけ）

2C23p13　Thermobifida alba AHK119 由来の組換えポリエステラーゼの遺伝子改変と構造解析
16:21　◦タマラートアチャラ，川端　猛[1]，鈴木秀之，河合富佐子[2]（京工繊大院・応生，[1]阪大・蛋白研，[2]京工繊大・ナノ材料セ）

2C23p14　酵素的非対称化を利用した光学活性 α, α-2 置換 α-アミノ酸の合成法の開発(1)
16:32　◦川端　潤[1,2]，三宅良磨[1,2]，阿須間夕紀[1,2]，鈴木竜哉[1]，

出来島康方[1]，竹原　潤[1,2]，上田　誠[1,2]（[1]三菱化学科学技術研究センター，[2]エーピーアイコーポレーション）

2C23p15　酵素的非対称化を利用した光学活性 α,α-2 置換 α-アミノ酸の合成法の開発(2)

16:43　◦三宅良磨[1,2]，川端　潤[1,2]，加藤良平[1]，阿須間夕紀[1,2]，鈴木竜哉[1]，出来島康方[1]，竹原　潤[1,2]，上田　誠[1,2]（[1]三菱化学，[2]エーピーアイ）

2C23p16　*Rhodococcus erythropolis* JCM3132 株の酸化的ピリミジン代謝における新規アミダーゼの同定ならびに代謝遺伝子クラスターの解明

16:54　◦堀之内伸行，宋　子良，清水　昌，小川　順（京大院農・応用生命）

p17〜p19 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2C23p17　アメーバ由来新規ピロリン酸依存酢酸キナーゼ：アセチルリン酸の生産と ATP 再生系構築への展望

17:15　◦吉岡　彩，河井重幸，村田幸作（京大院農・食品生物）

2C23p18　Cyclic di-GMP 量産化技術の確立

17:26　◦田辺香緒里，石毛和也（ヤマサ醤油・医薬化成品）

2C23p19　窒素化合物を貯留する微生物の研究：蓄積した窒素化合物の解析

17:37　◦太田光昭，登尾浩助[1]，村上周一郎[2]（明治大院農・農化，[1]明治大・農，[2]明治大・農化）

C24 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物—代謝 – 代謝調節，発酵生理，メタボローム—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2C24a01　大腸菌のバイオフィルム形成に及ぼす L-Tryptophan と L-Cysteine の影響

9:00　◦島崎純次，古川壮一，荻原博和，森永　康（日大院･生資科）

2C24a02　大腸菌の核酸代謝とバイオフィルム形成の関連性

9:11　◦臼井有美，古川壮一，荻原博和，森永　康（日大院　生資科）

2C24a03　エリスリトール生産酵母 *Trichosporonoides megachiliensis* における Erythrose Reductase 遺伝子の発現挙動とポリオールの生成

9:22　◦小林洋介，小山善幸[1]，荻原　淳，加藤　順[1]，春見隆文（日大院生資研究科・生資利用，[1]日大生資科・生命化）

2C24a04　エリスリトール生産酵母 *Trichosporonoides megachiliensis* における transaldolase 遺伝子の機能解析

9:33　◦岩田悠志[1]，小山善幸[2]，大倉哲也[3]，荻原　淳[1,2]，加藤　順[2]，春見隆文[1,2]（[1]日大院生資研究科・生物利用，[2]日大生資科・生命化，[3]食総研）

2C24a05　ヨーグルト乳酸菌によるミルク培地中の溶存酸素低減メカニズムの解明

9:44　◦川嶋紘子，堀内啓史，福井宗徳，山本裕司[1]，向井孝夫[1]，佐々木泰子（明治，[1]北里大獣）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2C24a06　*Paracoccus* sp. 43P 株の L-グルコース代謝経路

10:05　◦清水　哲，高谷直樹，中村　顕（筑波大院生命環境）

2C24a07　*Paracoccus* sp. 43P 由来 L-グルコース代謝経路酵素の立体構造解析

10:16　◦深野和紘，清水　哲[1]，牧　　遼，佐々木康幸，中村　顕[1]，矢嶋俊介（東農大応生科・バイオ，[1]筑波大・生命環境）

2C24a08　好熱性独立栄養性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 におけるエネルギー獲得様式の違いに応じた代謝系の変化

10:27　◦佐藤由也，神邉悠奈，宮野裕介，新井博之，石井正治，五十嵐泰夫（東大院農生科・応生工）

2C24a09　好熱性独立栄養性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 由来 Fructose-1,6-bisphosphatase, aldolase の解析

10:38　◦安間俊輔，亀谷将史，新井博之，石井正治，五十嵐泰夫（東大院農生科・応生工）

2C24a10　好熱性独立栄養性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophiles* TK-6 の二酸化炭素利用性とトランスクリプトーム解析

10:49　◦宮野裕介，佐藤由也，神邉悠奈，新井博之，石井正治，五十嵐泰夫（東大院農生科・応生工）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2C24a11　Gluconacetobacter xylinus IFO3288 におけるアルコール脱水素酵素のサブユニット III

11:10　◦向井妃奈，薬師寿治，松谷峰之介，松下一信（山口大･農）

2C24a12　*A. ferrooxidans* 由来 ubiquinol oxidase 活性における aa_3 型 cytochrome *c* oxidase の関与

11:21　◦杉尾　剛，竹内文章[1]（杉尾化学合成独立栄養細菌研，[1]岡大・環境管理セ）

2C24a13　*E. coli* 細胞内の ATP のダイナミクスを ATP バイオセンサー「ATeam」を用いて解明する

11:32　◦柳沼秀幸[1,2]，冨山圭祐[2]，田端和仁[1]，今村博臣[3]，野地博行[1,2]（[1]東大院工・応化，[2]阪大院生命機能，[3]京大・白眉センター）

2C24a14　好熱性独立栄養性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 における遺伝子導入系の確立

11:43　◦木村真人，新井博之，五十嵐泰夫，石井正治（東大院農生科・応生工）

2C24a15　好熱性水素細菌 Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1 株における形質転換法の確立

11:54　◦五十嵐佳史，木村真人[1]，新井博之[1]，石井正治[1]，五十嵐泰夫[1]（東大・農，[1]東大院農生科・応生工）

C24 会場　午後の部（14:00〜17:48）

微生物—細胞 – 情報伝達，細胞応答，ストレス—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C24p02　酵母 Saccharomyces cerevisia に見出した一酸化窒素合成酵素の機能解析

14:00　◦川原寛弘，西村　明，高木博史（奈良先端大・バイオ）

2C24p03　酵母 Saccharomyces cerevisiae の機能未知遺伝子 POG1 によるリチウム耐性機構の遺伝学的解析

14:11　◦喜多島萌，大城　聡，高木博史（奈良先端大・バイオ）

2C24p04　酵母 Saccharomyces cerevisiae における塩基性アミノ酸の細胞毒性メカニズムの解析

14:22　◦菊島理恵，西村　明，高木博史（奈良先端大・バイオ）

2C24p05　酵母液胞膜の Ca^{2+} 透過性イオンチャネル YVC1 の活性調節機構と生理的役割

14:33　◦浜本　晋，森　泰生[1]，矢部　勇[2]，魚住信之（東北大院工・バイオ工学，[1]京大院工・生化，[2]電機大・工）

2C24p06　酵母におけるカフェイン耐性に関与する Snq2p と Pdr5p の機能解析

14:44　◦辻本善之，大竹一也，渡部邦彦（京府大　院　生命環境）

p08〜p11 発表者の接続時間⑤ 15:06〜15:16

2C24p08　*Saccharomyces cerevisiae* 圧力感受性変異株の遺伝子発現プロファイルの解析

15:16　◦野村一樹[1]，　齋木朋恵[1]，　林真名歩[1]，　林真由美[1]，木戸みゆ紀[2]，　上野茂昭[3]，　井口晃徳[1]，　重松　亨[1]，　岩橋　均[4]，平山匡男[1,5]，藤井智幸[1,3]（[1]新潟薬大･応生科，[2]NICO，[3]東北大院･農，[4]岐阜大・応生科，[5]ブルボン）

2C24p09　圧力耐性が変化した *Saccharomyces cerevisiae* UV 変異株の表現形質の解析

15:27　◦南波　優[1]，　野村一樹[1]，　南須原悠輔[1]，　林真名歩[1]，木戸みゆ紀[2]，　林真由美[1]，　井口晃徳[1]，　重松　亨[1]，　平山匡男[1,3]，上野茂昭[4]，藤井智幸[1,4]（[1]新潟薬大・応生科，[2]NICO，[3]ブルボン，[4]東北大院・農）

2C24p10　遺伝子発現解析とエタノール発酵能に基づく酸耐性酵母の特性評価

15:38　◦灰谷　豊，中村敏英[1]，安藤　聡[1]，小川　順[2]，島　　純（京大・微生物科学，[1]農研機構・食総研，[2]京大院農・応用生命）

2C24p11　7 回膜貫通型熱ショックプロテイン Hsp30p のストレス依存的糖鎖修飾

15:49　◦高畠暁子，加茂研一[1]，井上善晴[1]，井澤真吾（京都工繊大・応生，[1]京大院農・応生科）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C24p12　出芽酵母の膜マイクロドメインにおけるストレス応答

16:10　◦渡邉太史，井澤真吾（京工繊大院工芸科・応生）

2C24p13　熱ショック / エタノール複合ストレスにおける酵母 mRNP granules の形成

16:21　◦山本陽佑，岩城　理，加藤健太，井澤真吾（京工繊大・応生）

2C24p14　乳酸ストレスに応答した酵母 mRNP granules の形成と翻訳制御

16:32　◦岩城　理，山本陽佑，加藤健太，井澤真吾（京都工繊大・応用生物）

2C24p15　酵母 stress granule の分解に関与する因子の探索と解析

16:43　◦加藤健太，岩城　理[1]，山本陽佑，井澤真吾（京工繊大院・応用生物，[1]京工繊大・応用生物）

2C24p16　ストレス応答性リボヌクレアーゼ Rny1p の機能解析

16:54　◦大石早希子，大本哲也，小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東大院農生化・応生工）

p17〜p19 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2C24p17　酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 によるストレス下での原形質膜タンパク質の品質管理機構

17:15　◦清水優子，鈴木悦子，佐々木俊弥，高木博史（奈良先端大・バイオ）

2C24p18　酵母 Saccharomyces cerevisiae の HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 のリン酸化 / 脱リン酸化に関わる酵素の探索

17:26　◦山下由貴，佐々木俊弥，高木博史（奈良先端大）

2C24p19　エリスリトール生産酵母 *Trichosporonoides megachiliensis* における MAPK Hog1 の浸透圧ストレス応答に関わる機能解析

17:37　◦吉田潤次郎，小山善幸[1]，荻原　淳[1]，加藤　順[1]，島　　純[2]，春見隆文[1]（日大院生資科・生資利用，[1]日大・生命化，[2]京大・微生物科学）

C25 会場　午後の部（14:00〜17:48）

微生物—細胞 – 栄養，生育，増殖—，—細胞 – 複合微生物，共生微生物—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C25p02　プラスミドが宿主に与える負荷が軽減された自然変異株の単離と解析

14:00　◦能登　優，高瀬識之，高橋裕里香，山根久和，野尻秀昭（東大生物工学セ）

2C25p03　プラスミドの負荷を軽減する新規遺伝因子の探索

14:11　◦高瀬識之，能登　優，高橋裕里香，松本貴嗣[1]，吉川博文[1]，土金恵子[2]，細山　哲[2]，藤田信之[2]，山根久和，野尻秀昭（東大・生物工学セ，[1]東農大・生物資源ゲノム解析セ，[2]NITE）

2C25p04　*Lactobacills delbrueckii* の伸長細胞の構造解析

14:22　◦石塚和子，稲葉達也，田中尚人[1]，佐藤英一，岡田早苗（東農大応生科・化学，[1]東農大・菌株）

2C25p05　*Lactobacillus delbrueckii* の TMP 合成に与えるビタミン B_{12} の影響

14:33　◦林　徳彦，西前七緒，田中尚人[1]，佐藤英一，岡田早苗（東農大応生科・化学，[1]東農大・菌株）

2C25p06　β-アラビノオリゴ糖鎖の *Bifidobacterium longum* に対する増殖促進効果

14:44　◦藤田清貴，奥山千代美，北原兼文，菅沼俊彦（鹿児島大農・生資化）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C25p07　人工乳栄養児由来糞便培養を用いたヒトミルクオリゴ糖 Lacto-N-biose のプレバイオティック特性の評価

15:05　◦佐藤拓海，　小田巻俊孝，　名村真理子[1]，　清水隆司[1]，西本　完[2]，北岡本光[2]，清水（肖）金忠，岩附慧二（森永乳業株式会社食品基盤研究所，[1]森永乳業株式会社栄養科学研究所，[2]（独）食品総合研究所）

2C25p08　酸素耐性乳酸菌育種方法の開発

15:16　◦山本裕司，濱口翔平，佐々木諒子，向井孝夫（北里大･獣）

2C25p09　耐冷性乳酸菌の低温増殖能力と抗酸化機構の関連

15:27　◦後藤清太郎，川本　純[1]，佐藤　智[2]，壱岐　隆，工藤和幸，江崎信芳[1]，栗原達夫[1]（日本ハム(株) 商開研，[1]京大化研，[2]京大 LTM センター）

2C25p10　大腸菌のコロニー形成能を失った変異株の分離

15:38　安原幸司，池端佑仁，三井智玄，小川哲弘，日高真誠，◦正木春彦（東大院農生科・応生工）

2C25p11　大腸菌のコロニー形成能を失った変異株の分析

15:49　◦三井智玄，池端佑仁，安原幸司，小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東大院農生科・応生工）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C25p12　硫黄酸化細菌と共生している深海底生生物の長期飼育装置の開発

16:10　◦小西正朗，和辻智郎，武田美雪，中川　聡[1]，秦田勇二，高井　研，豊福高志（海洋研究開発機構，[1]北大院水産）

2C25p13　「発表時間移動」

2C25p14　Development of multifunctional microbial fertilizers by applying indigenous nitrogen-fixing bacteria and photosynthetic bacteria in Taiwan

16:32　◦Chi-Te Liu[1,2]，　Waitak Wong[1,3]，　Jin-Han Tseng[1]，Zhu-Ning Huang[1]，Huu-Sheng Lur[3]（[1]Inst Biotech, National Taiwan University, [2]Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica, Taipei, 115, Taiwan, [3]Department of Agronomy, National Taiwan University）

2C25p15　ゲニステインで共生初期に強く誘導されるダイズ根粒菌の共生領域外ゲノム領域の解析

16:43　◦武島圭介，日高達夫，魏　　敏[1]，横山　正[2]，南沢　究[3]，三井久幸[3]，　板倉　学[3]，　金子貴一[4]，　田畑哲之[5]，　佐伯和彦[6]，大森博文[7]，　田島茂行[8]，　内海俊樹[9]，　阿部美紀子[9]，　大和田琢二（帯畜大・食品科学，[1]蘭州大・生命科学，[2]東京農工大・農，[3]東北大･院生命科，[4]京都産業大･工，[5]かずさ DNA 研，[6]奈良女子大･理，[7]大阪大・院理，[8]香川大・農，[9]鹿児島大・院理工）

2C25p16　Agrobacterium から出芽酵母への T-DNA 輸送システムに関わる遺伝子の探索

16:54　◦大嶺悠太，佐藤由香里，清川一矢，山本真司，守口和基，鈴木克周（広島大院・理）

p17〜p19 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2C25p17　清酒酵母と乳酸菌の複合バイオフィルム形成と共凝集に関する研究

17:15　◦土屋典子，古川壮一，荻原博和，森永　康（日大院・生資科）

2C25p18　酵母と乳酸菌の複合バイオフィルムを利用したアルコール発酵

17:26　◦阿部　侑，今井巧大，深瀬　栄，古川壮一，荻原博和，森永　康（日大院・生資科）

2C25p19　酵母と乳酸菌の複合バイオフィルム形成プロセスの解析

17:37　◦平山　悟，吉田可奈子，能島菜積，古川壮一，新井直人，荻原博和，森永　康（日大院・生資科）

C26 会場　午後の部（14:00〜17:48）

動物—生理 – 栄養，糖質，脂質，タンパク質—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C26p02　タンパク質栄養条件の違いにより変動する表皮タンパク質のプロテオーム解析
14:00 ○藤田尚子，岡田歩美，町田千代美，服部一夫，大石祐一（東農大・応生科）

2C26p03　人工甘味料の長期的摂取によるラット生体への影響
14:11 ○原田尚志[1]，牛尼翔太[1]，石島智子[1]，阿部啓子[1,2]，中井雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]KAST）

2C26p04　摂食によりラット末梢組織で生じる遺伝子発現変動の時系列解析
14:22 ○牛尼翔太[1]，石島智子[1]，阿部啓子[1,2]，中井雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]KAST）

2C26p05　ザクロ抽出物およびエラグ酸によるタンパク質分解亢進を介したレジスチン分泌抑制効果
14:33 ○若木泰子，吉村征浩，鵜澤有希，財満信宏，森山達哉，河村幸雄（近大院・農・応生化）

2C26p06　脂質代謝改善作用を有するトマト由来機能性成分の品種間含有量比較及び安定性評価
14:44 ○高橋春弥，金　英一，平井　静，後藤　剛，大矢根智恵，津金胤昭[1]，　小西千秋[2]，　藤井　崇[2]，　稲井秀二[2]，　飯島陽子[3]，青木　考[3]，柴田大輔[3]，高橋信之，河田照雄（京大院農・食品生物，[1]千葉農林総研，[2]日本デルモンテ，[3]かずさ DNA 研）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C26p07　マウス第 12 番染色体上の脂肪肝感受性に関与する遺伝子の探索
15:05 ○小林美里，立石壮志，都築佳奈，大野民生[1]，村井篤嗣，堀尾文彦（名大院・生命農・応用分子生命科，[1]名大院・医）

2C26p08　ABCG5 に変異のある WKY/NCrlCrlj ラットの植物ステロール蓄積への T0901317 摂取の影響
15:16 ○加藤正樹，村田みのり，井上奈穂，都築　毅，池田郁男（東北大院農・食品化学）

2C26p09　高コレステロール食摂取ラットにおける肝臓脂質代謝に及ぼす乳酸発酵豆乳の影響
15:27 ○小林麻貴，平畑理映[1]，小野三起子[1]，江草信太郎[2]，都築公子[2]，福田　滿（武庫川女子大生環・食栄，[1]武庫川女子大院生環・食栄，[2]マルサンアイ・開発統括部）

2C26p10　Allyl isothiocyanate の投与による糖質代謝亢進の作用機序の解明
15:38 ○森　紀之，倉田真奈美[1]，山崎英恵[1]，灘本知憲，伏木　亨[1]（滋賀県大・人間文化，[1]京大・農）

2C26p11　カロリー制限による脂質代謝制御機構の解析
15:49 ○松本知大，小森邦弘，小田裕昭（名大院生命農・応用分子生命科）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C26p12　Bcl11b による脂肪細胞分化制御機構の解析
16:10 ○井原悠介，　神田美里，　篠田旭弘，　Shimizu Makoto，井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

2C26p13　MIG12 による脂肪酸合成制御機構の解明
16:21 ○宮田慎吾，　池内江美奈，　Shimizu Makoto，　井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

2C26p14　小胞体ストレス関連因子 ATF6 による脂質代謝制御機構の解析
16:32 ○丸山竜人，　鴨志田祐己，　Makoto Shimizu，　井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

2C26p15　小腸における新規小胞体ストレス応答遺伝子の解析
16:43 ○清水　誠，李　　娟，丸山竜人，井上　順，佐藤隆一郎（東大院・農生化・応生化・食生化）

2C26p16　核内受容体 SHP mRNA 安定性に及ぼすブドウ種子プロシアニジン抽出物の効果
16:54 ○井上　順，　田中美奈子，　南木麻奈美，　八代拓也，Shimizu Makoto，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

p17〜p19 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2C26p17　培養骨格筋細胞における AMPK の機能解析
17:15 ○佐々木崇，　Shimizu Makoto，　井上　順，　佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）

2C26p18　*Lactobacillus reuteri* 腸管付着因子と受容体様因子の相互作用
17:26 ○上野仁美，松尾洋輔，小林達哉，岡田早苗，佐藤英一（東農大応生科・化学）

2C26p19　慢性閉塞性肺疾患（COPD）動物モデルを用いた病態進行における栄養状態の変化
17:37 ○大塩和孝，中村浩彦，難波和美，関根一則，高瀬光徳（森永乳業・栄科研）

C27 会場　午前の部（9:00〜11:43）

動物—遺伝子・タンパク質 – 構造，機能—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2C27a01　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来鉄結合タンパク質 TTHA1628 の X 線結晶構造解析
9:00 尾方美沙樹，○堀田彰一朗，大塚　淳，岡田晃季[1]，永田宏次，田之倉優（東大院農生科・応生化，[1]東大院理・生化）

2C27a02　ALG-2 と COP Ⅱ小胞構成因子 Sec31A の結合領域ペプチドとの複合体の X 線結晶構造解析
9:11 ○高橋　健，犬塚達俊，鈴木博紀[1]，伊藤　優，川崎政人[1]，若槻壮市[1]，柴田秀樹，牧　正敏（名大院生命農・応用分子生命科，[1]高エネ研・物構研）

2C27a03　クラゲコラーゲンペプチドの皮膚への効果
9:22 ○猪爪優子[1,2]，番戸博友[2]，益田晶子[1]，松田光夫[2]，堂前　直[1]（[1]理研バイオ解析，[2]日華化学）

2C27a04　ニワトリ peptidylarginine deiminase type I の酵素化学的性質の解析と組織発現
9:33 ○清水　明[1]，小島俊雄[1,2]，高原英成[1,2]（[1]東農工大院・連合農学，[2]茨城大・農）

2C27a05　importin *α* 断片をタグに用いた生細胞内での蛍光蛋白質の 2 量体形成傾向の簡便な評価法
9:44 ○中川千雅，西村重徳，村田香織，杉本憲治（阪府大院・生命環境）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2C27a06　ヒト ABCG1 の精製および活性評価
10:05 ○平山裕士[1]，木村泰久[1]，松尾道憲[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大 iCeMS）

2C27a07　ヒト培養細胞を用いた哺乳類膜タンパク質大量生産系 -K_{ATP} チャネル複合体の精製 -
10:16 ○木村泰久[1]，菅野　亮[2]，松尾道憲[1]，木岡紀幸[1]，光岡　薫[3]，加藤博章[4]，植田和光[1,5]（[1]京大院・農・応用生命，[2]JBiC，[3]産総研，[4]京大院・薬，[5]京大 iCeMS）

2C27a08　カイコ絹糸腺由来転写制御因子 FMBP-1 の蛍光相関分光法による解析
10:27 ○堤　元佐，明庭昇平，武藤秀樹[1]，木本　舞[2]，神谷昌克，菊川峰志，相沢智康，滝谷重治[2]，金城政孝[1]，出村　誠，河野敬一（北大院生命・生命科学，[1]北大院先端生命・細胞機能，[2]北大院理・生物科学）

2C27a09　UHRF1 は受動的 DNA 脱メチル化後の DNA 損傷誘導に関与する
10:38 ○杉村和人，来馬啓介[1]，杉浦健太[1]，緒方正人，奥村克純[1]（三重大院・医，[1]三重大院・生資）

2C27a10　ウナギシトクロム P450 の機能解析

10:49 ○山本貢平，梶　悟，小倉千佳，金丸研吾，山形裕士，上西由翁[1]，板倉隆夫[1]，宇野知秀（神戸大・農，[1]鹿大・水）

a11〜a13 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2C27a11　上皮組織特異的 Lgr4 欠損マウスは不妊を示す
11:10 ○曽根瑞季，毛利泰彰，大山一徳，加藤成樹，那波明宏[1]，西森克彦（東北大院農・応生科，[1]愛媛大医・生殖病態外科学）
2C27a12　RNAi 実験を用いた，線虫 *C.elegans* の RNA 結合タンパク質である CeMBL 遺伝子の選択的スプライシング発現産物が持つ機能の追及
11:21 ○鈴木俊輔，笹川　昇（東海大工・生命化学）
2C27a13　骨分化誘導タンパク質 NELL1 の多量体形成機構の解析
11:32 ○長谷部愛，黒田俊一，新美友章（名大院・生命農）

C27 会場　午後の部（14:00〜16:43）

動物—遺伝子・タンパク質 – 発現制御—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C27p02　CREB と Erk の活性化を指標とした恐怖記憶強化及び消去を制御するニューロン集団の同定
14:00 ○張　悦[1,2]，福島穂高[1,2]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大・農・バイオ，[2]CREST）
2C27p03　社会的認知記憶固定化と再固定化を制御する脳領域の同定
14:11 ○谷水俊之[1]，門間和音[1]，岡野絵美子[1]，張　悦[1,2]，福島穂高[1,2]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院･農･バイオ，[2]JST CREST）
2C27p04　転写因子 CREB 情報伝達系活性化による学習能力の向上
14:22 ○芹田龍郎[1]，福島穂高[1,2]，喜田　聡[1,2]（[1]東農大院・農・バイオ，[2]JST・CREST）
2C27p05　恐怖記憶再固定化と消去誘導時の海馬と扁桃体における細胞内情報伝達機構の解析
14:33 ○稲葉洋芳[1]，張　悦[1,2]，金　亮[1]，間宮　則[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院・農・バイオ，[2]CREST・JST）
2C27p06　転写調節因子 PU.1 による MHC class II 発現調節機構
14:44 ○西山千春[1]，北村奈緒[1]，八代拓也[1]，吉田彩子[1,2]，横山北斗[1,2]，中野信浩[1]，原むつ子[1]，金田俊介[1]，小川秀興[1]，西山　真[2]，奥村　康[1]（[1]順天堂大・医・アトピー疾患研究センター，[2]東大・生物生産工学研究センター）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C27p07　PU.1 による Th2 サイトカイン発現抑止機構の解析
15:05 ○八代拓也，小川秀興，奥村　康，西山千春（順天堂大・医・アトピー疾患研究センター）
2C27p08　情動行動制御に対するレチノイン酸情報伝達系の役割の解析
15:16 ○齋藤香織[1]，野本真順[1,2]，内田周作[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院・農・バイオ，[2]CREST・JST）
2C27p09　メマンチン投与による成体海馬神経新生促進と海馬依存的学習・記憶形成能力の向上
15:27 ○石川理絵[1]，金　亮[1]，難波隆志[2]，高坂新一[2]，内野茂夫[2]，喜田　聡[1,3]（[1]東農大院・農・バイオ，[2](独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所，[3]CREST.JST）
2C27p10　前脳領域サーカディアン転写リズムによる時間帯依存的な記憶想起制御
15:38 ○長谷川俊介[1,2]，太田美穂[1]，中村あずみ[1]，齋藤香織[1]，細田浩司[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東農大･応生科･バイオ，[2]CREST･JST）
2C27p11　プロテアソーム依存的タンパク質分解と新規遺伝子発現を介した想起後の受動回避記憶強化
15:49 ○福島穂高[1,2]，張　悦[1,2]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大・応生科・バイオ，[2]JST・CREST）

p12〜p14 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C27p12　セリン合成酵素 Phgdh 欠損線維芽細胞に惹起される炎症反応の分子機序
16:10 ○濱野桃子，佐矢野智子，鵜殿美弥子，小川拓哉[1]，片倉喜範，加藤久典[2]，古屋茂樹（九州大・生資環，[1]奈良先端大・バイオ，[2]東京大・食と生命）
2C27p13　ATF5 mRNA 5' 非翻訳領域を介した NMD による新規ストレス応答性 mRNA 安定化機構
16:21 ○幡野仁哉，梅村真理子，中野春男，高橋　滋，高橋勇二（東薬大・生命）
2C27p14　mRNA 輸送因子 UAP56 と URH49 の形成する異なる複合体構築機構の解明
16:32 ○藤田賢一，宮前友策，永尾雅哉，神戸大朋，増田誠司（京大生命・統合生命）

C28 会場　午前の部（9:00〜12:05）

動物—無脊椎動物 – 生理，細胞，遺伝子，タンパク質—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2C28a01　カイコにおける摂食行動調節因子 short neuropeptide F およびその受容体の発現解析
9:00 ○大原彩子，永井千晶，河合岳志，永田晋治，長澤寛道（東大院農生科・応生化）
2C28a02　カイコにおけるイオン輸送ペプチド(ITP)および ITP-like(ITPL)の受容体の機能解析
9:11 ○永井千晶，永田晋治，長澤寛道（東大院農生科・応生化）
2C28a03　フタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)における脂質動員ホルモン(AKH, adipokinetic hormone)が制御する体液中の脂質および糖質のレベルと摂食行動との関連性の解析
9:22 ○小沼貴裕，永田晋治，長澤寛道（東大院 農生科 応生化）
2C28a04　カイコ摂食モチベーション調節ペプチド HemaP の結合タンパク質の同定および機能解析
9:33 ○諸岡信克，永田晋治[1]，長澤寛道[1]（群大･生体調節，[1]東大院・農生科）
2C28a05　カイコ *Bombyx mori* の前額神経球のペプチドプロファイリング
9:44 ○永田晋治，長澤寛道（東大院・農生科・応生化）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2C28a06　カイコガ PBAN 受容体の高発現，精製，活性測定，結晶化
10:05 ○永田宏次，海老沢樹，夏目　亮[1]，千田俊哉[1]，河合岳志，早川　江，大塚　淳，永峰俊弘[2]，栗原政明[2]，李載みん[2]，HULL J. Joe[3]，松本正吾[2]，長澤寛道，田之倉優（東大院農生科･応生科，[1]産総研・BIRC，[2]理研・松本分子昆虫学，[3]米農務省農研局・乾燥地研セ）
2C28a07　昆虫幼若ホルモンエポキシドヒドロラーゼ遺伝子の解析
10:16 ○塩月孝博，坪田拓也（農生資研）
2C28a08　アワヨトウ性フェロモン生合成に関わるアシル基還元酵素遺伝子
10:27 ○本　賢一，李載みん，栗原政明，永田宏次[1]，田之倉優[1]，長澤寛道[1]，松本正吾（理研・松本分子昆虫学，[1]東大院農生科・応生化）
2C28a09　フェロモン生合成活性化ペプチド(PBAN)の構造活性相関に関する研究
10:38 ○河合岳志，李載みん[1]，永田宏次，松本正吾[1]，田之倉優，長澤寛道（東大院・農生科・応生化，[1]理研基幹研・分子昆虫）
2C28a10　ボンビコール産生経路における昆虫 PAT ファミリータンパク質 BmLsd1 の機能解析
10:49 ○大西　敦，加治美里，橋本佳奈，松本正吾（理研・松本分子昆虫学）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2C28a11　異なるカイコ発現系により生産したタンパク質の解析

11:10 ◦梶浦裕之，立松謙一郎[1]，野村　雄[2]，宮澤光博[1]，瀬筒秀樹[1]，宇佐美昭宏[2]，田村俊樹[1]，藤山和仁（阪大生物工学国際交流セ，[1]生物資源研，[2]シスメックス株式会社）

2C28a12　昆虫類の化学＆光コミュニケーションとヒトの科学コミュニケーション

11:21 ◦笹川浩美（(財)国際科学振興財団 FAIS （独)科学技術振興機構 JST・日本科学未来館）

2C28a13　細胞膜での抑制性グルタミン酸受容体の発現量に影響する因子

11:32 ◦古谷章悟，山口武則，神橋貴彦，赤松美紀[1]，入江貴裕[2]，尾添嘉久[2]，松田一彦（近畿大農・応生化，[1]京都大院・農・地環科，[2]島根大・生資科）

2C28a14　線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチド INS-17 の発現とその制御機構

11:43 ◦中島健輔[1]，松永洋平[2]，玄行-安藤恵子[3,4]，三谷昌平[3,4]，河野　強[1,2]，岩崎　崇[1,2]（[1]鳥取大農・生物資源科学，[2]鳥取大院・連合農学，[3]東京女子医大院・生理，[4]CREST・JST）

2C28a15　線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチド INS-35 の幼虫休眠制御機構

11:54 ◦松永洋平[1]，片山侑希[2]，岩崎　崇[1,2]，河野　強[1,2]（[1]鳥大院・連農研，[2]鳥大院・農研）

C28 会場　午後の部（14:00〜18:10）

動物—生理 – 生体機能，生体制御—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C28p02　エクジステロイド分泌の変動に着目したショウジョウバエの蛹形成メカニズムの解析

14:00 ◦増田亮太，吉永直子，森　直樹，西田律夫，小野　肇（京大院農）

2C28p03　乳腺および乳頭形成におけるマウス *Mab21l1* 遺伝子の機能解析

14:11 ◦浅野真也，尾上貴俊，長瀬裕樹，小島拓哉，高橋直樹（東大院農生科・応生化）

2C28p04　糖化タンパク質受容体 RAGE の細胞接着機能の解析

14:22 ◦大幸　巧，藤木祐輔，早瀬文孝[1]，渡辺寛人（明治大農・生命科，[1]明治大農・農化）

2C28p05　$NaIO_4$誘導性ラット腹腔滲出細胞の構成解析およびリポ多糖存在下でのサイトカイン産生

14:33 ◦安藤　翠，岩谷一史，柏谷宗紀，原　博，石塚　敏（北海道大・院農）

2C28p06　S100A12 タンパク質は腸管上皮細胞において RAGE 依存的な細胞死を制御する

14:44 ◦松本朋大，小暮優太，石田充代，針谷敏夫，早瀬文孝[1]，渡辺寛人（明治大農・生命科，[1]明治大農・農化）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C28p07　Differential Effects of the Oxytocin/Oxytocin Receptor gene Expression in the Brain via Variable Contribution of Prader-Willi syndrome.

15:05 ◦Maki SASAKI, Keisuke SATO[1], Yoshiyuki KASAHARA[1], Kazuaki YOSHIKAWA[2], Katsuhiko NISHIMORI[1]（Dep of Mol., Cell Biol., Grad Sch., Agric., Sci., Tohoku Univ, [1]Dep of Mol., Cell Biol., Grad Sch., Agric., Sci., Tohoku Univ, [2]Lab of Reg., Neuro Dev., Inst Protein Res., Osaka Univ）

2C28p08　中枢神経系におけるタンパク質 B23 の局在とリン酸化について

15:16 ◦向井工智，西尾昌洋，梅川逸人（三重大院生資）

2C28p09　*β*-1,3-glucan によるラット網膜虚血 / 再灌流後の神経細胞死抑制効果

15:27 ◦汲田友佑，西尾昌洋，磯野直人，宇治幸隆[1]，梅川逸人（三重大院生資，[1]三重大院医）

2C28p10　味蕾におけるアノクタミンファミリーの細胞種特異的発現

15:38 ◦黒川あずさ，應本　真，阿部啓子，三坂　巧（東大院農・応生化）

2C28p11　OXT/OXTR システムによる母性行動の解析

15:49 ◦浅山瑛美，長田大知，山下晃人，佐藤佳亮，佐々木真紀，水上浩明[1]，西森克彦（東北大院・農，[1]自治医大）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C28p12　脂肪組織に見出された線溶酵素 chymase の肥満における役割について

16:10 ◦菊澤美沙子，安藤有厚，関根　瞳，細野　崇，有賀豊彦，関泰一郎（日大院・生資科・応生科）

2C28p13　ケトン体 Acetoacetate の脂肪細胞における脂質代謝に与える影響

16:21 ◦原久美子，高橋信之，植田容未，後藤　剛，河田照雄（京大院農・食品生物）

2C28p14　肺癌細胞 LLC 移植マウスにおける血清および肝臓脂質レベルならびに脂質関連パラメータの経時変動

16:32 ◦川崎雅志（岩手県大・盛岡短大・生活科学）

2C28p15　ガーリックオイルが高脂肪食負荷モデルラットに及ぼす影響

16:43 ◦香川祐輝，須田祐輔，渡辺智之，細野　崇，有賀豊彦，関泰一郎（日大生資科・農化）

2C28p16　肥満動物の食事療法による急激な減量は，筋肉や骨密度にも影響する

16:54 ◦素本友紀，山田明男，樋田知宏，岩附慧二（森永乳業食基研）

p17〜p21 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2C28p17　長期運動が白色脂肪組織線溶酵素 adipomin/chymase に及ぼす影響

17:15 ◦関根　瞳，菊澤美沙子，釵崎新一，安藤有厚，細野　崇，有賀豊彦，関泰一郎（日大院・生資科・応生科）

2C28p18　かつおだしの美味しさに関与する因子：脂肪・砂糖摂取と食経験 / 学習の関与

17:26 ◦近藤高史，松永哲郎，椎名貴彦[1]，志水泰武[1]（京大院･農･食の未来戦略，[1]岐阜大・応用生物科学）

2C28p19　外界からのストレス刺激がマウス肝臓中時計関連遺伝子の発現に与える影響

17:37 ◦青島良輝[1]，榊原啓之[1,2]，山崎隼輔[1]，鈴木敦美[1]，下位香代子[1,2]（[1]静岡県大・院・生活健康，[2]静岡県大・環境研）

2C28p20　小胞体分子シャペロン ER-60 の基質結合ドメインとアミロイド *β* ペプチド複合体の結晶構造解析

17:48 ◦伊中浩治，古林直樹，裏出良博[1]，魚留信子[1]，鶴村俊治[1]，和田濱裕之[2]，裏出令子[2]（丸和栄養食品，[1]大阪バイオ研，[2]京大院･農）

2C28p21　脳における ER-60 の発現量とレプチン作用との関係

17:59 ◦裏出令子，　和田濵裕之，　有竹浩介[1]，　永田奈々恵[1]，裏出良博[1]（京大院・農，[1]大阪バイオ研）

C29 会場　午前の部（9:00〜11:32）

動物—細胞 – 細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2C29a01　HDL 産生を担う ABCA1 の 1 分子イメージング

9:00 ◦永田　紘[1]，　中田千枝子[1,2]，　笠井倫志[2]，　楠見明弘[1,2]，植田和光[1,3]（[1]京大・iCeMS，[2]京大・再生研，[3]京大・院農）

2C29a02　神経疾患に関連する ABCA13 の SNP が ABC タンパク質の機能に与える影響

9:11 ◦冨岡麻衣子[1,2]，木村泰久[1]，植田和光[1,2]（[1]京都大院・農，[2]京都大・iCeMS）

2C29a03　コレステロール合成に対する ABCG1 の役割の解析

9:22 ◦渡邊太郎[1]，平井絢子[1]，植田和光[1,2]，松尾道憲[1]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大・iCeMS）

2C29a04　ABCA1 と ABCG1 によるコレステロール排出のハイ

スループット測定系の開発
9:33 ◦松尾道憲，江澤美智，植田和光[1]（京大院・農，[1]京大・iCeMS）
2C29a05　哺乳動物細胞小胞体膜に局在する DNAJB12 は変異型 SOD1 の分解を促進する
9:44 ◦保田裕貴，山本洋平，門倉　広，河野憲二（奈良先端大・バイオ）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2C29a06　哺乳動物細胞小胞体におけるジスルフィド結合形成を解析する為の新規レポーターの作成
10:05 ◦門倉　広，河野憲二（奈良先端大バイオ）
2C29a07　ペルオキシソーム形成不全 CHO 細胞におけるコリン代謝の異常
10:16 ◦市来弥生[1,2]，奥　公秀[1,2]，由里本博也[1,2]，藤木幸夫[3,2]，阪井康能[1,2]（[1]京大院農・応用生命，[2]CREST，[3]九大院理院・システム生命）
2C29a08　TAFI による肝細胞死制御機構の解明
10:27 ◦石井佳澄，重松裕美，安藤由夏[1]，池田克幸[1]，大路拓巳[1]，奥村暢章，細野　崇，有賀豊彦，関泰一郎（日大院生資科応生科，[1]日大生資科生命化）
2C29a09　筋肉細胞における EGCg の糖代謝に及ぼす影響について
10:38 ◦上田　学，上田修司，白井康仁，芦田　均（神戸大院・農）
2C29a10　SOCS7 は LPA2 受容体を介する LPA 誘導性細胞増殖を負に制御する
10:49 ◦和田菜々枝，小島裕久，舛廣善和，花澤重正（日大生資科・応生科）

a11〜a12 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2C29a11　腸上皮様細胞株 Caco-2 は分化に伴い H1 型組織血液型抗原とは異なるノロウイルス VLP 結合分子を発現する
11:10 ◦村上耕介，岡智一郎，下池貴志，脇田隆字，松田　幹[1]，片山和彦（国立感染研・ウイルス二部，[1]名大院生命農・応用分子生命科）
2C29a12　U937 細胞における抗 CD98 抗体依存性細胞融合阻害物質の探索
11:21 ◦桂川美咲[1]，秋山智美[1]，伊藤守弘[2]，伊藤康彦[2]，中川　大[1]，永井和夫[1]，　禹　済泰[1,3]，　車　炳允[3]，　飯田加賀美[3]，　大西素子[1]（[1]中部大・応生，[2]中部大・生命，[3]中部大・生物機能開発研）

C29 会場　午後の部（14:00〜16:43）

動物—細胞 – 情報伝達，細胞応答—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2C29p02　無細胞タンパク質合成系とクリックケミストリーを用いた新規 N-ミリストイル化タンパク質の同定
14:00 ◦高光恵美，乗安義実，岡村　剛，福重大地，守屋康子，内海俊彦（山口大院・医・応用分子）
2C29p03　I 型 cGMP 依存性キナーゼによる TRPC6 チャネルの制御機構に関する構造機能解析
14:11 ◦本田　啓，井上隆司（福岡大・医）
2C29p04　cGMP 依存性プロテインキナーゼ(cGK)の新規基質同定
14:22 ◦一色衣香，湯浅恵造，辻　明彦（徳島大・STS 研究部）
2C29p05　glabridin によるプロテインホスファターゼ 2Cα の活性化と破骨細胞分化への影響
14:33 ◦秋山智美，青山友果，油井信弘[1]，木村賢一[1]，池原　強[2]，永井和夫，禹　済泰，大西素子（中部大・応生，[1]岩手連大・農，[2](株)トロピカルテクノセンター）
2C29p06　接着斑タンパク質ビンキュリンは脂質ラフトに局在する
14:44 ◦長里彩花[1]，山下　寛[1]，市川尚文[1]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]（[1]京都大院農・応用生命，[2]京大・iCeMS）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2C29p07　PKCeta によるケラチノサイト分化機構の解明
15:05 ◦白井康仁，盛岡祥子[1]，佐久間恵[1]，千田和広[2]，斎藤尚亮[1]（神戸大・農，[1]神戸大・バイオ研，[2]東京大・農）
2C29p08　腸間膜リンパ節の T 細胞活性化機能に及ぼすストレスタンパク質の影響
15:16 ◦橋本惠以[1]，星澤奈央子[2]，桝田哲哉[1,3]，谷　史人[1,3]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大農・食品生物，[3]京大院・地球環境）
2C29p09　TIPE2 は TAK1 のリン酸化を抑制することで TLR シグナルを負に制御する
15:27 ◦大穂満隆，櫻井　渉，中山隆太郎，小島裕久，舛廣善和，花澤重正（日大・生物資源・応生科）
2C29p10　TLR シグナルに対するデオキシニバレノールの阻害メカニズムの解明
15:38 ◦木下麻緒[1,2]，小西良子[1]，薬袋裕二[2]，杉山圭一[1]（[1]国立衛研・衛微，[2]玉川大院農・資源生物）
2C29p11　マスト細胞の IL-4 産生が Notch シグナルによって増強されるメカニズムの解析
15:49 ◦中野信浩，西山千春，小川秀興，奥村　康（順天堂大・医・アトピー疾患研究センター）

p12〜p14 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2C29p12　J_2型プロスタグランジンによる血清成分依存的な炎症誘導機構の解析
16:10 ◦柴田貴広，森下望美，山口　悟，河合慶親，内田浩二（名大院生命農・応用分子生命科）
2C29p13　シアル酸認識レクチンによるマクロファージの機能調節
16:21 ◦西島謙一，庄司　徹，財津芳紀，飯島信司（名大・工）
2C29p14　終末糖化産物が脂肪細胞と尿細管上皮細胞に及ぼす影響について
16:32 ◦柳田加奈子，田部敬太[1]，深山ゆりえ[1]，沈　　燕，細野　崇，有賀豊彦，関泰一郎（日大院・生資科・応生科，[1]日大・生資科・生命化）

A30 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物—環境応答，ストレス応答，生物間相互作用—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2A30a01　シロイヌナズナにおけるアスコルビン酸再生系酵素群の分子特性および生理機能
9:00 ◦丸田隆典，山田宏機[1]，野志昌弘[1]，田茂井政宏[1]，石川孝博，重岡　成[1]（島根大・生資科・生命工，[1]近畿大・農・バイオ）
2A30a02　光および葉緑体シグナリングによるアスコルビン酸およびトコフェロール生合成系の制御機構
9:11 ◦田中裕之，丸田隆典[1]，薮田行哲[2]，石川孝博[1]，田茂井政宏，重岡　成（近畿大院・農・バイオ，[1]島根大・生資科・生命工，[2]鳥取大・農・生資環）
2A30a03　葉緑体 H2O2 シグナリングを介したストレス応答におけるフェルラ酸ヒドロキシラーゼの生理機能
9:22 ◦中村茉樹[1]，松田　峻[2]，野志昌弘[1]，丸田隆典[3]，田茂井政宏[1,2]，石川孝博[3]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]近畿大院・農・バイオ，[3]島根大・生資科・生命工）
2A30a04　葉緑体由来の H_2O_2シグナリングに関与する転写因子の機能解析
9:33 ◦松田　峻[1]，山崎彩香[2]，野志昌弘[2]，芦田奈々[3]，丸田隆典[3]，田茂井政宏[1,2]，吉村和也[4]，石川孝博[3]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]島根大・生資科・生命工，[4]中部大・応生・食栄）
2A30a05　気孔閉口運動におけるカタラーゼの役割
9:44 Jannat Rayhanur，裏地美杉，諸藤美穂，Hossain Mohammad A，Islam Mohammad M，Bloom Rachel E.[1]，中村宜督，McClung C. R[2]，Schroeder JI.[1]，◦森　　泉[3]，村田芳行（岡山大・自，[1]カリフォルニア大サンディエゴ，[2]ダートマス大，

[3]岡山大・植物研）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2A30a06　イネのストレス応答とトレハロース代謝
10:05　藪内威志[1,2]，島　周平[1,2]，佐分利亘[2]，松井博和[2]，◦今井亮三[1,2]（[1]農研機構・北農研，[2]北大院・農）

2A30a07　イネカリウム / ナトリウム輸送体 HKT の耐塩性における機能
10:16　◦森田重人，丹波奈津美，古市卓也[1]，且原真木[1]，矢内純太，増村威宏，佐藤　茂，仲山英樹[2]，新名惇彦[3]（京府大生命環境，[1]岡山大植物研，[2]長崎大水産環境，[3]奈良先端大バイオ）

2A30a08　過冷却ストレス影響下でのタバコ培養細胞 BY-2 における PCD の検出
10:27　◦生月俊也，鳴海　明[1]，飯田泰広（神奈川工科大・応用バイオ，[1]神奈川工科大・工）

2A30a09　非生物的ストレス負荷によるヒユ科植物のタンパク質ニトロ化
10:38　◦植木達也，橋床泰之，崎浜靖子（北大院農）

2A30a10　N 末端アセチル化修飾による葉緑体 ATP 合成酵素 ε サブユニットの量的制御
10:49　◦星安紗希，吉田和生，藤原正幸，深尾陽一朗，横田明穂，明石欣也（奈良先端大・バイオ）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2A30a11　植物オルガネラ DNA の酸化損傷が環境ストレス耐性能に及ぼす影響
11:10　◦伊藤大輔[1]，重山佳太[2]，辻村昌希[1]，石川和也[2]，吉村和也[3]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]中部大・応生・食栄）

2A30a12　タイリングアレイ法によるシロイヌナズナ強光ストレス応答性 ASF/SF2 様 SR タンパク質，atSR30 による選択的スプライシング制御機構の解析
11:21　◦横山国大[1]，東川将大[2]，若葉　亮[2]，森　達也[3]，田部記章[3]，丸田隆典[4]，佐藤信雄[5]，高橋広夫[5,6]，重岡　成[3]，吉村和也[1,2]（[1]中部大院・応生，[2]中部大・応生・食栄，[3]近畿大・農・バイオ，[4]島根大・生資科・生命工，[5]中部大・植物バイオ，[6]中部大・応生・応化）

2A30a13　グルタチオンペルオキシダーゼ, AtGPX8 によるレドックス制御を介したストレス応答 / 耐性の分子機構
11:32　◦尾形知哉[1]，北島一樹[2]，中神莉彩[3]，吉村和也[3]，丸田隆典[2,4]，Ahmed Gaber[2]，田茂井政宏[1,2]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]中部大・応生・食栄，[4]島根大・生資科・生命工）

2A30a14　シロイヌナズナ葉緑体型 Nudix hydrolase（AtNUDX19）による NADPH 代謝を介した強光ストレス応答機構
11:43　辻村昌希[1]，問田英里[2]，吉田幸史[2]，池本圭輔[2]，丸田隆典[3]，田茂井政宏[1,2]，◦吉村和也[4]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]島根大・生資科・生命工，[4]中部大・応生・食栄）

2A30a15　シロイヌナズナにおけるストレス応答性遺伝子を用いた植物ホルモンバランスの解析
11:54　◦有野　梓[1]，永田真紀[1,2]，仲下英雄[1,2]（[1]東農大，[2]理研）

A30 会場　午後の部（14:00〜17:59）

植物—環境応答，ストレス応答，生物間相互作用—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2A30p02　イソチオシアネートによる植物高温耐性向上効果
14:00　◦原崎安紀乃，田端杏子，原　正和（静岡大農・応生化）

2A30p03　塩・乾燥ストレスに応答するミヤコグサ ARM-repeat Protein 遺伝子の特徴付け
14:11　◦野口和斗，斎藤祐一，梅崎修平，高原英成，小島俊雄（茨城大・農・生化）

2A30p04　イネのジャスモン酸応答性 MYB 遺伝子 JAmyb の非生物的ストレス応答への関与
14:22　横谷尚起，市川尚斉[1]，近藤陽一[1]，岩渕雅樹，松井　南[1]，廣近洋彦[2]，◦小田賢司（岡山生物研，[1]理研 PSC，[2]生物資源研）

2A30p05　カンバ・リター抽出物のフィンランド森林限界線付近にあるカンバ林・林床土壌微生物の窒素固定に対する寄与
14:33　◦礒田玲華，原新太郎，Tahvanainen Teemu[1]，橋床泰之（北大院農・応生科，[1]UEF）

2A30p06　ナミハダニ内部共生細菌は被食害植物の防御応答反応を調節する
14:44　◦植田浩一，小澤理香[1]，Massimo Maffei[2]，後藤哲雄[3]，高林純示[1]，松田一彦（近畿大・農，[1]京大・生態研，[2]トリノ大，[3]茨城大・農）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2A30p07　オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生による代謝産物変動
15:05　◦手林慎一[1,2]，　及川　彰[3]，　斉藤和季[4]，　上手麻希[5]，間世田英明[5]，大西信太郎[2]（[1]高知大・農，[2]愛媛連大・農，[3]理研 PSC，[4]千葉大院・薬，[5]徳島大・STS 研究部）

2A30p08　ジャガイモそうか病自然発生土壌におけるそうか病菌の時空間動態解析
15:16　◦牧野彩花，玉木秀幸，眞鍋佳世[1]，小山　修[1]，吉田穂積[2]，星野　保，鎌形洋一（産総研･生物プロセス，[1]日鉄環境エンジ(株)，[2]東農大・生物産業）

2A30p09　イネの植物免疫反応時に誘導される TIFY タイプ転写調節因子の解析
15:27　◦久保健一，宇野雄太，宮田千加，大坪由佳，蔡　晃植（長浜バイオ大・バイオ）

2A30p10　植物病原細菌 Acidovorax avenae のイネ過敏感細胞死誘導に関与するエフェクターの機能解析
15:38　◦近藤真千子，吉田裕貴，宮田千加，佐々木悠，青井良介，蔡　晃植（長浜バイオ院・バイオ）

2A30p11　イネの免疫反応を誘導する病原細菌由来タンパク質の同定とその認識機構
15:49　◦古川岳人，平井洋行，近藤真千子，蔡　晃植（長浜バイオ大院・バイオ）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2A30p12　イネの全身獲得抵抗性誘導に関するサリチル酸生合成の制御機構の解析
16:10　◦草島美幸[1,2]，　平山潤太[2]，　安田美智子[2]，　篠崎　聰[2]，仲下英雄[1,2]（[1]東農大応生科・生応化，[2]理研・イノベーション）

2A30p13　植物病原細菌由来の鞭毛タンパク質フラジェリンのイネにおける認識とその受容体の同定
16:21　◦桂木雄也，小栗章成，柁山航介，梶本博文，田中佑佳，高井亮太，蔡　晃植（長浜バイオ大院・バイオ）

2A30p14　フラジェリン糖鎖構造によって制御されるイネによる *Acidovorax avenae* 非病原性菌株のフラジェリン特異的認識とイネ免疫反応誘導機構
16:32　◦平井洋行，中川幸彦，古川岳人，迹見勇樹，蔡　晃植（長浜バイオ大院・バイオ）

2A30p15　*Acidovorax avenae* の病原性を異にする K1 株および N1141 株のフラジェリン糖鎖構造
16:43　◦吉田　充，小野裕嗣，知久和寛，平井洋行[1]，亀山眞由美，山本雅信，蔡　晃植[1]，石井　忠，一瀬勇規[2]（農研機構・食総研，[1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]岡山大院・自然科学）

2A30p16　*Acidovorax avenae* K1 菌株のフラジェリン糖鎖の非還元末端糖によるイネの免疫反応誘導特異性の制御
16:54　◦中川幸彦，平井洋行[1]，迹見勇樹[1]，古川岳人[1]，小野裕嗣[2]，吉田　充[2]，蔡　晃植[1]（長浜バイオ大学･バイオ，[1]長浜バイオ大院･バイオ，[2]農研機構・食総研）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2A30p17　細菌キトサナーゼを発現するイネの作製とそのいもち病抵抗性の解析

17:15 ◦香西雄介[1,2], 望月　進[2], 齋藤明広[3], 安藤昭一[4], 南　栄一[1,2], 西澤洋子[2]（[1]筑波大院生命環境, [2]農生資研, [3]静岡理工科大理工, [4]千葉大院融科）

2A30p18　アシルポリアミン誘導体のイネ病害抵抗性反応における作用と役割

17:26 ◦彦坂政志, 中村英光, 前田　哲[1], 森　昌樹[1], 岡田憲典[2], 山根久和[2], 浅見忠男（東大院農生科・応生化, [1]農生資研, [2]東大生物工学セ）

2A30p19　色変換蛍光蛋白質 kikume green red を用いた共生過程における根粒菌の動態解析

17:37 ◦鳥井健次[1], 川口正代司[2], 松岡　健[1,3,4]（[1]九大院・生資環, [2]基生研・共生システム, [3]九大 院・農, [4]九大・生環セ）

2A30p20　ミヤコグサ根粒で発現する糖輸送体候補 *SWEET* の解析

17:48 ◦齊田有桂, 杉山暁史, 高梨功次郎, 矢崎一史（京大生存圏）

A31 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物—一次代謝，二次代謝—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

2A31a01　イネのリグニン生合成経路の解明

9:00 小柴太一[1], 廣瀬孝江[1], 向井まい[1], 山村正臣[1], 服部武文[1], 鈴木史朗[1], 坂本正弘[2], ◦梅澤俊明[1,3]（[1]京大生存研, [2]京大院農, [3]京大生存基盤）

2A31a02　エリアンサスのリグニン及び関連物質の量と酵素糖化率の節間間変動解析

9:11 ◦山村正臣[1], 大竹雄一郎[1], 野田壮一郎[1], 服部武文[1], 高部圭司[2], 鈴木史朗[1], 櫻井　望[3], 鈴木秀幸[3], 池　正和[4], 徳安　健[4], 菊地　淳[5], 柴田大輔[3], 梅澤俊明[1,6]（[1]京大・生存研, [2]京大・院農, [3]かずさ DNA 研, [4]食総研, [5]理研・植物, [6]京大・生存基盤）

2A31a03　ソライロアサガオのクマリン生合成に関わるオルト位水酸化酵素遺伝子のクローニングと機能解析

9:22 ◦田辺綾野, 清水文一（東洋大・生命）

2A31a04　植物の化学防御機構におけるイリドイド配糖体糖加水分解酵素の酵素学的研究

9:33 ◦大上将司, 松野　聡, 平田　拓[1], 道羅英夫[2], 渡辺修治[1], 大西利幸[3]（静大院・農, [1]静大院・創造, [2]静大・遺伝子, [3]静大・GRL）

2A31a05　オリーブ傷害葉で生じる新規オレウロペイン糖加水分解産物-アミノ酸複合体の構造解析

9:44 ◦池田修也, 松野　聡[1], 大上将司[1], 渡辺修治[2], 大西利幸[3]（静大・農, [1]静大院・農, [2]静大院・創造, [3]静大・GRL）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

2A31a06　分子内エステル転移反応によるラクトン形成を触媒する新規カルボキシルエステラーゼ：チューリッポシド A 変換酵素遺伝子のチューリップ花弁からの単離および機能解析

10:05 ◦野村泰治, 荻田信二郎, 加藤康夫（富山県大工･生物工）

2A31a07　オイゲノール及び関連物質の抗菌活性における構造活性相関の解析

10:16 ◦肥塚崇男, 染谷信孝[1], 渡辺文太, 松井健二[2], 平竹　潤（京都大・化研, [1]農研機構・北海道農研センター, [2]山口大・院医）

2A31a08　ショウガの主要香気寄与成分シトラールの生成に関与するゲラニオール脱水素酵素遺伝子のクローニングと機能解析

10:27 ◦飯島陽子, 肥塚崇男[1], 鈴木秀幸[2], 久保田紀久枝[3]（神奈川工科大･応用バイオ, [1]京都大･化研, [2]かずさ DNA 研, [3]お茶大･生活科学）

2A31a09　レモン果皮におけるクマリン基質プレニルトランスフェラーゼの検出と cDNA クローニング

10:38 ◦棟方涼介,　井上剛史[1],　肥塚崇男[2],　佐々木佳菜子, 鶴丸優介,　杉山暁史,　宇都義浩[3],　堀　　均[3],　東　順一[1], 矢崎一史（京大・生存研, [1]京大院・農, [2]京大・化研, [3]徳島大院・ソシオテクノ）

2A31a10　ミドリサンゴ由来 β-アミリン合成酵素の酵素学的諸性質および阻害剤の検討

10:49 ◦伊藤遼介, 星野　力（新潟大院自然科学）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

2A31a11　ヤマノイモ属トゲドコロにおけるプロトジオシンを加水分解する β-グルコシダーゼの解析

11:10 ◦中安　大, 川崎　崇, 山村理恵[1], 遠城道雄[2], 杉本幸裕, 水谷正治（神戸大院・農, [1]神戸大・農, [2]鹿児島大・農）

2A31a12　コムギにおけるベンゾキサジノン発現への植物ホルモンの影響

11:21 ◦須恵雅之, 中村ちひろ, 仲下英雄（東農大･生物応用化学）

2A31a13　Two transcription factors regulating nicotine biosynthesis in tobacco

11:32 ◦Tsubasa Shoji, Takashi Hashimoto（NAIST）

2A31a14　イソキノリンアルカロイド生合成系の発現制御に関わる bHLH 型転写因子

11:43 ◦山田泰之,　古株靖久,　島田友恵,　小山知嗣,　佐藤文彦（京大院・生命科学）

2A31a15　形質転換ハナビシソウ細胞を用いたオウレン THBO の機能解析

11:54 ◦松島康高, 南　博道[1], 竹村知也, 佐藤文彦（京大生命･統合生命, [1]石川県大・資源研）

A31 会場　午後の部（14:00〜18:10）

植物—一次代謝，二次代謝—，—植物工学 – 育種，物質生産，形質転換—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2A31p02　ハツカダイコン β−アミラーゼを高発現させたシロイヌナズナの表現型に関する研究

14:00 ◦高橋郁夫, 原　正和（静岡大・農）

2A31p03　保存によるカットキャベツ成分の変化と鮮度保持フィルムの効果

14:11 ◦阿部香織[1], 中尾　悟[2], 冨田　勝[1], 曽我朋義[1], 及川　彰[1,3]（[1]慶應大・IAB, [2]住友ベークライト(株), [3]理研 PSC）

2A31p04　ヒヤシンス・プロテアーゼインヒビター前駆体プロセシング酵素の性質

14:22 ◦塩井成留実, 渡邉美翔, 高島由花, 寺田成之（福大･理）

2A31p05　センブリの組織培養とその培養物成分

14:33 ◦川上寛子,　野下浩二,　原光ニ郎,　小峰正史,　山本好和（秋田県大院・生物資源）

2A31p06　桑葉に含まれる α-グルコシダーゼ阻害物資の多様性

14:44 ◦中西弘充, 大久保薫[1], 小西　哉, 金勝廉介[1]（信州大・SVBL, [1]信州大・繊維）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2A31p07　イソプレノイド生産性シアノバクテリアの創出

15:05 ◦清田浩史, 伊藤美千穂[1], 平井優美[2], 池内昌彦（東京大･理, [1]京都大・薬, [2]理研 PSC）

2A31p08　Metabolic pathway engineering in cyanobacteria *Synechocystis* sp.PCC 6803 for the production of lactate

15:16 ◦Ancy Joseph, Shimpei Aikawa, Tomohisa Hasunuma[1], Fumio Matsuda[1], Akihiko Kondo（Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., [1]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ.）

2A31p09　シアノバクテリア *Arthrospira platensis* を炭素源としたアミラーゼ発現酵母による直接エタノール生産

15:27 ◦藍川晋平, 和泉自泰, 山田亮祐[1], 松田史生[1], 蓮沼誠久[1], 近藤昭彦（神大院・工, [1]神大・自科）

2A31p10　プロスタグランジンの生物生産-形質転換ゼニゴケを用いて

15:38 ◦竹村美保, 金本浩介, 長屋進吾, 大山莞爾（石川県立大･資源研）

2A31p11　Sphingobium sp. SYK-6 株から単離されたピノレジノール変換酵素遺伝子 pinZ を発現する組換え植物の解析

15:49 ◦田村尚之，中島正博，辻　幸子，福原優樹[1]，上村直史[1]，佐藤かんな，片山義博[2]，原　啓文[3]，菱山正二郎[4]，政井英司[1]，梶田真也（東農工大院･BASE，[1]長岡技科大･生物，[2]日大生資科･森林，[3]岡山理大工・生体，[4]森林総研）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2A31p12　硫酸イオントランスポーターの硫黄栄養応答性遺伝子下流域を用いた植物組換え遺伝子発現制御法の開発

16:10 ◦陶山明子，大滝千皓[1]，丸山明子（九大院農院・生機科，[1]福井高専）

2A31p13　イネによって vir 遺伝子発現が促される Agrobacterium rhizogenes 菌株の解析

16:21 ◦清川一矢，田中克幸，山本真司，平賀良知，守口和基，鈴木克周（広島大院・理）

2A31p14　単子葉イネからの翻訳エンハンサーの探索

16:32 ◦矢村寿啓，上田清貴，大河原錬也，米田　新，出村　拓，加藤　晃（奈良先端大・バイオ）

2A31p15　植物培養細胞における導入遺伝子高効率発現系

16:43 ◦大河原錬也，上田清貴，矢村寿啓，米田　新，出村　拓，加藤　晃（奈良先端大・バイオ）

2A31p16　イネカルスにおけるプロラミン GFP 融合タンパク質の発現

16:54 ◦重光隆成[1]，森田重人[1,2]，佐藤　茂[1,2]，増村威宏[1,2]（[1]京府大院・生命環境，[2]京都農技セ・生資セ）

p17〜p21 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2A31p17　経口ワクチン用カプセルを目指したイネ種子 PB-I の特定部位への外来タンパク質局在化に関する研究

17:15 ◦佐生　愛[1]，斉藤雄飛[1]，山崎竜一[1]，田中愛実[1]，重光隆成[1]，森田重人[1,2]，佐藤　茂[1,2]，増村威宏[1,2]（[1]京府大院，[2]京都農技セ・生資セ）

2A31p18　全て植物由来の遺伝子を用いたフラボノイド類強化レタスの作出

17:26 ◦山本峻資[1]，丹羽康夫[1]，小川剛史[1,2]，清水正則[3]，浅尾浩史[4]，小林裕和[1]（[1]静県大院･生活健康，[2]しずおか産業創造機構，[3]浜松大･健康プロデュース，[4]奈良県農業総合センター）

2A31p19　葉緑体ゲノム改変レタスによるアスタキサンチン等ケトカロテノイドの効率生産

17:37 原田尚志，村上美由紀[1]，新井和子[1]，新藤一敏[2]，音松俊彦，◦三沢典彦[1]（神戸天然物化学，[1]石川県大・生資研，[2]日女大家政・食物）

2A31p20　バイオマス増産を目指した遺伝子導入によるサツマイモの光合成増強

17:48 ◦西山和樹[1]，井上貴之[2]，中村茉樹[2]，大鳥久美[2]，作山治美[2]，田茂井政宏[1,2]，横田明穂[3]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]奈良先端大・バイオ）

2A31p21　グロースチャンバーを用いた簡便な作物の種子生産用水耕栽培法

17:59 ◦黒田昌治，池永幸子（農研機構・中央農研）

A32 会場　午後の部（14:00〜17:59）

糖鎖―合成―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

2A32p02　ラフト分子の一分子追跡に向けた蛍光ガングリオシドプローブの合成と機能評価 3

14:00 ◦河村奈緒子[1,2]，安藤弘宗[1,2]，池田泰祐[2]，鈴木健一[2,3]，石田秀治[1]，楠見明弘[2]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大･応用生物，[2]京都大･iCeMS，[3]科技振・PRESTO）

2A32p03　ラフト分子の一分子追跡に向けた蛍光ガングリオシドプローブの合成と機能評価 4

14:11 ◦松井泉美[1]，河村奈緒子[1,2]，安藤弘宗[1,2]，鈴木健一[2,3]，石田秀治[1]，楠見明弘[2]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大･応用生物，[2]京都大･iCeMS，[3]科技振・PRESTO）

2A32p04　ALS 様疾患患者由来 IgM 抗体と反応するハイブリッド型ガングリオシドの効率的全合成

14:22 ◦中島慎也[1,2]，安藤弘宗[1,2]，齋藤里紗[1]，玉井秀樹[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

2A32p05　環状グルコシルセラミド受容体の改良検討とガングリオシド GalNAc-GM1b の全合成

14:33 ◦小西美紅，藤川紘樹[1]，安藤弘宗[1]，石田秀治，木曽　真[1]（岐阜大・応用生物，[1]京都大・iCeMS）

2A32p06　保護硫酸基を用いた位置特異的硫酸化オリゴ糖の合成

14:44 ◦松下健也，田村純一（鳥取大地域・地域環境）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

2A32p07　ナイセリア属細菌が産生するリポオリゴ糖内のオリゴ糖鎖の合成研究

15:05 ◦岸本勝也，小賀野美紀，山崎良平（鳥大・農）

2A32p08　N-結合型複合型糖鎖を有する Saposin C の合成

15:16 ◦小林　甫，田中洋成，朝比奈雄也，田野千春[1]，片山秀和，中原義昭，中原悠子，米重あづさ[1]，松田純子[1]，北條裕信（東海大工・生命化学，[1]東海大学・糖鎖科学研）

2A32p09　セグメント縮合法を用いた糖タンパク質 Tim-3 IgV ドメインの合成研究

15:27 ◦朝比奈雄也[1,2]，片山秀和[1]，神鳥成弘[3]，北條裕信[1,2]（[1]東海大・生命，[2]東海大・糖鎖研，[3]香川大・生命センター）

2A32p10　*Bacillus subtilis* 由来 S-結合型糖ペプチド sublancin の化学合成

15:38 ◦片山秀和，朝比奈雄也，北條裕信（東海大工･生命化学）

2A32p11　bisectingGlcNAc をもつ複合型糖鎖部分構造の合成と NMR を用いた構造解析

15:49 ◦花島慎弥，山口芳樹（理研 ASI・糖鎖構造）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

2A32p12　分子内アグリコン転移反応を利用した，*Upis ceramboides* 由来キシロマンナン不凍多糖の合成研究と構造解析

16:10 ◦石渡明弘[1]，櫻井絢花[1]，伊藤幸成[1,2]（[1]理研･基幹研，[2]ERATO・JST）

2A32p13　3"-F-CMP-Sia 誘導体の細胞内における挙動に関する検討

16:21 ◦鈴木克彦[1,2]，大竹敦子[1,2]，大黒周作[1,2]，蟹江　治[1,2,3]，伊藤幸成[1,2]（[1]ERATO JST，[2]理研・基幹研，[3]東海大・糖鎖研）

2A32p14　酸化－還元法を用いた *N*-結合型糖鎖部分構造 Glc_3Man_3の合成

16:32 ◦飯野健太[1]，岩本将吾[1]，笠原佑太[1]，西川　淳[2]，殿塚隆史[2]，伊藤幸成[3,4]，松尾一郎[1]（[1]群大院・工，[2]東農工大院・農，[3]理研，[4]ERATO JST）

2A32p15　一段階合成可能な DMT 糖を利用するアミノオリゴ糖の化学-酵素合成

16:43 ◦田中知成，和田有効[1]，野口真人[1]，小林厚志[1]，大沼貴之[2]，深溝　慶[2]，正田晋一郎[1]（京工繊大院・工芸，[1]東北大院・工，[2]近畿大・農）

2A32p16　2-デオキシ-*scyllo*-イノソース（DOI）を原料としたカルバ-*β*-D-マンノースとカルバ-*β*-D-*N*-アセチルマンノサミンの合成研究

16:54 ◦館田尚家，宮崎達雄，有坂和也，狩野達也，鰺坂勝美（新潟薬大・応生科）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

2A32p17　マイコプラズマ肺炎関連医療材料の創製に向けた *M. pneumoniae* 由来グリセロ糖脂質の合成研究

17:15 ◦福田和男[1]，土肥博史[2]，田村真奈美[3]，松田和洋[4,5]，西田芳弘[2]（[1]千葉大院・園芸，[2]千葉大院・融合科学，[3]千葉大・園芸，[4]慶大・医，[5]エムバイオテック）

2A32p18　セレン標識糖鎖の合成と糖鎖-蛋白質複合体の立体構造解析への応用

17:26 ◦鈴木達哉[1,2]，安藤弘宗[1,2]，牧尾尚能[3]，山田悠介[3]，加藤龍一[3]，

若槻壮市[3]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS，[3]高エネ機構・放射光）

2A32p19　シアル酸セレノグリコシドの合成と加水分解酵素に対する耐性の検証

17:37　◦林知衣香[1]，安藤隆幸[2]，毛受雅典[3]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS，[3]岐阜大・工）

2A32p20　DDS を指向した糖修飾リポソームの合成と機能評価

17:48　◦植木章晴[1,2]，美濃由佳[1]，運　敬太[3]，吉田　允[3]，川上　茂[3]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，山下富義[3]，橋田　充[2,3]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS，[3]京都大・薬）

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

C01 会場　午前の部（9:00〜12:05）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C01a01　微細藻類からの *n*-アルカンを主成分とするバイオ燃料の生産：好熱性・嫌気性モデル栄養共生菌の培養の影響
9:00 ◦山根國男，松山　茂，五十嵐健輔，内海真生，白岩善博，桑原朋彦（筑波大院生命環境）

3C01a02　腸内細菌 *Klebsiella sp.* からの新規アルカン合成遺伝子の単離と解析
9:11 ◦伊藤正和，村松正善（トヨタ自動車・FP 部バイオラボ）

3C01a03　電気化学システムによる有機性廃棄物からの水素生成の制御
9:22 佐々木建吾，◦佐々木大介[1]，森田仁彦[1]，松本伯夫[1]，大村直也[1]，石井正治，五十嵐泰夫（東大院農生科・応生工，[1]電中研）

3C01a04　水素発酵過程における *Megasphaera* 属の迅速モニタリング技術の開発
9:33 ◦阿部新子，板東由起子，大西章博[1]，藤本尚志[1]，鈴木昌治[1]（東農大院農・醸造，[1]東農大・応生）

3C01a05　りんご搾り粕を原料とした *Clostridium beijerinkii* HU-1 株による水素生産
9:44 ◦鈴木由麻[1]，佐藤夕貴[1]，佐藤　圭[2]，林　成司[2]，園木和典[2,1]（[1]弘前大院農生・応生工，[2]弘前大農生・分子生命）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C01a06　超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* での水素発生に関与するピルビン酸酸化経路の解析
10:05 ◦野原健太，折田和泉，中村　聡，今中忠行[1]，福居俊昭（東工大院生命理工・生物プロセス，[1]立命館大・生命科学・生物工学）

3C01a07　Isolation of mutants of *Pseudochoricystis ellipsoidea* with increased oil productivity for biofuel production
10:16 ◦Yoko Ide，Shigeaki Harayama（Chuo Univ.）

3C01a08　Degradation activity of a *Penicillium rolfsii strain isolated from the soil in Malaysia against the sap extraction residue of oil palm trunks*
10:27 ◦Lee Kok Chang[1,2]，Takamitsu Arai[1]，Akihiko Kosugi[1]，Darah Ibrahim[2]，Panida Prawitwong[1]，Yoshinori Murata[1]，Yutaka Mori[1]（[1]JIRCAS，[2]USM）

3C01a09　バイオ・ディーゼル植物ヤトロファの登熟期果実における脂質代謝の転写制御
10:38 ◦明石欣也[1]，梶川昌孝[1]，尾形善之[2]，Sony Suharsono[3]，Utut Widyastuti[3]，足立直樹[4]，近藤伸二[4]，菊地　淳[2,5,6,7]，横田明穂[1]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]理研・PSC，[3]ボゴール農大，[4]理研・ASI，[5]理研・BMEP，[6]名大院・生命農，[7]横市院・生命）

3C01a10　ジャトロファフォルボールエステル分解微生物の探索
10:49 ◦大池達矢，松川哲也，岡南政宏，阿野貴司，梶山慎一郎（近畿大院生物理工・生物工）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C01a11　*Jatropha curcas* の種子採油残渣を用いた微生物農薬の開発
11:10 ◦吉川　諒，大池達矢[1]，松川哲也，岡南政宏，梶山慎一郎，阿野貴司（近畿大生物理工・生物工，[1]近畿大院生物理工・生物工）

3C01a12　ヤトロファ栽培・収穫時未利用バイオマスの資源化を目指した物理化学特性解析
11:21 ◦渡辺太二[1]，篠阿弥宇[2]，明石欣也[3]，菊地　淳[2,1,4,5]（[1]横市大院生命，[2]理研 PSC，[3]奈良先端大バイオ，[4]理研 BMEP，[5]名大院生命農）

3C01a13　BDF 生産をめざしたラビリンチュラ類の高密度培養の検討
11:32 ◦林　雅弘，平井大介，長友宏子，田岡洋介，原田佳子[1]，泉　可也[1]（宮崎大・農，[1](株)BITS）

3C01a14　トリグリセリド合成系遺伝子の過剰発現による油脂蓄積酵母の分子育種
11:43 ◦高桑直也（農研機構・北海道農研）

3C01a15　バイオディーゼル生産過程で生じるグリセリンからの乳酸生産
11:54 ◦保井秀太，山出和弘（関西大・化学生命工）

C01 会場　午後の部（14:00〜17:59）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー，環境汚染物質—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C01p02　微生物燃料電池における細菌群集の動的変化と発電特性
14:00 山本脩二，Owen RUBABA，荒木葉子，鈴木　渓，◦二又裕之（静大工・物質工）

3C01p03　Microbial Community Dynamics and Electrochemical Properties of Microbial Fuel Cells under Different External Resistances
14:11 ◦Rubaba Owen，Yutaka KATO，Shuji YAMAMOTO，Hiroyuki FUTAMATA（Shizuoka Univ. Eng.）

3C01p04　微生物発電を用いた油脂の処理・発電に関する検討
14:22 ◦浜本一洋[1]，石黒　隆[1]，松本晃暎[1]，橋本和仁[2,3,4]，渡邉一哉[2,5,4]（[1]ミヨシ油脂(株)，[2]東大先端研，[3]東大院・工，[4]JST ERATO，[5]東京薬科大・生命科）

3C01p05　果糖と酸素で発電する直接電子移動型バイオ電池の高性能化
14:33 ◦宋　慶盛，浜野泰如，河井翔太，浅野　達，白井　理，加納健司（京大院農・応用生命）

3C01p06　深海熱水環境における電流生態系の可能性
14:44 ◦中村龍平，石居拓己，山本正浩[1]，高井　研[1]，橋本和仁（東大院工，[1]海洋研究開発機構）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C01p07　化学独立細菌の CO_2 固定における電子伝達機構の検討
15:05 ◦石居拓己[1]，茂木岳人[2]，中村龍平[1,2]，橋本和仁[1,2,3]（[1]東大院工，[2]東大工，[3]JST-ERATO）

3C01p08　ジアホラーゼと NAD 依存性脱水素酵素を用いた有機物酸化反応の生物電気化学的戦略
15:16 ◦菊池可菜子[1,2]，白井　理[1]，加納健司[1]（[1]京大院農，[2]ユニチカ(株)）

3C01p09　嫌気条件下におけるグリセロールの大腸菌を利用した生物電気化学的酸化反応
15:27 ◦新村美智子[1]，酒井秀樹[2]，松本隆平[2]，藤田修二[2]，後藤義夫[2]，戸木田裕一[2,3]，辻村清也[1]，白井　理[1]，加納健司[1]（[1]京大院農，[2]ソニーコアデバイス開発本部 環境エネルギー事業開発部門 環境技術部 バイオ電池開発グループ，[3]ソニー先端マテリアル研究所 バイオエレクトロニクス研究グループ）

3C01p10　変異型 *dnaQ* 遺伝子導入による高電流生産 *Shewanella oneidensis* 変異株の作製と解析
15:38 ◦高妻篤史[1]，釘宮理恵[2]，渡邉一哉[3,1]，橋本和仁[4,1]（[1]JST・ERATO，[2](株)ネオ・モルガン研究所，[3]東薬大生科，[4]東大院工科）

3C01p11　電気培養による *Clostridium acetobutylicum* の代謝制御
15:49 ◦松谷政導，平野伸一[1]，松本伯夫[1]，大村直也[1]，安藤昭一[2]（千葉大院・融合，[1]電中研，[2]千葉大・園芸）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C01p12　セルロース分解菌 *Clostridium thermocellum* の電気培養による培養制御
16:10　◦大前良太，平野伸一[1]，松本伯夫[1]，大村直也[1]，篠崎　開（東電大工・環境化，[1]電中研）

3C01p13　糸状菌 *Trichoderma* sp. KFA-2 株における分生子形成の通電による誘導
16:21　◦平野伸一，松本伯夫，原園　顕[1]（電中研，[1]関西電力）

3C01p14　難分解性多環芳香族炭化水素の微生物分解
16:32　◦馬　　嵩，倉根隆一郎（中部大）

3C01p15　鉄還元性ヘテロ環芳香族化合物分解細菌の単離
16:43　◦井上謙吾，渡邊史子，河野好裕（宮崎大）

3C01p16　花香に含まれる 2- エチルヘキサノールとその誘導体
16:54　◦桑原保正，清水伸泰[1]（大阪府，[1]京学園大）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3C01p17　環境汚染物質ペルフルオロオクタン酸が 3T3-L1 脂肪前駆細胞に及ぼす影響
17:15　◦山本純平，服部一夫，大石祐一（東農大応生科・栄養）

3C01p18　ファイトケラチン合成酵素を用いたカドミウムバイオセンサーの開発
17:26　◦山本陽介，松浦秀幸，村岡未彩，植村佳乃子，堀　恭久，赤石健児，原田和生，黒田浩一[1]，植田充美[1]，平田收正（阪大院・薬，[1]京大院農・応用生命）

3C01p19　メチルグリオキサール生成系および解毒系に及ぼすセレンの影響
17:37　◦武田　徹，三宅さつき，北澤奈穂（近畿大・農・バイオ）

3C01p20　組換え体シロイヌナズナを用いた PCB 同族体と重金属の共汚染のファイトモニタリング
17:48　◦嶋津小百合，太田雅也[1]，大川秀郎[2]，芦田　均（神戸大院・農，[1]福山大生命工・生物工，[2]早大・規範科学総合研）

C02 会場　午前の部（9:00〜12:05）

環境―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C02a01　パン酵母を練り込んだレーヨン繊維による大腸菌の特異的捕捉
9:00　佐藤佳織，佐藤まゆみ，高岡和千代[1]，児玉　令[2]，◦古川　清（長岡技科大・生物，[1]三菱製紙・総合研，[2]ダイワボウレーヨン（株））

3C02a02　固定化微生物による溶液中のリン回収法の検討
9:11　◦似内洋祐，比嘉景市[1]，鈴木義規[1]，斎木　博[1]（工科大院・バイオ，[1]工科大・応生）

3C02a03　1,4-ジオキサン分解活性を有する活性汚泥および分解微生物の性質
9:22　◦大本貴士，山中勇人，森芳邦彦，駒　大輔，酒井清文，高橋　真[1]（阪市工研，[1](株)三宝化学研究所）

3C02a04　活性汚泥代謝産物によるテトラクロロエチレンの減少に関する研究
9:33　◦奥村健一[1]，大野勝也[2,3]，中村浩平[1]，高見澤一裕[1]（[1]岐阜大学院応生・資源生命，[2]岐大連農，[3]イビデン）

3C02a05　消石灰散布による土壌生態系への影響
9:44　◦濱崎洋輔，森　美穂，坂上吉一（近畿大院・農）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C02a06　土壌からの PAH 分解糸状菌の単離とその基質特異性
10:05　◦鈴木健太郎，川上由紀子，後藤純雄[1]，峯木　茂（東理大院・応生科，[1]麻布大・環境科）

3C02a07　並行複式無機化法による有機質肥料活用型養液栽培
10:16　◦篠原　信，藤原和樹，小川　順[1]，安藤晃規[2]，加藤康夫[3]，宮本憲二[4]，高野雅夫[5]，青山ちひろ[5]（農研機構，[1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学，[3]富山県大工・生物工，[4]慶大・理工，[5]名大院・環境）

3C02a08　*Nitrosomonas europaea* IFO14298 のアンモニア酸化活性を向上させる作用メカニズムの解析
10:27　◦坂上景子，伊東義兼，生田　創[1]，三輪京子，松本光史[2]，森川正章（北大院環境・環境分子，[1]旧立プラントテクノロジー・松戸研，[2]電源開発(株)・若松研）

3C02a09　バイオオーギュメンテーションによる，廃水処理場から放出される温室効果ガス N_2O の抑止
10:38　◦松岡真生，宮原盛雄，金　尚完，伏信進矢，渡辺　昭[1]，祥雲弘文，若木高善（東大院農生科・応生工，[1]荏原製作所）

3C02a10　水田土壌から分離した脱窒細菌の接種による畑土壌からの一酸化二窒素（N_2O）ガス発生低減化
10:49　全　愛花[1]，　西澤智康[1]，　多胡香奈子[1,2]，　石井　聡[1,3]，磯部一夫[1]，大塚重人[1]，◦妹尾啓史[1]（[1]東大院農生科･応生化，[2]現）農環研，[3]現）北大院工）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C02a11　海洋性細菌 *Marinobacter* sp. E-31 株によるトルエンの分解
11:10　◦城谷達也，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大･化学生命工）

3C02a12　耐酸性油脂分解菌 *Burkholderia multivorans* R128 株の油脂分解特性
11:21　◦宇津江智宏，杉森大助（福島大院・理工）

3C02a13　石油汚染下の微生物群集中における海洋性多環芳香族炭化水素（PAHs）分解菌 *Cycloclasticus* の培養制御について
11:32　◦山下俊輔，竹石英伯，荻原　淳[1]，奥田修二郎[2]，安斎　寛[3]，岩淵範之，砂入道夫（日大・生資科・応生科，[1]旧大・生資科・生化科，[2]立命館大・生命・生命情報，[3]日大・短大・生資科）

3C02a14　低肥沃な石油汚染土壌における高効率バイオレメディエーションシステムの構築
11:43　◦福原優樹，松宮芳樹，久保田謙三，堀井幸江，松野敏英，久保　幹（立命館大生命・生物工）

3C02a15　油汚染紙製ウエス溶解菌群集の取得と解析
11:54　◦稲松　遼，城　康彰[1]，山田幸太，鈴木大典[2]，片山新太[2]，金原和秀（静岡大・工，[1]愛知電機（株），[2]名古屋大・エコトピア）

C02 会場　午後の部（14:00〜17:48）

環境―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C02p02　生分解性プラスチック製マルチフィルムの分解を過剰に促進する畑地土壌の微生物活性
14:00　◦山元季実子，渡部貴志，平舘俊太郎，小板橋基夫，山口紀子，北本宏子（農環研）

3C02p03　地下環境の酸化還元状態の形成に及ぼす微生物の影響（第 6 報）
14:11　◦安達奈穂，齋藤禎一[1]，長岡　亨[1]，安藤昭一[2]（千葉大院・融合，[1]電中研，[2]千葉大院・園芸）

3C02p04　土壌微生物細胞性粘菌の化学生態学
14:22　◦宮崎早紀，Goto Derek[1]，齊藤玉緒[2]（上智大・院・理工，[1]北海道大・創成，[2]上智大・理工）

3C02p05　ニトロゲナーゼ遺伝子を用いた土壌中の窒素固定菌の定量方法の構築
14:33　◦鈴木太郎，久保田謙三，松野敏英，堀井幸江，福原優樹，松宮芳樹，久保　幹（立命館大・生命・生物工）

3C02p06　海洋性アルキルフェノール分解菌の分離と菌学的諸性質
14:44　◦藤岡　諒，高田健吾，安川直希，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大・化学生命工）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C02p07　強酸性茶園土壌におけるアンモニア酸化活性とアンモニア酸化微生物の群集構造解析

15:05 ○高梨藍生[1]，岡村恵子[2]，山田剛史[1,2]，平石　明[1,2]（[1]豊橋技科大・環境生命工，[2]豊橋技科大・先端農業バイオ）

3C02p08　オイルサンド生産における高アルカリ性プロセス水環境に内在する微生物群の有機化合物分解特性と菌叢解析

15:16 ○川口秀夫，小林　肇，李　征国，増田昌敬，佐藤光三，中川裕幸[1]（東大院・工，[1]石油資源開発）

3C02p09　環境試料からの anammox 菌の馴養と集積フローラの菌叢解析

15:27 ○石川　秀，多田羅昌浩，北島洋二，上野嘉之（鹿島技研）

3C02p10　ウキクサー微生物共培養法を利用した非イオン系界面活性剤分解菌の検索

15:38 ○光田大悟，田中靖浩，河本麻奈，遠山　忠，森　一博（山梨大工・土木環境）

3C02p11　湧水から単離した微生物の水に対する酸化還元電位の低下作用

15:49 ○下田　直，及川栄作[1]，及川胤昭[2]（呉高専・専攻科，[1]呉高専・環境都市工，[2]創造的生物工学研）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C02p12　海洋性細菌におけるフタル酸分解系遺伝子の解析

16:10 ○西村彩香，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大･化学生命工）

3C02p13　Pentachlorophenol 分解菌群の単離と解析

16:21 ○堀嵜允文，沼田　充，下村有美[1]，早津雅仁[1]，八田　貴[2]，山根久和，野尻秀昭（東大･生物工学セ，[1]農環研，[2]岡山理大･工）

3C02p14　ドリン系農薬分解菌の環境汚染物質分解能の解析と分解関連遺伝子の探索

16:32 ○Yee Lii Mien[1]，堀嵜允文[1]，土金恵子[2]，細山　哲[2]，藤田信之[2]，松本貴嗣[3]，吉川博文[3,4]，春田　伸[5]，朝井　計[6]，五十嵐泰夫[7]，山根久和[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大生物工学セ，[2]NITE，[3]東農大・ゲノム解析セ，[4]応生科・バイオ，[5]首都大生命，[6]埼玉大院理工分子生物，[7]東大・応生工）

3C02p15　Activation of indole degradation by Burkholderia unamae strain CK43B under exposure to plant polyphenols

16:43 ○Dongyeop Kim，Irnayuli R. Sitepu[1]，Yasuyuki Hashidoko（Hokkaido Univ.，[1]FNRDC Indonesia）

3C02p16　大腸菌を添加した塩素化エチレン汚染地下水の修復過程における微生物動態

16:54 ○石邨浩二，中村浩平，高見澤一裕（岐阜大院・応生）

p17〜p19 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3C02p17　3-クロロフェノール脱塩素活性に対する硫酸還元細菌，硫黄還元細菌およびメタン生成古細菌の影響

17:15 ○鈴木大典，片山新太（名古屋大・エコトピア）

3C02p18　biochar 混合による堆肥化過程の CH_4 排出抑制効果と CH_4 代謝関連酵素遺伝子解析

17:26 ○古川　徹，神藤恵史[1]，青山正和，Sanchez-Monedero Miguel A.[1]，園木和典（弘前大農生，[1]CSIC-CEBAS）

3C02p19　有機性廃棄物を用いた通電型固定床メタン発酵槽の性能評価

17:37 佐々木大介，○佐々木建吾[1]，渡邉　淳，森田仁彦，平野伸一，松本伯夫，植本弘明，大村直也，五十嵐泰夫[1]（電中研，[1]東大院農生科・応生工）

B03 会場　午前の部（9:00〜12:05）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3B03a01　稲わらの並行復発酵ための高活性セルラーゼ生産

9:00 ○Kahar Prihardi，大久保成章，多久和夫，田中修三（明星大・理工）

3B03a02　バイオマス工学利用への糸状菌由来セルラーゼ関連遺伝子の整

9:11 ○岸川昭太郎，山崎孝仁，村田武英，大熊盛也，小幡裕一（理研バイオリソースセンター）

3B03a03　*Trichoderma reesei* 由来糖化酵素のバイオマス分解における役割

9:22 ○小松光子，長野まどか，吉村聖也，齋藤勇司，中澤　光，二階堂満[1]，戸谷一英[1]，小笠原渉，森川　康，岡田宏文（長岡技科大・生物，[1]一関高専・物質工）

3B03a04　*Trichoderma reesei* エンドグルカナーゼ I および II のバイオマス分解における役割

9:33 ○齋藤勇司，吉村聖也，長野まどか，小松光子，中澤　光，二階堂満[1]，戸谷一英[1]，小笠原渉，森川　康，岡田宏文（長岡技科大・生物，[1]一関高専　物質工）

3B03a05　セルロース系バイオマスの酵素糖化に関する基盤研究(1)T. reesei PC-3-7 BGL 組換え酵素の構築及び評価

9:44 ○河合哲志，中澤　光[1]，谷　修治[2]，炭谷順一[2]，川口剛司[2]，岡田宏文[1]，小笠原渉[1]，小林良則，森川　康（JBA・つくば研，[1]長岡技科大・生物，[2]阪府大院・生命環）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3B03a06　セルロース系バイオマスの酵素糖化に関する基盤研究(2)酵素糖化反応の網羅的解析

10:05 ○井田紀子，小林良則，森川　康（JBA・つくば研）

3B03a07　セルロース系バイオマスの酵素糖化に関する基盤研究(3)エリアンサスの酵素糖化

10:16 ○小林良則，井田紀子，高部圭司[1]，河合哲志，森川　康（JBA・つくば研，[1]京大院・農）

3B03a08　セルロース系バイオマス糖化における *Trichoderma reesei* EG IV および EG VII の役割

10:27 ○長野まどか，三井勇輔，吉村聖也，齋藤勇司，小松光子，中澤　光，岡田宏文，戸谷一英[1]，二階堂満[1]（長岡技大・生物，[1]一関高専・物質工）

3B03a09　*Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼによるセロビオースの加水分解特性

10:38 ○宮永　明，齋藤勇司[1]，岡田宏文[1]，服部武史[2]，尾形　慎[2]，碓氷泰市[2]，戸谷一英（一関高専・物化工，[1]長岡技科大・生物，[2]静岡大農・応生化）

3B03a10　不均衡変異導入法によるグルコースリプレッションを解除した *Trichoderma reesei* ATCC66589 株の作出とその特性

10:49 ○宮地綾子，小山善幸[1]，岩井泉樹[2]，矢野駿太郎[3]，荻原　淳，加藤　順[1]，春見隆文（日大院生資研究科･生資利用，[1]日大生資科･生命化，[2]日大生資科・農化，[3]ネオ・モルガン研究所）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3B03a11　イナワラ分解酵素高生産 *Trichoderma reesei* 変異株の作出

11:10 ○名須川将史，小山善幸[1]，岩井泉樹，矢野駿太郎[2]，荻原　淳[3]，加藤　順[1]，春見隆文[3]（日大生資科･農化，[1]日大生資科･生命化，[2]ネオ・モルガン研究所，[3]日大院生資研究科・生資利用）

3B03a12　原料バイオマスに最適な CBM を持つセルラーゼカクテルのスクリーニング系の構築

11:21 ○BAEJUNGU，中西昭仁，黒田浩一，植田充美（京大院農・応用生命）

3B03a13　稲わら酵素糖化前処理に適するハタケチャダイゴケ菌株の遺伝子導入系構築

11:32 ○山岸賢治，木村俊之，渡辺隆司[1]（東北農研，[1]京大生存圏）

3B03a14　*Clostridium cellulovorans* による種々の実バイオマスの分解とその評価

11:43 ○川出雄二郎，三宅英雄，田丸　浩（三重大院・生資）

3B03a15　リグノセルロース系バイオマスからのキシロオリゴ糖生産に向けた Aspergillus niger 由来キシラナーゼの固定化

11:54 ○江頭　翔，熊谷　聡[1]，藤田修二，林　信行（佐大・農，[1]九大・炭素資源）

B03 会場　午後の部（14:00〜17:59）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3B03p02　タケのアルコール発酵(第 4 報)
14:00 ◦伊波宏樹，松井　勝[1]，坂井美穂（文理大院・工・環境情報学，[1]藤沢環境(株)）

3B03p03　爆砕処理もみ殻からの糖化後発酵および同時糖化発酵によるバイオエタノール生産
14:11 ◦吉羽悠介[1]，田端高光[2]，稗田一男[3]，清水範夫[1,2]（[1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・生命科学，[3]フロンティアフーズ(株)）

3B03p04　エタノール発酵糸状菌を用いた稲わらの糖化発酵同時進行
14:22 ◦星野一宏，高野真希，加藤康夫[1]，荻田信二郎[1]，野村泰治[1]（富山大院・理工，[1]富山県立・工）

3B03p05　エタノール発酵糸状菌 *Mucor javanicus* 由来の新規 *β*-glucosidase
14:33 ◦加藤康夫，荻田信二郎，野村泰治，星野一宏[1]，高野真希[1]（富山県大工・生物工，[1]富山大院・理工）

3B03p06　飼料イネロールベールを用いたエタノール固体発酵およびエタノール回収法の検討
14:44 ◦堀田光生，北本宏子，川出哲生[1]，橘　保宏[1]（農環研，[1]生研センター）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3B03p07　電子線照射によるリグノセルロースのセルラーゼ糖化向上効果 3
15:05 ◦太田万理，増田早苗，藤田勝吉[1]，柳沢雄太郎[1]，本澤洋江[1]，鈴木英夫[1]，鈴木鐵也（光産創大，[1]浜松ホトニクス・中研）

3B03p08　セルロース系バイオエタノール製造廃液の廃水処理特性
15:16 ◦多田羅昌浩，石川　秀（鹿島技研）

3B03p09　コウライシバの減圧同時糖化発酵によるアルコール生産
15:27 ◦西岡希帆，中村浩平，高見澤一裕（岐阜大院・応生・資源生命）

3B03p10　一般廃棄物中の紙を原料としたエタノール生産における雑菌汚染対策
15:38 ◦増成伸介，林　俊介，吉良典子，冨山茂男，木田建次[1]（日立造船(株)，[1]熊大院・自然科学）

3B03p11　Detoxification of glycolaldehyde, a novel bio-ethanol fermentation inhibitor, by conversion to ethylene glycol with yeast Adh1
15:49 ◦Lahiru N. Jayakody，Nobuyuki Hayashi，Hiroshi Kitagaki（Faculty fllof Agriculture, Saga University）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3B03p12　高効率バイオエタノール製造技術開発－SSCF のための糖化発酵技術－
16:10 ◦保谷典子，菊田弘和，富永詠美子，大西　徹（トヨタ自）

3B03p13　キシロース並行発酵細菌によるマイクロ波照射前処理木材の SSCF(同時糖化並行発酵)
16:21 ◦簗瀬英司，小島　基，高橋貴之，黒崎陽介[1]，大代正和[1]，桂　陽子[2]，瀬郷久幸[2]，松下　響[3]，保谷典子[3]，渡辺隆司[1]（鳥取大院・工，[1]京大・生存研，[2]日本化学機械製造，[3]トヨタ自動車）

3B03p14　高濃度キシロースを資化・発酵可能な *Saccharomyces cerevisiae* 実用酵母の創製
16:32 ◦冨高正貴，田口久貴，木田建次[1]，赤松　隆（崇城大，[1]熊大）

3B03p15　耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* を用いたセルロース系バイオマスからの効率的エタノール生産にむけた基盤研究
16:43 ◦松崎千秋，中川　明，小柳　喬，田中孝二郎，南　博道，玉置尚徳[1]，片山高嶺，山本憲二，熊谷英彦（石川県大・資源研，[1]鹿児島大農・生資化）

3B03p16　内在性遺伝子を活用したキシロース資化性サッカロマイセス酵母の開発
16:54 ◦福田　明，小西　仁，牟田口梢栄，上村　毅（JX 日鉱日石エネルギー(株)　中央技術研）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3B03p17　酸化還元バランスの調整によるキシロースからのエタノール醗酵収率の改善
17:15 ◦畠中治代，前田智秀，安江友里，西山和恵（サントリービジネスエキスパート(株)微生物科学研）

3B03p18　廃棄ソフトセルロース系バイオマス資源の土壌放線菌による糖化および糖化物のエタノール生産への利用
17:26 ◦長瀬恭平[1]，根本　純[2]，平野貴子[2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）

3B03p19　*Acremonium cellulolyticus* C-1 と *Saccharomyces cerevisiae* ATCC4126 の共培養による効率的なエタノール生産
17:37 ◦成瀬和弥，加藤竜也，朴　龍洙[1]（静岡大・農・応生化，[1]静岡大創科技院）

3B03p20　カクテルマルチコピーインテグレーション法を用いた Candida utilis のキシロース代謝酵素量比の最適化
17:48 ◦玉川英幸，吉田　聡（キリン HD･フロンティア技術研）

A04 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機—天然物 – 単離構造決定 – 微生物—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3A04a01　フミヅキタケの産生する植物成長調節物質の探索と合成
9:00 ◦伏見圭司，安西航太[1]，徳山真治[1]，桂　武彦[2]，切岩祥和[2]，松本則行[3]，関谷　敦[4]，橋爪大輔[5]，長澤和夫[6]，永尾大祐[7]，浅川倫宏[7]，菅　敏幸[7]，平井浩文[1]，河岸洋和（静大院・創造，[1]静大農・応生化，[2]静大農・バイオ，[3]新潟・森林研，[4]森林総研，[5]理研，[6]東農工大工・生命工，[7]静県大・薬）

3A04a02　チャナメツムタケ由来の生理活性物質の探索
9:11 ◦的場隆太，伏見圭司[1]，平井浩文，河岸洋和[1]（静大農・応生化，[1]静大院・創造）

3A04a03　Russula vinosa 子実体に由来する機能性物質の探索
9:22 ◦川出美咲，呉　　静[1]，高山真規子[2]，矢澤一良[2]，平井浩文，河岸洋和[1]（静大農・応生化，[1]静大院・創造，[2]東京海洋大院・海洋科学技術）

3A04a04　サケツバタケが産生する機能性物質に関する化学的研究
9:33 ◦呉　　静，徳山真治[1]，小山智之[2]，矢澤一良[2]，長井　薫[3]，松本哲夫[4]，平井浩文[1]，河岸洋和（静大院･創造，[1]静大農･応生化，[2]東京海洋大・ヘルスフード，[3]山梨大・医工総合，[4]群馬・林業研究所）

3A04a05　土壌分離細菌 MF32 株が生産する細菌のコロニー形成を促進する物質に関する研究
9:44 ◦河合　亮，山田哲也，藤野宣知，長澤寛道，作田庄平（東大院農生科・応生化）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3A04a06　糸状菌内に共生する細菌が産生する新規アシルホモセリンラクトン
10:05 ◦甲斐建次，笠松幸司，林　英雄（阪府大院・生命環境）

3A04a07　Staphylococcus aureus が産生する Pseudononas aeruginosa クオラムセンシング制御物質の単離・同定
10:16 ◦藤井健二，尾田健太郎[1]，新野啓介[2]，山田裕美[2]，老川　綾[2]，皆川　周[2]，加藤文紀[3]，奥田　潤[3]，菅井基行[3]，後藤直正[2]，北山　隆（近畿大院農バイオ，[1]近畿大農バイオ，[2]京都薬大，[3]広島大）

3A04a08　Streptomyces 属放線菌の自己胞子発芽抑制物質
10:27 ◦横山　森，柏木沙織，青木　友，川出　洋，夏目雅裕（農工大院・農）

3A04a09　放線菌 *Streptomyces* sp. TM-74 の産生するシデロフォアの構造決定

10:38 ◦小谷真也，小早川文哉，肥田木道生（静大・農）

3A04a10　放線菌 *Streptomyces* sp. MK-30 株からの bafilomycin 類縁体の単離と構造の決定

10:49 ◦肥田木道生，村尾綾子，小川直人，小谷真也（静大･農）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3A04a11　Fusarium 属菌の生産する新規な dihydrofusarubin 類の構造と生物活性

11:10 ◦鈴木大進，前地晃良[1]，石原　亨[1]，中島廣光[1]（鳥取大院･連農，[1]鳥取大・農）

3A04a12　シイタケの抗菌物質とその生産を促進するトリコデルマ代謝産物

11:21 ◦藤田真智子，石原　亨[1]，時本景亮[2]，中島廣光[1]（鳥取大院・農，[1]鳥取大・農，[2]菌蕈研）

3A04a13　子嚢菌 Lachnum palmae からの新規生物活性物質の探索

11:32 ◦田辺友佳, 松本拓矩, 細矢　剛[1], 供田　洋[2], 繁森英幸（筑波大院･生命環境科学，[1]国立科学博物館･植物研究部，[2]北里大院･薬）

3A04a14　菌類が生産するラッカーゼ阻害活性物質について

11:43 ◦尾形京子，貫名　学（山形大農）

3A04a15　微細藻 *Dunaliella salina* の有する抗ピロリ菌活性

11:54 ◦工藤勇人，柏木丈拡，青木章敏，島村智子，山口裕司[1]，竹中裕行[1]，竹内啓晃[2]，杉浦哲朗[2]，受田浩之（高知大農，[1]マイクロアルジェコーポレーション，[2]高知大医）

A04 会場　午後の部（14:00〜17:16）

有機―天然物 – 単離構造決定 – 動物―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3A04p02　ネコの本能行動を制御する嗅覚システムの解明

14:00 ◦宮崎雅雄，北條　涉，西村貴志，山下哲朗（岩手大･農）

3A04p03　ウメエダシャクとヒロオビトンボエダシャクの生殖隔離機構

14:11 ◦田久保賀子，中　秀司[1]，山川　玲，村上陽子，安藤　哲（農工大院・BASE，[1]鳥取大・農）

3A04p04　ウスタビガが産生する非共役ジエン構造を有する性フェロモンの同定

14:22 ◦宮地崇司，　Nguyen Duc Do，　中　秀司[1]，　安藤　哲（農工大院 BASE，[1]鳥取大 農）

3A04p05　コケガ亜科昆虫が分泌するメチル分岐を有する新規性フェロモンの立体化学の解明

14:33 ◦山川　玲，清田隆太郎，安藤　哲（農工大院・BASE）

3A04p06　メチル分岐を含む蛾類性フェロモンのキラル HPLC 分析

14:44 ◦牧迫沙織，山川　玲，丸山涼子，安藤　哲（農工大院 BASE）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3A04p07　GC-FT-IR を用いたイラガ性フェロモンの分析

15:05 ◦柴崎　寛, 山川　玲, 中　秀司[1], 安藤　哲（東農工大院･BASE，[1]鳥取大農）

3A04p08　Identification of a diterpene alcohol compound of the genus Reticulitermes（Rhinotermitidae）

15:16 ◦Nguyen Trong Tuan, Masaru Hojo[1], Yoko Takematsu[2], Ryohei Yamaoka, Toshiharu Akino（KIT, [1]RU, [2]YU）

3A04p09　ヤエヤマサソリ毒液由来殺虫性ペプチド LaIT1 の N および C 末端領域欠損体の合成と毒性評価

15:27 ◦長尾淳也，石堂嵩典，宮下正弘，中川好秋，宮川　恒（京大院農・応用生命）

3A04p10　ヤエヤマサソリ毒液由来殺虫性ペプチド LaIT1 の溶液構造と活性発現に重要な部位

15:38 ◦宮下正弘，堀田彰一朗[1]，宮川拓也[1]，中川好秋，永田宏次[1]，田之倉優[1]，宮川　恒（京大院農・応用生命，[1]東大院農生科・応生化）

3A04p11　マダラサソリ毒液由来殺虫性ペプチド Im-3 の配列同定とその毒性評価

15:49 ◦河内智行，宮下正弘，中川好秋，宮川　恒（京大院農・応用生命）

p12〜p17 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3A04p12　アメリカザリガニの外骨格に含まれるキチンに強固に結合しているタンパク質の構造・機能解析

16:10 ◦鈴木道生，杉坂亜里沙[1]，小暮敏博，長澤寛道[1]（東大・院理，[1]東大・院農）

3A04p13　アコヤガイ真珠層由来の基質タンパク質 Pif 80 におけるアラゴナイト結合部位の探索

16:21 ◦三木　匠，鈴木道生[1]，宮部耕成，長澤寛道（東大院農生科・応生化，[1]東大院理・地球惑星）

3A04p14　造礁サンゴの骨格タンパク質 galaxin 由来の組換えタンパク質を用いた機能解析

16:32 ◦川崎麻哉子，遠藤博寿，長澤寛道（東大院農生科・応生化）

3A04p15　アコヤガイの殻皮タンパク質の分子生物学的解析

16:43 ◦中山誠志，鈴木道生[1]，遠藤博寿，青木秀夫[2]，木下滋晴[3]，渡部終五[3]，長澤寛道（東大院農生科・応生化，[1]東大院理・地球惑星，[2]三重県水産研，[3]東大院農生科・水生科）

3A04p16　ミッドカイン(MK)を指標とした抗腫瘍活性スクリーニング〜海洋天然物ライブラリを用いて〜

16:54 ◦祖納元りえ，山城知佳，髙石花蓮[1]，金本昭彦[2]，石見盛太[2]，池松真也(沖縄高専, [1]KOUBE university, [2]OP バイオファクトリー）

3A04p17　淡水産貝類のカロテノイド分析

17:05 ◦越智淳子，眞岡孝至[1]，森　美穂，坂上吉一（近畿大院･農，[1]財団法人生産開発科学研究所）

A05 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機―天然物 – ケミカルバイオロジー，作用機構―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3A05a01　新規ヒスチジンキナーゼ阻害剤 signermycin B の作用機構

9:00 ◦木野弘量，渡邊崇史，五十嵐雅之[1]，岡島俊英[2]，梅北まや[1]，波多野和樹[1]，石井英治，江口陽子，内海龍太郎（近大院・農・バイオ，[1]微化研，[2]阪大・産研）

3A05a02　増殖に必須なレスポンスレギュレーター WalR に対する阻害剤 walrycin B の作用機構解析

9:11 平井有紀，◦吉岡誠訓，土井章弘，後藤恭宏，岡島俊英[1]，内海龍太郎（近畿大院・農・バイオ，[1]阪大・産研）

3A05a03　オイデスマン誘導体は転写因子 NF-κB シグナル伝達経路において複数のステップを阻害する

9:22 ◦田村隆一，陳　燕傑[1]，篠崎美和子[2]，荒尾　圭[3]，王　麗艶[3]，唐　万侠[3]，平野誠也[4]，小倉弘嗣[1]，満井智和[1]，竹谷　茂，安東政義[2]，片岡孝夫（京工繊大院・応生，[1]東工大・バイオセ，[2]新潟大・工，[3]新潟大院・自然科学，[4]京工繊大・応生）

3A05a04　TNF レセプター 1 のシグナル伝達経路に対するタンパク質合成阻害剤の作用機序の解析

9:33 ◦平野誠也，山田有理子[1]，長田裕之[2]，竹谷　茂[1]，片岡孝夫[1]（京工繊大・応生，[1]京工繊大院・応生，[2]理研基幹研）

3A05a05　炎症性サイトカインによる NF-κB シグナル伝達経路と遺伝子発現に対するキナクリンの作用機序の解析

9:44 ◦森元今日子，竹谷　茂，片岡孝夫（京工繊大院・応生）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3A05a06　クロイソカイメン中のオカダ酸，オカダ酸結合タンパク質の定量および局在

10:05 ◦松浦宏樹，小濱真実，福沢世傑[1]，橘　和夫[1]，長由扶子，山下まり，此木敬一（東北大院農・生物産業創成，[1]東大院理・化学）

3A05a07　クロイソカイメン細胞の培養およびオカダ酸結合タンパク質 OABP2.1 の局在

10:16　◦小濱真実，　松浦宏樹，　西谷　豪[1]，　伊東久美子[2]，大和田修一[1]，長由扶子，山下まり，此木敬一（東北大院農・生物産業創成，[1]東北大院農・応生科，[2]東北大院農）

3A05a08　海洋性カロテノイド，フコキサンチンのヒドロキシル基修飾体の細胞毒性とタンパク質結合体の作製

10:27　◦野村　駿，此木敬一，長由扶子，山下まり（東北大院農・生物産業創成）

3A05a09　ソフトコーラル由来の新規センブレン類のメラニン生成抑制活性

10:38　◦崔　鳳根，小鹿　一，金本明彦[1]，藤原健史[1]（名大院・生命農，[1]オーピーバイオ）

3A05a10　レモンフラボノイドおよびテルペノイドの生物活性の評価

10:49　◦山本涼平，井上和香，玉崎さとみ[1]，鶴田綾子[1]，古城綾佳[1]，武藤徳男（県広大院・生命，[1]県広大・生環）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3A05a11　ホウレンソウ由来フラボノイドの脱顆粒抑制活性の評価と作用解析

11:10　◦森下雄太，齋藤亜美[1]，久保田美紗[1]，代田　修[2]，黒柳正典[2]，武藤徳男（県広大院・生命，[1]県広大・生環，[2]徳文大・香川薬）

3A05a12　ステロイドホルモン受容体の転写活性に及ぼすフラボノイドの影響

11:21　◦飯田加賀美，池田和博[1]，米澤貴之，車　炳允，井上　聡[1]，永井和夫，禹　済泰（中部大・生機研，[1]埼玉医大・ゲノム医学研究セ・遺伝子制御）

3A05a13　ホスホジエステラーゼ 5 阻害剤による緑茶カテキン EGCG のがん細胞特異的アポトーシス誘導活性の増強

11:32　◦熊添基文，杉原香織，塚本俊太郎，鶴留ゆかり，上田直樹，鈴木貴視，黄　宇慧，末益優美，山田耕路，立花宏文（九大院農院・生機科）

3A05a14　緑茶カテキン EGCG 感知関連分子としての PP2A の同定

11:43　◦黄　宇慧，塚本俊太郎，隅田崇文，阿比留晶子，山田耕路，立花宏文（九大院農院・生機科）

3A05a15　ベタレイン色素の活性窒素種消去機構の解明とベタレイン色素中のイミンの役割

11:54　◦大井辰哉，前田麻起子，崎浜靖子，橋本　誠，橋床泰之（北大院農・応生科）

A05 会場　午後の部（14:00〜18:10）

有機―天然物 – ケミカルバイオロジー，作用機構―，―農薬―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3A05p02　光アフィニティーラベルによる機能解析を目指したジアジニルインドール酢酸の合成

14:00　◦村井勇太，橋床泰之，橋本　誠（北大院農）

3A05p03　Triflic acid を用いた Friedel-Crafts 反応によるビオチン新規誘導体化の検討

14:11　◦武藤靖幸，橋床泰之，橋本　誠（北大院農）

3A05p04　微量物質定量を指向した効率的クリック反応条件の検討

14:22　◦小笠原唯，橋床泰之，橋本　誠（北大院農）

3A05p05　光反応基 diazirine 含有 phenylalanine 誘導体を利用した新規光反応性 aspartame の合成

14:33　◦櫻井宗矩，橋床泰之，橋本　誠（北大院農）

3A05p06　カイコ休眠ホルモン断片誘導体の N- メチルアミノ酸置換体の合成と活性

14:44　◦羽立直樹，勝崎裕隆，鈴木幸一[1]，今井邦雄（三重大院生資，[1]岩手大農・農生）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3A05p07　パルミトイル化環状ペンタペプチド(C16-cyclo-KLRLN)立体異性体の休眠誘導能

15:05　◦中条友紀，勝崎裕隆，鈴木幸一[1]，今井邦雄（三重大院生資，[1]岩手大農・農生科）

3A05p08　シロイヌナズナの気孔形成を制御するペプチドホルモンの構造活性相関

15:16　◦杉田大河，平林智美，鋒山真由美，近藤竜彦，柿本辰男[1]，坂神洋次（名大院生命農・応用分子生命科，[1]阪大院・理）

3A05p09　プロリン残基に着目した CLV3 類縁体の構造活性相関

15:27　◦土屋玲一郎，　近藤竜彦，　横峯健二郎，　小林　耕，安江奈緒子，坂神洋次（名古屋大学大学院・生命農学研究科）

3A05p10　疫病菌交配ホルモンの構造活性相関

15:38　◦小鹿　一，モリシャイラジャ D.，戚　建華[1]，矢島　新[2]，四海圭祐[2]，今岡　忠[2]，額田恭郎[2]，薮田五郎[2]，坂神洋次（名大院・生命農，[1]浙江大・薬，[2]東農大・応生）

3A05p11　精密分子設計に基づいた細胞内フコシダーゼのマルチカラー蛍光イメージング剤の開発

15:49　◦塚越　匠[1]，袴田　航[1,2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]旧大院生資科・生物資源利用，[2]旧大生資科・生命化）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3A05p12　発光タンパク質 Pholasin のクロモフォア形成部位に関する研究

16:10　◦久世雅樹，田中瑛子[1]，西川俊夫[1]，滝川浩郷（神戸大院・農，[1]名大院・生命農）

3A05p13　Pradimicin A の水溶性アナログ・BMY-28864 とマンノースとの複合体の固体 NMR 解析

16:21　◦中川　優[1]，　土井崇嗣[2]，　竹腰清乃理[2]，　五十嵐康弘[3]，伊藤幸成[1,4]（[1]理研・基幹研，[2]京大院理・化学，[3]富山県大・生工，[4]JST・ERATO）

3A05p14　ミトコンドリア複合体-I におけるアセトゲニン結合部位の同定

16:32　◦中西佐予，安部真人，村井正俊，三芳秀人（京大院農・応用生命）

3A05p15　アシルホモセリンラクトン産生を阻害する生合成中間体アナログの開発

16:43　◦藤井裕城，前中理沙，甲斐建次，林　英雄（阪府大院・生命環境）

3A05p16　ナスミバエ雄誘引物質の合成および誘引活性

16:54　◦吉田幸広，小濱継雄[1]，松山隆志[1]，原口　大[1]，小野　肇，吉永直子，森　直樹，西田律夫（京大院・農，[1]沖縄県農研センター）

p17〜p21 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3A05p17　ニコチンとネオニコチノイドの活性に対するニコチン性受容体の古典的および非古典的ループ構造の影響

17:15　松井美佳奈，◦浅野拓也，伊原　誠[1]，山下敦子[1]，岡島俊英[2]，松田一彦（近畿大院・農・応生化，[1]理研播磨，[2]阪大・産研）

3A05p18　マンゴスチン(Garcinia mangostana L.)果皮由来キサントン類のヤマトシロアリおよびハスモンヨトウに対する摂食阻害活性

17:26　◦中村安希，森本正則，大西麻由，Oraphin Chantarasriwong[1]，Warinthorn Chavasiri[1]，松田一彦（近畿大農・応生化，[1]チュラロンコン大・理）

3A05p19　α-BHC およびその類縁体の合成と活性

17:37　◦田中啓司，森本正則，松田一彦，栗原紀夫[1]（近畿大学 農，[1]京都大学 農）

3A05p20　Insecticidal activity of(-)-(8R,8'R)-9,9'-epoxylignane against housefly

17:48　◦Tuti Wukirsari，Hisashi Nishiwaki，Yoshihiro Shuto，Satoshi Yamauchi（Aidai）

3A05p21　(+)-dihydroguaiaretic acid の構造と抗かび活性

17:59　◦長谷部綾香，秋山浩一[1]，西脇　寿，山内　聡（愛大農，[1]愛大総科支セ）

A06 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機―天然物 – 生合成，代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3A06a01　プラスミノーゲンモジュレーター SMTP 生合成の鍵となる新規前駆体 pre-SMTP の発見
9:00 ◦西村祐一，鈴木絵里子，蓮見恵司（東農工大・農）

3A06a02　ε-Poly-L-lysine 合成酵素におけるペプチド鎖長伸張機構の解析
9:11 ◦芋川祐紀，喜多彰洋，塩見真弓，鬼頭奈央子，丸山千登勢，宇多川隆，濱野吉十（福井県大・生物資源）

3A06a03　膜結合型 4'- ホスホパンテテイン転移酵素の機能解析
9:22 ◦鬼頭奈央子，宇多川隆，濱野吉十（福井県大生物資源）

3A06a04　Streptothricin(ST)生合成における非リボソームペプチド合成酵素の機能解析
9:33 ◦丸山千登勢，豊田順也，片野　肇，加藤康夫[1]，泉川美穂[2]，高木基樹[2]，新家一男[3]，宇多川隆，濱野吉十（福井県大･生物資源，[1]富山県大工・生工研セ，[2]JBIC，[3]産総研）

3A06a05　Streptothricin(ST)生合成酵素群に見出した L-アルギニン水酸化酵素の機能解析
9:44 矢野愛佳，丸山千登勢，金森祐介，泉川美穂[1]，高木基樹[1]，新家一男[2]，宇多川隆，◦濱野吉十（福井県大・生物資源，[1]JBIC，[2]産総研）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3A06a06　イソプレニル修飾酵素 ComQ のイソプレノイド選択性に関わるアミノ酸残基の同定
10:05 ◦山崎梨沙，辻　史忠[1]，岡田正弘[2]，石原紋子[1]，村上一馬[3]，入江一浩[3]，金丸京子[4]，坂神洋次[1]（名大農　応用生命科，[1]名大院応用分子生命科，[2]中部大応生　環境生物科，[3]京大院農　食品生物，[4]名大院　生物機構）

3A06a07　ゲラニルトリプトファンの生合成に関する研究
10:16 ◦石原紋子，辻　史忠，岡田正弘[1]，中川　彩，村上一馬[2]，入江一浩[2]，金丸京子[3]，坂神洋次（名大院生命農･応用分子生命科，[1]中部大応生・環境生物科，[2]京大院農・食品生物，[3]名大院・生物機構）

3A06a08　EST 解析を基盤とするビベンジルカンナビノイド生合成遺伝子の探索
10:27 ◦田浦太志，兼目裕充[1]，高橋宏暢[1]，野路征昭[1]，橋本敏弘[1]，豊田正夫[1]，浅川義範[1]（九州大・薬，[1]徳島文理大・薬）

3A06a09　紅藻ウラソゾ(*Laurencia nipponica*)由来のハロゲン化酵素の解析
10:38 ◦金子賢介，鷲尾健司，森川正章，沖野龍文（北大院・環境）

3A06a10　ミドリサンゴ由来 β-amyrin 合成酵素 F728 残基の機能解析
10:49 ◦増川友夏里，橋本一平，伊藤遼介，仲野千秋，佐藤　努，星野　力（新潟大院自然科学）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3A06a11　27-noroxidosqualene の β-アミリン合成酵素産物
11:10 ◦山口雄生，千葉彬史，仲野千秋，佐藤　努，星野　力（新潟大院自然科学）

3A06a12　好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌由来の新規非環状セスタ・トリテルペンおよび新規テルペン合成酵素の同定
11:21 佐藤　努，◦山鹿宏彰，鹿島将志，中島真美[1]，仲野千秋，星野　力（新潟大自然科学･農応生化，[1]新潟大機器分析センター）

3A06a13　チャ Camellia sinensis の花における安定同位体標識 L-フェニルアラニンからアセトフェノン，1-フェニルエタノールへの代謝変換経路の解析
11:32 ◦DONG Fang, YANG Ziyin, BALDERMANN Susanne, 大西利幸，渡辺修治(静大)

3A06a14　強遮光処理条件下で栽培された白葉化茶の代謝物変動評価
11:43 ◦友村美穂[1]，楊　子銀[2]，小林栄人[3]，勝野　剛[2,3]，淺沼俊倫[4]，藤森玉輝[5]，石川貴正[5]，望月一男[6]，渡瀬隆也[6]，中村順行[3]，渡辺修治[1,2]（[1]静岡大学農学部，[2]静岡大学創造科学技 術大学院，[3]静岡県農林技術研究所茶業研究センター，[4]財団法人しずおか産業創造機構，[5]ヒュー マン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社，[6]静岡県工業技術センター）

3A06a15　バラ香気成分 2-phenylethanol 生合成経路を変化させる要因と中間体解析
11:54 ◦神田桃代，平田　拓[1]，石田晴香[2]，大西利幸[3]，渡辺修治[1]（静岡大農，[1]静岡大創科技院，[2]静岡大院農，[3]静岡大 GRL）

A06 会場　午後の部（14:00〜17:59）

有機―天然物 – 生合成，代謝―，―その他―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3A06p02　花芽誘導物質 LDS1 生合成経路の解明
14:00 ◦河橋辰哉，村田有明[1]，大西利幸[2]，渡辺修治[1]（静大院･農，[1]静大院・創造，[2]静大・GRL）

3A06p03　オオイタドリの誘導抵抗反応におけるアミノ酸由来ニトリルの生合成
14:11 ◦野下浩二，阿部　誠，田母神繁（秋県大・生資科）

3A06p04　クチナシにおけるイリドイド cerbinal の傷害誘導とその生合成経路
14:22 ◦内藤裕彬，網干貴子，吉永直子，小野　肇，西田律夫，森　直樹（京大院農・応用生命）

3A06p05　イネ *sl* 変異体に感染したごま葉枯病菌によるインドール -3- 酢酸の生産
14:33 ◦深水愛理沙，石原　亨[1]，宮川　恒[2]，中島廣光[1]，若狭　暁[3]（鳥取大院・農，[1]鳥取大・農，[2]京都大院・農，[3]東農大・応生科）

3A06p06　ソルガムにおける 5-deoxystrigol の酸化的代謝の解析
14:44 ◦本並宜子[1]，中嶌　瞳[1,2]，上野琴巳[1]，水谷正治[1]，滝川浩郷[1,2]，杉本幸裕[1,2]（[1]神戸大院・農，[2]JST/JICA SATREPS）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3A06p07　キイロショウジョウバエ幼虫の脂肪酸-アミノ酸縮合物(FACs)生合成におけるアミノ酸選択性
15:05 ◦吉田哲也，吉永直子，網干貴子，福井昌夫[1]，西田律夫，森　直樹（京大院農・応用生命，[1]京大院農・応用生物）

3A06p08　昆虫種間における volicitin 類縁体生合成能の比較
15:16 ◦森田沙代，内藤裕彬，吉田哲也，網干貴子，吉永直子，小野　肇，西田律夫，森　直樹（京大院農・応用生命）

3A06p09　鱗翅目幼虫の腸管内におけるヒドロキシ脂肪酸
15:27 ◦村上真一郎，網干貴子[1]，吉永直子[1]，小野　肇[1]，西田律夫[1]，森　直樹[1]（京大農・応用生命，[1]京大院農・応用生命）

3A06p10　ホウレンソウケナガコナダニの脂質代謝
15:38 ◦網干貴子，本田善之[1]，天野　洋，森　直樹（京大・農，[1]山口農総技）

3A06p11　沖縄産シリケンイモリ(*Cynops ensicauda popei*)の新規テトロドトキシン類縁体の単離・構造決定，及びイモリとフグの毒組成比較
15:49 ◦工藤雄大，此木敬一，長由扶子，安元　健[1]，山下まり（東北大・院農，[1]食品分セ）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3A06p12　7,9'-エポキシリグナンであるラリシレジノールの 9 位誘導体の植物生長阻害活性
16:10 ◦熊本光子，西脇　寿，首藤義博，山内　聡（愛大農）

3A06p13　7,7'-エポキシリグナンの立体構造と植物生長阻害活性
16:21 ◦中山矩美子，熊本光子，西脇　寿，首藤義博，山内　聡（愛大農）

3A06p14　確実なペプチド配列解析を目指した ESI-MS/MS におけるイオン系列分離法の開発研究

16:32 ○金丸沙樹，坂元君年，紺野勝弘[1]，橋本　勝（弘前大・農学生命，[1]富山大・和漢研）

3A06p15　酵素リパーゼの鏡像体選択性の機構解明に向けた大規模生体分子量子化学計算

16:43 ○矢城陽一朗[1,2]，守屋陽輔[2]，今川　敦[2,3]，木村崇知[3]，亀澤　誠[3]，直島好伸[1,2]（[1]岡山理大・自然科学研，[2]岡山理大院・総合情報，[3]甲南化工）

3A06p16　植物フラボノイドの DNA ポリメラーゼ /DNA トポイソメラーゼ阻害活性とヒトがん細胞増殖への影響

16:54 ○塩見一明，栗山磯子，吉田弘美，水品善之（神戸学院大栄養・栄養）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3A06p17　フロフラボノイド類の合成及び前骨髄性白血病細胞 HL-60 増殖抑制活性

17:15 ○齋藤裕介，川井　悟，常盤野哲生[1]，吉澤結子[1]（東電大理工，[1]秋田県大生資科）

3A06p18　アザフラボノイド類の合成とその増殖抑制活性

17:26 ○檜山昂彦，遠藤功太郎，川井　悟，常盤野哲生[1]，吉澤結子[1]（東電大理工，[1]秋田県大生資科）

3A06p19　AGE 形成阻害剤のスクリーニング系に関する研究

17:37 ○三橋進也，李　大馨，重冨顕吾，生方　信（北大･院農･応生科）

3A06p20　ヒト肺線癌抑制における Nitidine 経口摂取の有用性に関する研究

17:48 ○平良直幸，岩崎公典，屋　宏典（琉大　熱生研）

A07 会場　午前の部（9:00〜11:54）

有機―合成，反応機構―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3A07a01　カテキン代謝物の合成：5-(2,4-Dihydroxyphenyl)-γ-valerolactone の合成

9:00 ○成瀬俊一，濱田昌弘，岸本崇生，中島範行（富山県大工）

3A07a02　7 位が酸素化された Strigolactone 類の合成研究

9:11 ○田中政志，久世雅樹，滝川浩郷（神戸大院・農）

3A07a03　5- デオキシストリゴールメトキシ誘導体の合成と AM 菌菌糸分岐誘導活性

9:22 ○佐渡愛香，山田明宏[1]，秋山康紀[1]，林　英雄[1]（阪府大・生命環境，[1]阪府大院・生命環境）

3A07a04　Boronolide の両鏡像異性体の合成と植物生長阻害活性

9:33 ○西村大樹，礒崎泰好，西脇　寿，首藤義博，山内　聡（愛大農）

3A07a05　抗かび活性を有する 5,6 −ジヒドロ−α−ピロン化合物の全立体異性体の合成

9:44 ○礒崎泰好，西村大樹，秋山浩一[1]，西脇　寿，山内　聡（愛大農，[1]愛大総科支セ）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3A07a06　ラジカル環化反応を用いたサンタロール誘導体の合成研究

10:05 ○山田慎也，石神　健，渡邉秀典（東大院農生科･応生化）

3A07a07　生合成仮説に基づく(-)-Chamobtusin A の合成

10:16 ○森　直紀，葛谷一馬，石神　健，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

3A07a08　MRSA や VREF に対して抗菌活性を示す neurymenolide 類の合成研究

10:27 ○桜井なつ樹，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

3A07a09　(+)-Anthecularin の不斉全合成

10:38 ○小倉由資，岡田笑子，石神　健，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

3A07a10　分裂期キネシン KSP(Eg5)阻害剤 terpendole E の誘導体合成

10:49 ○大澤誠也[1,2]，清水　猛[1]，本山高幸[1]，福島有佳子[1]，川谷　誠[1]，柴　隆一[2]，長田裕之[1]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー，[2]東電大院工・物質工）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3A07a11　Paspalicine および Paspalinine の合成研究

11:10 ○榎本　賢，森田　暁，桑原重文（東北大院農・生物産業創成）

3A07a12　Pestaloquinol A 及び B の合成研究

11:21 ○陰山真将，桑原重文（東北大院農・生物産業創成）

3A07a13　Lactimidomycin の全合成研究

11:32 ○永沢友裕，桑原重文（東北大院農・生物産業創成）

3A07a14　Rumphellaone A および Hushinone の合成研究

11:43 ○廣川高史，桑原重文（東北大院農・生物産業創成）

A07 会場　午後の部（14:00〜17:59）

有機―合成，反応機構―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3A07p02　アセトゲニン類における bis-THF 骨格の立体選択的構築法の開発

14:00 ○古田亜希子，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

3A07p03　タイワンハッカより見出された新規モノテルペン化合物の合成による構造確認

14:11 ○小西俊介[1,2]，渡邉秀典[1]（[1]東大院農生科，[2]長谷川香料㈱）

3A07p04　イネいもち病菌毒素ピリキュラリオールはラセミ体であった

14:22 ○清田洋正，佐々木郁香，長島優太，田中功二，兵藤孝次，貫名　学[1]，桑原重文（東北大院農・生物産業創成，[1]山形大・農）

3A07p05　Maoecrystal V の合成研究

14:33 ○小竹正晃，浅尾洋樹，佐々木郁香，島崎泰治，桑原重文，清田洋正（東北大院農・生物産業創成）

3A07p06　破骨細胞形成阻害活性を有する chaxine A の合成

14:44 ○籠原裕磨，矢島　新，四海圭祐，勝田　亮，額田恭郎（東農大応生）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3A07p07　抗真菌活性を有するテトラミン酸誘導体 virgineone の合成研究

15:05 ○伊田千絵子，谷口佳代子，矢島　新，勝田　亮，額田恭郎（東農大応生）

3A07p08　疫病菌繁殖誘導ホルモン α2 の合成と立体化学の決定及び α1 の新規合成

15:16 ○矢島　新，戸田　皓，Shylaja D. Molli[1]，小鹿　一[1]，額田恭郎（東農大・応生，[1]名大院・生命農）

3A07p09　C-N 軸性キラリティを利用した種々の 3,3-二置換オキシインドール骨格の合成

15:27 中崎敦夫，○森　綾子，小林　進[1]，西川俊夫（名大院生命農，[1]東理大薬）

3A07p10　インドールアルカロイド Sespendole 芳香環部分の合成研究と立体化学の決定

15:38 ○樋口恵子，Nopporn Thasana，安立昌篤，西川俊夫（名大院生命農）

3A07p11　海産アルカロイドチャルテリン C の合成研究

15:49 ○原由香里，梶井重男，中崎敦夫，磯部　稔，西川俊夫（名大院生命農）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3A07p12　生合成類似環化反応による新規インドールテルペン類の合成研究

16:10 ○井坂哲也，長谷川守文[1]，戸嶋浩明[1]（農工大院・連農，[1]茨大・農）

3A07p13　カーバマートのヨード環化反応を用いたデオキシアミノ糖類の新規合成法の開発
16:21　◦松島芳隆，記野　順（浜松医科大学・化学）
3A07p14　アミノ酸を触媒としたベンゼンの直接的アリール化
16:32　◦上野　穫，谷森紳治，切畑光統（阪府大院生命環境・応生科）
3A07p15　Surugapyrone B の全合成による絶対構造の解明ならびに誘導体の合成と抗酸化性評価
16:43　◦大向宏明，谷森紳治，切畑光統（阪府大院生命環境・応生科）
3A07p16　高活性型ライトフルオラスメタセシス触媒の合成
16:54　◦土屋勇輝，小林佑基，鈴村直紀，塩入孝之，松儀真人（名城大・農）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3A07p17　シクロアルカン熱応答性多相電解溶液における連続的コルベカップリング
17:15　◦上村和也，岡田洋平，千葉一裕（東農工大・農）
3A07p18　陽極酸化を用いた置換ピロリジンの一段階合成
17:26　◦小路貴生，岡田洋平，金　承鶴，千葉一裕（東農工大･農）
3A07p19　アルコール及びアルケンからのアミド化合物との反応による N- 置換アミドの合成
17:37　◦岡田　郁，千葉一裕，北野克和（東農工大・農）
3A07p20　環境調和型酸化的エーテル環化反応の開発
17:48　◦知名秀泰，岡田　豊（立命館大・生命科学）

A08 会場　午前の部（9:00〜11:54）

生体高分子—タンパク質—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3A08a01　サイトカイン LECT2 及び V58I 変異体のリフォールディング及び構造とダイナミクスの解析
9:00　◦鄭　　海，宮川拓也，澤野頼子，山越　智[1]，鈴木和男[2]，田之倉優（東大院・農生科，[1]国立感染研・生物活性物質，[2]千葉大院・医）
3A08a02　タンパク質の品質評価における示差走査蛍光定量の応用
9:11　◦稲垣かおる，古澤孝太[1]，露崎知世[1]，鈴木文昭[1]，中川　寅[1]，海老原章郎[1]（岐大院・応生，[1]岐大・応生）
3A08a03　オボアルブミン重合体形成におけるフォールディング中間体の寄与
9:22　◦杉田知衣梨，高橋延行，三上文三（京大院農・応用生命）
3A08a04　高圧巻き戻しを利用した高品質タンパク質結晶の作製
9:33　◦宮園健一，堤　香苗，石野良純[1]，田之倉優（東大院農生科・応生化，[1]九大院農院・生機科）
3A08a05　強磁場利用によるタンパク質結晶の高品質化
9:44　◦中村　顕，大塚　淳，宮園健一，山村昭裕，窪田恵子，広瀬量一[1]，廣田憲之[2]，安宅光雄[3]，澤野頼子，田之倉優（東大院農生科・応生化，[1]JASTEC，[2]物材機構，[3]産総研）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3A08a06　脂質立方相を用いた膜タンパク質結晶化における添加剤の影響
10:05　◦城塚秀之，小杉正幸，日比真仁，竹田一旗，三木邦夫（京大院理）
3A08a07　バクテリオファージ φ X174 スパイク G タンパク質の 5 量体構造形成機構の解析
10:16　◦伊藤静香，南平麻衣，稲垣　穣（三重大院生資）
3A08a08　新規イソ型 dioscorin のクローニングと構造・機能解析
10:27　◦薛　友林，宮川拓也，中村　顕，澤野頼子，田之倉優（東大院・農生科）
3A08a09　高等植物型フェリチンの N- 末端領域はフェリチン多量体の会合に関与する
10:38　◦増田太郎，森本晋一郎[1]，三上文三[2]，豊原治彦[1]（京大院農・農，[1]京大院農・応用生物，[2]京大院農・応用生命）
3A08a10　水酸化アミノ酸生産に有用な *Burkholderia ambifaria* AMMD 由来新規 Fe(II)/α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼの構造解析
10:49　◦秦　慧民，宮川拓也，河嶋隆志[1]，日比　慎[1]，小川　順[1]，田之倉優（東大院・農生科，[1]京大院・農）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3A08a11　水酸化アミノ酸の立体選択的合成に有用なアルドラーゼ(asHPAL)の X 線構造解析
11:10　◦郭　琳珺，岡井公彦，間瀬朋子，Imai Fabiana Lica，宮川拓也，日比　慎[1]，小川　順[1]，田之倉優（東大院農生科・応生化，[1]京大院農・応用生命）
3A08a12　多糖アルギン酸の取り込みに関わる細菌由来 ABC トランスポーターの X 線結晶構造解析
11:21　◦丸山如江，伊藤貴文，西谷　悠，三上文三，橋本　渉，村田幸作（京大院・農）
3A08a13　好熱性アーキア由来タイプ 2 イソペンテニルニリン酸イソメラーゼの四次構造に対する基質結合の影響
11:32　◦中谷仁美，郷田秀一郎[1]，海野英昭[1]，長井拓也，吉村　徹，邊見久（名大院生命農・応用分子生命科，[1]長崎大院・工）
3A08a14　*Shewanella* 属細菌由来の相同 Cytochrome c_5 の安定性
11:43　◦政成美沙，若井　暁，加藤千明[1]，為我井秀行[2]，栗原達夫[3]，三本木至宏（広島大院･生物圏，[1]JAMSTEC，[2]日大･文理，[3]京大･化研）

A08 会場　午後の部（14:00〜17:05）

生体高分子—タンパク質，多糖質—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3A08p02　プリオンタンパク質は弱い相互作用でニューレグリンと結合する.
14:00　◦有井康博，山口秀徳[1]，桑原寿江[1]，福岡伸一[1]（武庫女大･生活環境，[1]青学大院・理工）
3A08p03　アピオス塊茎由来レクチンの分離精製と性質
14:11　◦入江　聡，上妻由章，米倉政実（茨城大農・資生科）
3A08p04　ブナシメジ由来レクチンの精製と諸性質
14:22　◦阿部智也，梅原香奈子，鈴木智大[1]，小林夕香[2]，道羅英夫[3]，平井浩文，河岸洋和[4]（静大農・応生化，[1]静大・イノベーション，[2]J- オイルミルズ，[3]静大・遺伝子，[4]静大院・創造）
3A08p05　コムラサキシメジ由来レクチン遺伝子のクローニング
14:33　◦松葉　悠，岡山紗也，鈴木智大[1]，小林夕香[2]，道羅英夫[3]，村田健臣，平井浩文，河岸洋和[4]（静大農･応生化，[1]静大･イノベーション，[2]J- オイルミルズ，[3]静大・遺伝子，[4]静大院・創造）
3A08p06　レクチン - 致死活性物質複合体によるプロテアーゼ活性発現機構の解明
14:44　◦藤田基寛，鈴木智大[1]，道羅英夫[2]，平井浩文[3]，河岸洋和（静大院･創造，[1]静大･イノベーション，[2]静大･遺伝子，[3]静大農･応生化）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3A08p07　酵母 two-hybrid 法を用いたスギヒラタケ致死性高分子遺伝子の取得
15:05　◦大前沙央理，鈴木智大[1]，平井浩文，河岸洋和[2]（静大農･応生化，[1]静大・イノベーション，[2]静大院・創造）
3A08p08　白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* を用いたスギヒラタケレクチンの大量発現系の構築
15:16　◦鈴木智大，藤田基寛[1]，田原慎太郎[2]，徳山真治[2]，平井浩文[2]，河岸洋和[1]（静大･イノベーション，[1]静大院･創造，[2]静大農･応生化）
3A08p09　ムラサキナギナタタケレクチンの構造と糖結合特異性
15:27　リモビトリス，西　香織[1]，下川倫子，南　雄二[1]，◦八木史郎[1]（鹿児島農連大，[1]鹿児島大農・生資化）

3A08p10　エゾニワトコ果実レクチンの性質と構造

15:38　◦綿　文禎，坂本　光，舘野浩章[1]，平林　淳[1]，小栗　秀（東農大生物産業・生物生産，[1]産総研・糖鎖医工学）

3A08p11　チョウセンアサガオ種子に含まれるレクチンの一次構造

15:49　◦西本圭佑，坂本　光，仲下英雄[1]，小栗　秀（東農大生物産業・生物生産，[1]東農大応生科・化学）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3A08p12　糖結合サブドメインへの変異導入による溶血性レクチン CEL-III の機能向上

16:10　◦清水良樹[1,2]，米倉政実[2]，上妻由章[2]（[1]東農工大・連農，[2]茨大・農）

3A08p13　イトマキヒトデレクチンおよびその変異体の糖結合活性測定

16:21　◦畠山智充，小松紗世，小笠原未紗，馬場智大，狩野良太，海野英昭，郷田秀一郎，沖野　望[1]，伊東　信[1]（長崎大院・工・物質科学，[1]九大院・農・生命機能）

3A08p14　tRNA および DNA 切断酵素 PaT のキャラクタリゼーション

16:32　◦田中　亘，茂松　恵，小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東大院農生科・応生工）

3A08p15　マイクロ波処理を利用した果実クチクラ膜の簡単な調製法の開発

16:43　◦東　順一，尾崎嘉彦[1]，米森敬三（京大院農，[1]農研機構果樹研）

3A08p16　リンゴ果実クチクラ膜の成長に伴う化学的，力学的性質の変化

16:54　◦松村由貴，尾崎嘉彦[1]，坂本正弘，東　順一（京大院農・地域環境，[1]農研機構果樹研）

C09 会場　午前の部（9:00〜12:05）

酵素—酸化還元酵素—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C09a01　Purification of the enzyme involved in microbial metabolism of curcumin

9:00　◦Azam Hassaninasab，Yoshiteru Hashimoto，Michihiko Kobayashi（Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

3C09a02　紅色光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* を用いたコハク酸脱水素酵素複合体の異種生物間発現

9:11　◦坂元君年，Aldrat Hendri[1]，北　潔[1]（弘前大農学生命，[1]東大院医）

3C09a03　点変異導入によるサツマイモ桂皮酸オルト位水酸化酵素の基質認識アミノ酸残基の探索

9:22　◦岩田友子，柴田行範，清水文一（東洋大・生命）

3C09a04　*Streptomyces coelicolor* が産生する菌体外ジアホラーゼの発見と解析

9:33　◦老沼研一，山口　格，高野英晃，上田賢志（日大・生物資源）

3C09a05　Enterococcus 属乳酸菌の D 型マンデル酸脱水素酵素の解析

9:44　◦高橋　葉，藤沢伸介，宮永顕正，田口速男（東理大･理工･応生科）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C09a06　耐塩性乳酸菌 Tetragenococcus halophilus 由来の LDH の精製と性質

10:05　◦折重広大，山田美穂，市毛朝雄[1]，小山泰二[1]，藤田信之[2]，荒井一人，宮永顕正，田口速男（東京理大応生科，[1]野田産研，[2]NITE）

3C09a07　ニワトリ脂肪肝で特異的に発現する機能未知タンパク質の機能解析

10:16　◦米田一成，荒木朋洋，仁木隆博，櫻庭春彦[1]，大島敏久[2]，芝田　猛（東海大・農，[1]香川大・農，[2]九大院・農）

3C09a08　大腸菌における膜結合型グルコース脱水素酵素の N 末端領域の機能解析

10:27　◦山﨑理恵子[1]，藤元奈保子[1]，横山加奈[1]，高坂智之[2]，山田　守[1,2]（[1]山口大院医・応用分子，[2]山口大農・生機）

3C09a09　セレンオキシアニオン還元細菌の単離と特性解析

10:38　◦永野知哉，斎藤茂樹，谷　泰史，Prakash N. Tejo[1]，三原久明（立命館大・生命科学，[1]Dept. Biotech. & Environ. Sci.・Thapar Univ.）

3C09a10　*Aspergillus oryzae* RIB40 由来ギ酸オキシダーゼにおける Arg554 の機能

10:49　◦若泉杏奈，大竹　拓，沖　昌也，内田博之，三上文三[1]（福井大・工，[1]京都大・農）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C09a11　新規ウルソデオキシコール酸生成腸内細菌 *Ruminococcus gnavus* N53 由来の 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase の発現と機能解析

11:10　◦李　慈英，荒井尚志，吹谷　智，和田　大，横田　篤（北大院農・応生科）

3C09a12　ヒト・NADPH －シトクロム P450 還元酵素における R457H 変異型酵素の機能解析

11:21　◦張　　栩，深見真紀[1]，緒方　勤[2]，本間桂子[3]，片桐昌直（大教大，[1]成育医療研究センター，[2]浜松医大，[3]慶大病院）

3C09a13　タンパク質工学的手法によるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの基質特異性改良

11:32　◦平尾理恵，北林雅夫[1]，西矢芳昭[2]，石田博樹[3]，秦　洋二[3]（東洋紡・敦賀バイオ研，[1]東洋紡・バイオケミカル，[2]摂南大・理工，[3]月桂冠・総合研）

3C09a14　*Rhodosporidium paludigenum* VMA4 の生産するバニリルマンデル酸脱水素酵素の解析と神経芽細胞腫スクリーニングへの応用

11:43　◦三井亮司，河野和也，堀内功典，藤井　正[1]，福士　勝[1]，田中三男（岡山理大・理，[1]札幌 I.D.L）

3C09a15　食品添加物の安全性評価への大腸菌発現ヒト P450 酵素の利用

11:54　◦後藤達志，森　大気，三木　悠，今石浩正（神戸大・遺伝子）

C09 会場　午後の部（13:49〜18:10）

酵素—酸化還元酵素—その他—

p01〜p06 発表者の接続時間④ 13:39〜13:49

3C09p01　ピレン資化性菌 Mycobacterium sp. H2-5 株の新規複合体 II のサブユニット構成

13:49　◦須田裕介，桑原悠輔，稲岡ダニエル健[1]，北　潔[1]，峯木　茂（東理大・理工，[1]東大・医）

3C09p02　Iron-sulfur cluster in 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase from Sulfolobus tokodaii, a thermoacidophilic archaeon

14:00　◦Zhen YAN，Shinya Fushinobu，Takayoshi Wakagi（University of Tokyo, Department of Biotechnology）

3C09p03　嫌気性アンモニア酸化(anammox)菌由来の銅型亜硝酸還元酵素の性質

14:11　◦大久保寛幹，木戸理保子，平　大輔，古川憲治[1]，藤井隆夫（崇城大・応生命，[1]熊大院・自然科学）

3C09p04　アルブチン・ゲンチジン酸の酸化的縮合物の分光学的性質

14:22　◦木曽太郎，桐生高明，村上　洋，中野博文（阪市工研）

3C09p05　*Mycobacterium* sp. H2-5 による多環芳香族炭化水素分解に関わる初発酸化酵素の基質特異性

14:33　◦都築周作，中川　準，清水悠子，土田健人，後藤純雄[1]，峯木　茂（東理大院・応生科，[1]麻布大・環境科）

3C09p06　高感度信号累積型 ISFET バイオセンサー(AMIS センサー)および生理活性測定装置(AMIS)を用いたガラクトース，ラクトースの簡便定量

14:44　°佐々木康孝，谷　敏夫，小川　順[1]（(株)バイオエックス，[1]京大院農・応用生命）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C09p07　膜結合酸化還元酵素の可溶性変異体の発現とそれを用いた電子伝達メカニズムの解明

15:05　°河井翔太，薬師寿治[1]，松下一信[1]，白井　理，加納健司（京大院・農，[1]山大院・農）

3C09p08　クラス III 型 carbazole 1,9a-dioxygenase における ferredoxin-terminal oxygenase 間の結合解離メカニズムの解明

15:16　°松澤　淳，梅田隆志，相川大樹，藤本　瑞[1]，山根久和，野尻秀昭（東大生物工学セ，[1]農生資研）

3C09p09　*Novosphingobium* sp. KA1 株由来フェレドキシンが高い酸化還元電位を持つ原因の解明

15:27　°梅田隆志，安保　充[1]，山根久和，野尻秀昭（東大生物工学セ，[1]東大院農生科・応生化）

3C09p10　嫌気性アンモニア酸化(anammox)菌由来 NaxLS 複合体の結晶構造

15:38　°平　大輔，中村照也[1]，山縣ゆり子[1]，古川憲治[2]，藤井隆夫（崇城大・応生命，[1]熊大院・薬，[2]熊大院・自然科学）

3C09p11　*Rhizobium* sp. strain MTP-10005 由来フラビン還元酵素の X 線結晶構造解析

15:49　°山内貴恵[1]，藤井知実[2]，吉田雅博[3]，老川典夫[3]，畑　安雄[2,1]（[1]京大・生存基盤，[2]京大・化研，[3]関大・化学生命工）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C09p12　新規イソニトリルヒドラターゼの機能解析

16:10　°佐藤太祐，橋本義輝，小林達彦（筑波大院・生命環境）

3C09p13　ニトリル合成酵素の変異体構築および諸性質の解析

16:21　°野村純平，橋本義輝，小林達彦（筑波大生命環境）

3C09p14　アクリルアミド工業生産酵素の翻訳後成熟化機構モデル

16:32　°鷲澤結実，崔　天蔚，周　哲敏，橋本義輝，小林達彦（筑波大院・生命環境）

3C09p15　結核菌由来ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの機能解析とピラジン酸による抗結核菌活性との関連性

16:43　°森茂太郎，柴山恵吾，荒川宜親[1]（国立感染研・細菌二，[1]名大院・医）

3C09p16　大腸菌由来ウンデカプレニルニリン酸合成酵素活性における二価金属イオンおよび界面活性剤濃度の影響

16:54　°小西健太，中西　猛，北村昌也（阪市大・院工・化生）

p17〜p21 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3C09p17　ピロリン酸検出を用いた，シトルリン・アルギニン新規定量法の開発

17:15　°亀谷将史[1]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST ERATO）

3C09p18　生体試料分析のためのピロリン酸定量系の構築

17:26　°氷見茉莉子[1]，亀谷将史[1]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST ERATO）

3C09p19　L-グルタミン酸オキシダーゼより作成した L-ヒスチジンオキシダーゼの性質検討

17:37　°稲垣賢二，中井隆一郎，内海友宏，有馬二郎，日下部均[1]，田村　隆（岡山大院自然科学，[1](株)エンザイムセンサ）

3C09p20　超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* による D-アミノ酸の代謝

17:48　°川上竜巳，櫻庭春彦[1]，大島敏久[2]（佐賀大・分析セ，[1]香川大・農，[2]九州大院・農）

3C09p21　ヒト肺細胞由来セレノリン酸合成酵素アイソザイムの相互作用解析

17:59　°奥河内貴大，田村　隆，稲垣賢二（岡山大院･自然科学）

C10 会場　午前の部（9:00〜12:05）

酵素—糖質代謝関連酵素(キチナーゼ)—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C10a01　食虫植物ウツボカズラ由来キチナーゼの反応機構

9:00　°本多裕司，石崎佳奈，新井祥子，濱田達朗[1]（石川県大・生資環，[1]石川県大・資源研）

3C10a02　LysM ドメイン(CBM50)のキチンオリゴ糖結合様式

9:11　°大沼貴之，翁長彰子[1]，平良東紀[1]，深溝　慶（近畿大･農，[1]琉球大・農）

3C10a03　シダ植物由来 LysM-キチナーゼのキチン結合活性および抗真菌活性におけるドメインの役割

9:22　°新垣悠平，翁長彰子，稲嶺咲紀，伊藤　進，平良東紀（琉大農・亜熱生資）

3C10a04　パイナップル緑葉由来キチナーゼ-C の翻訳後修飾および抗真菌活性

9:33　°平良東紀，秋元理沙（琉大農・亜熱生資）

3C10a05　*Streptomyces griseus* 由来推定キチン結合タンパクの異種発現と機能解析

9:44　°工藤まどか，中川裕子，鈴木一史[1]，渡邉剛志[1]，戸谷一英（一関高専・物化工，[1]新潟大農・応生化）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C10a06　*Streptomyces griseus* 由来の CBM33 の機能解析

10:05　°中川裕子，　工藤まどか，　Vaaje-kolstad Gustav[1]，Eijsink Vincent[1]，戸谷一英（一関高専・物化工，[1]Chem. Biotech. Food Sci.・Norwegian Univ. Life Sci.）

3C10a07　*Serratia marcescens* キチン分解利用関連遺伝子の遺伝子破壊

10:16　高野慎也[1]，　佐々木直美[1]，　本間祥太[1]，　小川知佐奈[2]，杉本華幸[1,2]，　鈴木一史[1,2]，　°渡邉剛志[1,2]（[1]新潟大院･自然科学，[2]新潟大農・応用生化）

3C10a08　NMR 法によるライムギ種子 Family GH-19 キチナーゼの基質結合解析

10:27　°岡崎蓉子，新家粧子，近藤香織[1]，福田達也，大沼貴之，沼田倫征[2]，深溝　慶（近畿大院農・バイオ，[1]近畿大農・バイオ，[2]産技総研バイオ）

3C10a09　Family GH-19 キチナーゼの触媒中心近傍アミノ酸残基の部位特異的変異

10:38　°浦崎　惇，福田達也，田中遼馬[1]，大沼貴之，平良東紀[2]，深溝　慶（近大農院・バイオ，[1]近大農・バイオ，[2]琉球大・農・亜熱生資）

3C10a10　(GlcNAc)2-F の酵素合成とグライコシンターゼ反応への利用

10:49　°道善　聡，本多裕司[1]，大沼貴之，北岡本光[2]，深溝　慶（近畿大院農・バイオ，[1]石川県大・生資環，[2]農研機構・食総研）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C10a11　*Ralstonia* sp.A-471 由来 Family GH-23 キチナーゼの触媒中心近傍に位置する酸性アミノ酸残基の役割

11:10　°川本乃理子，上田光宏，中澤昌美，宮武和孝，西村重徳，深田はるみ，玉田太郎[1]，有森貴夫[1]，大沼貴之[2]，深溝　慶[2]（阪府大院・生環科，[1]原子力機構・量子ビーム，[2]近畿大・農）

3C10a12　真菌細胞壁を表層で分解する *Paenibacillus* キチン分解酵素 ChiW の生化学的諸性質

11:21　°杉本郁美，伊藤貴文，日ビ隆雄，鈴木史子，藤井　豊[1]，武藤　明[2]，木元　久（福井県大院・生物資源，[1]福井大・医，[2]福井工大・工）

3C10a13　不溶性キチンを分解する *Paenibacillus* キチン分解酵素 ChiW の触媒領域の立体構造

11:32　°伊藤貴文，日ビ隆雄，杉本郁美，鈴木史子，藤井　豊[1]，武藤　明[2]，木元　久（福井県大院・生物資源，[1]福井大・医，[2]福

井工大・工）

3C10a14　変異型キトサナーゼのキトサン検出への利用

11:43　◦菊地彩美[1]，　齋藤明広[1,2]，　富田真世[1]，　伊福伸介[3]，相馬亜希子[4]，安藤昭一[1]（[1]千葉大院・融合科学，[2]静理工大・理工，[3]鳥取大院・工学，[4]千葉大院・園芸）

3C10a15　*Vibrio* 属細菌の分泌するキチンオリゴ糖デアセチラーゼの精製と諸性質の決定

11:54　◦前原佑哉，上原理絵[1]，坂木祐太[1]，平野貴子[1]，袴田　航[2]，西尾俊幸[2]（日大院生資科・生物資源利用，[1]日大生資科・生命化，[2]日大院生資科・生物資源利用　日大生資科・生命化）

C10 会場　午後の部（13:49〜18:10）

酵素—糖質代謝関連酵素（セルラーゼ）—

p01〜p06 発表者の接続時間④ 13:39〜13:49

3C10p01　酵母におけるプロリン合成の鍵酵素グルタミルキナーゼの機能解析

13:49　◦立橋祐樹，田坂侑美，戒能智宏，高木博史（奈良先端大・バイオ）

3C10p02　*Streptomyces* sp. A5 株のエンドグルカナーゼ遺伝子（*celA*）のクローニングと発現

14:00　◦伊藤史浩，渡邉貴謙[1]，福森文康（東洋大院・生命，[1]東洋大・生命）

3C10p03　*Lumbricus rubellus* 由来エンドグルカナーゼのクローニング

14:11　赤澤真一，◦横山圭佑，五十嵐佑樹，雪　真弘[1]，森川　康[1]，小笠原渉[1]（長岡高専・物質工，[1]長岡技科大・生物系）

3C10p04　ミミズ（*Eisenia foetida*）由来の低温適応性エンド 1,4-*β*-グルカナーゼ遺伝子の発現

14:22　◦上田光宏，伊藤彰紘，中澤昌美，宮武和孝，坂口　実[1]，井上國世[2]（阪府大院・生環科，[1]大薬大・薬，[2]京大院・食生科）

3C10p05　黒穂病菌由来の新規グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー*β*-1,3-グルカナーゼ

14:33　◦中島将博，山下哲郎[1]，竹田　匠（岩手生工研，[1]岩手大・農）

3C10p06　*Pestalotiopsis* sp. AN-7 由来エンドグルカナーゼの pH 及び温度安定性の解析

14:44　◦水野正浩，森川祐介，野﨑功一，天野良彦（信州大院工・物質工）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C10p07　シイタケより精製された新規 GH ファミリー GH128 に属する *β*-1,3-グルカナーゼ

15:05　◦坂本裕一，中出啓子，金野尚武（岩手生工研）

3C10p08　グルコースにより活性化されるユニークなメタゲノム由来 BGL

15:16　◦矢追克郎[1]，城　俊徳[2]，伏信進矢[2]，若木高善[2]，宮崎健太郎[1,3]（[1]産総研生物プロセス，[2]東大院農生科，[3]東大院新領域）

3C10p09　*Trichoderma reesei3* 種 *β*-グルコシダーゼの生理的役割

15:27　◦鈴木尊久，長戸拓也，齋藤勇司，小松光子，落合伸廣，中澤　光，小笠原渉，岡田宏文（長岡技科大・生物）

3C10p10　分裂酵母を用いた *Aspergillus aculeatus* 由来 *β*-glucosidase I 生産系の構築

15:38　禅院　進，岡田和士，◦東田英毅（旭硝子・ASPEX 事業部）

3C10p11　Aspergillus aculeatus 由来 *β*-glucosidase 1 のセロオリゴ糖分解能について

15:49　◦馬場祐太朗，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院・生環科）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C10p12　麹菌 由来 *β*-グルコ シダーゼの配糖体分解活性および発現誘導解析

16:10　◦工藤佳那子，氏家成隆，渡部　昭，新谷尚弘，五味勝也（東北大院農・生物産業創成）

3C10p13　*Aspergillus niger* E-1 株由来の endo-1,4-*β*-xylanase（Xyl III）の精製および特性解析

16:21　◦高橋　結，後藤正幸[1]，小宮輝之[2]，村上周一郎[1]（明治大院農・農化，[1]明治大農・農化，[2]恩賜上野動物園）

3C10p14　*Amorocellulobacter alkalithermophilum* gen. nov., sp. nov. an anaerobic alkalithermophile, cellulolytic-xylanolytic bacterium, newly isolated from soil in brackish area of coconut garden Thailand

16:32　◦AMORNRAT WATTHANALAMLOET，Akihiko Kosugi，Junjarus Sermsathanaswadi[1]，Panida Prawitwong，Lan Deng，Yutaka Mori，Khanok Ratanakhanokchai[1]（JIRCAS，[1]KMUTT）

3C10p15　Glycine and asparagine-rich linker of Xyn11A, major xylanase subunit in the multienzyme complex from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6, has an important role for xylan degradation ability.

16:43　Junjarus Sermsathanaswadi[1,2]，　◦Akihiko Kosugi[2]，Amornrat Watthanalamloet[1,2]，Panida Prawitwong[2]，Lan Deng[2]，Khanok Ratanakhanokchai[1]，Yutaka Mori[2]（[1]KMUTT，[2]JIRCAS）

3C10p16　ヤマトシロアリ後腸共生原生生物由来 GHF26 *β*-マンナナーゼの発現および酵素学的性質の解析

16:54　◦塚越　光[1]，　松井　真[1]，　北本勝ひこ[1]，　守屋繁春[2,3]，有岡　学[1]（[1]東大院・農生科，[2]横浜市立大，[3]理研基幹研）

p17〜p21 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3C10p17　放線菌マンナナーゼの分子構造の違いによる CBM の機能解析

17:15　◦熊谷祐也，臼木博一[1]，川上賀代子，向原隆文，畑中唯史（岡山生物研，[1]学振・特別研究員）

3C10p18　*Trichoderma reesei* 由来 CBHI による結晶性セルロース分解でのトリプトファン 40 残基の重要性

17:26　◦中村彰彦[1]，五十嵐圭日子[1]，古田忠臣[2,3]，Jerry Ståhlberg[4]，Anu Koivula[5]，Merja Penttila[5]，鮫島正浩[1]（[1]東京大農生科・生材科，[2]東工大・バイオセンター，[3]理研，[4]スウェーデン農科大，[5]フィンランド技研）

3C10p19　*Clostridium thermocellum* 由来セルロソームの無細胞合成と試験管内再構成

17:37　◦二瓶　哲，富塚俊平，長谷川裕樹，平野展孝，春木　満（日大・工・生命応用化）

3C10p20　QCM-D による精製セルラーゼの結晶性セルロース分解評価

17:48　◦紙野　圭，安　善榮，堀川祥生[1]，杉山淳司[1]（製品評価機構，[1]京大生圏研）

3C10p21　テングサ残渣の酵素による糖化

17:59　◦齋藤将成，苅田修一（三重大学院・地域イノベ）

J11 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品—生理機能 – その他—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3J11a01　腸管免疫細胞の活性化モニターリングマウスの樹立

9:00　◦安達貴弘（東京医歯大・難研）

3J11a02　腸内共生菌が粘膜系 B 細胞応答に与える影響

9:11　◦相澤竜太郎，細野　朗[1]，鈴木あみ，八村敏志[1]，百瀬愛佳[2]，平山和宏[2]，伊藤喜久治[2]，高橋恭子，高橋宜聖[3]，上野川修一（日大・生資科，[1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]東大院農生 科・獣医，[3]感染研・免疫）

3J11a03　腸内共生菌によるマウス *α*-ディフェンシン遺伝子の発現調節機構

9:22　◦栗原健太，高橋恭子，杉　由高，中野　輿，細野　朗，上野川修一（日大・生資）

3J11a04　腸管関連リンパ組織におけるストローマ細胞の解析

9:33　◦塩河亜弥[1,2]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ）

3J11a05　腸管樹状細胞の TLR を介した免疫調節機構の解析

9:44 ○上滝隆太郎[1,2]，輪島隼一[1,2]，塩河亜弥[1,2]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3J11a06　粘膜組織に存在する IgA 産生促進 $CD3^-IL\text{-}2R^+$ 細胞のユニークな性状

10:05 ○横井勇祐[1,2,3]，高橋宜聖[2]，小川晋平[1,3]，梅田幸子[1]，石井俊祐[4]，山田　潔[1]，戸塚　護[1]，佐藤隆一郎[1]，細野　朗[5]，上野川修一[5]，八村敏志[1,3]（[1]東大院農生科･応生化，[2]感染研･免疫，[3]東大院農生科・食の安全研セ，[4]日大，[5]日大生資科・食品生命）

3J11a07　異なる部位の腸管関連リンパ組織における IgA 産生応答の特徴

10:16 ○鈴木　誠，細野　朗，鈴木あみ，柳橋　努，八村敏志[1]，高橋宜聖[2]，百瀬愛佳[3]，平山和宏[3]，伊藤喜久治[3]，高橋恭子，上野川修一（日大生資科・食科工，[1]東大院農生科食の安全研セ，[2]感染研・免疫，[3]東大院農生科・獣医）

3J11a08　レンチナンの腸管炎症抑制機構：小腸上皮様 Caco-2 細胞の TNFR1 の局在に及ぼす影響について

10:27 ○西谷洋輔，水野雅史[1]（神戸大･自然先端，[1]神戸大院･農）

3J11a09　ノルアドレナリンによるアドレナリン受容体を介したストレス反応へのフラボノイドの影響

10:38 ○山崎隼輔[1]，榊原啓之[1,2]，下位香代子[1,2]（[1]静岡県大・院・生活健康，[2]静岡県大・環境研）

3J11a10　ピーナッツ渋皮抽出物の脳機能改善作用

10:49 ○森　大輔，木村雄輝，古川昭栄[1]，福光秀文[1]（岐阜セラツク，[1]岐阜薬大）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3J11a11　脳延髄縫線核におけるオキシトシン受容体による体温調節能の解析

11:10 ○立石木綿子，佐藤佳亮，笠原好之，水上浩明[1]，西森克彦（東北大・農，[1]自治医大・分子病態治療研究センター）

3J11a12　Mechanism underlying the growth hormone-releasing activity by ornithine

11:21 ○Yee Yin Ho，Takafumi Mizushige，Saori Akiduki[1]，Kousaku Ohinata（Kyoudai, [1]KYOWA HAKKO BIO）

3J11a13　くも膜リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素は δ オピオイドペプチド rubiscolin-6 の経口投与による摂食促進作用を仲介する

11:32 ○金子賢太朗，ラザルスミハエル[1]，宮本知京，大石　陽[1]，永田奈々恵[1]，吉川正明，有竹浩介[1]，裏出良博[1]，大日向耕作（京大院・農・食品生物，[1](財）大阪バイオ研・分子行動生物）

3J11a14　Evaluation of the inhibitory effect of flavonols and catechins on monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria

11:43 ○Yauhen Bandaruk，Toshiyuki Nakamura，Rie Mukai，Junji Terao（Graduate School of Nutrition and Bioscience, the University of Tokushima）

3J11a15　食用菊「もってのほか」成分による PC12 細胞中の MAP キナーゼ活性化作用

11:54 ○仁科淳良，木村博一[1]（米沢，[1]国立感染研）

J11 会場　午後の部（14:00〜17:59）

食品―生理機能 – その他―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3J11p02　LPS 誘発の炎症反応における大麦焼酎粕抽出物の抗炎症効果

14:00 ○小口一起，Giriwono PE，外薗英樹[1]，白川　仁，駒井三千夫（東北大・院農，[1](株)三和酒類）

3J11p03　クマリン類の抗炎症作用における分子機序の類似性とアルキルオキシ基の寄与

14:11 ○川畑球一，奥村真由，宮下美希，杉山友太，高橋正和，大東　肇（福井県大・生物資源）

3J11p04　キンギンカ抽出液の NF-κB 活性化抑制作用

14:22 ○横田紗綾，伊賀和宏（三省製薬）

3J11p05　マクロファージにおけるポリフェノールの抗炎症作用機構の解析

14:33 ○神原哲士，河合慶親，柴田貴広，内田浩二（名大院生命農・応用分子生命科）

3J11p06　スダチ果皮ポリメトキシフラボンの抗炎症作用に関する研究

14:44 ○播田元輝，湯浅恵造，多田かおり，藤本智美，津嘉山正夫，辻　明彦（徳島大・STS 研究部）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3J11p07　黒ウコンに含まれるポリメトキシフラボノイドの抗炎症作用機序の解析

15:05 ○堀籠　悟[1,2]，原田哲平[1]，永井　武[1]，鈴木美そら[1]，三嶋　隆[1]，渡辺章夫[1]，吉田　泉[1]，川本康晴[1]，穏田友子[1]，吉安友二[1]，勝田真一[1]，山口昭弘[1]，渡井正俊[1]，白川　仁[2]，駒井三千夫[2]（[1]日本食品分析セ，[2]東北大院農・生物産業創成・栄養学）

3J11p08　鶏卵卵黄タンパク質およびホスビチンの抗炎症作用

15:16 ○田中翔子，齋藤一成，高部祐允[1]，升本早枝子[1]，石川伸一（宮城大食産業，[1]北里大獣医）

3J11p09　*Bifidobacterium breve* M-16V による離乳期ラット腸炎抑制作用

15:27 ○和泉裕久，峯岸真梨緒，佐藤洋平，清水隆司，関根一則，高瀬光徳（森永乳業・栄科研）

3J11p10　高分子ヒアルロン酸経口摂取のラットにおけるカラギーナン誘発炎症性疼痛に対する作用

15:38 ○栗原　仁，釣木隆弘，木村　守，増田泰伸，浅利　晃[1]（キユーピー，[1]ヒアルロン酸研究所）

3J11p11　腸管上皮細胞の Toll 様受容体刺激を介した免疫調節機能に対するカルノシンの亢進効果

15:49 ○津田悠一，岩本　拓，清水　誠，戸塚　護（東大院農生科・応生化）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3J11p12　発芽ブドウ種子エキスの OVA 感作マウスにおける抗体およびサイトカイン濃度に及ぼす影響

16:10 ○比江森美樹，藤倉路子，鈴木麻希子，村田健二[1]，落合孝次[2]（岡山県大 保福・栄養，[1]カリフォルニア大・デービス，[2]シードライフテック(株)）

3J11p13　Effects of kaempferol on the development and function of regulatory B cells

16:21 ○Chen-Hao Yeh，Hsi-Kai Wang，Hideo Satsu，Makoto Shimizu，Mamoru Totsuka（The University of Tokyo）

3J11p14　TLR シグナリングを制御する植物野菜成分の探索

16:32 柴田貴広，○本多和也，河合慶親，田中浩士[1]，高橋孝志[1]，三宅健介[2]，牛田悠介[3]，相澤宏一[3]，内田浩二（名大院生命農・応用分子生命科，[1]東工大院理工･応化，[2]東大･医科研，[3]カゴメ(株)総研）

3J11p15　Effect of the *Cordyceps millitaris* JLM 0636 Extract on the Induction of Th1 and Th2 Cytokines in Murine Splenocytes

16:43 ○Byoung-Won Kang[1]，Min-Jeong Seo[1,2]，Jeong-Uck Park[1]，Kwang-Hyuk Kim[3]，Yong-Kee Jeong[1,2]（[1]Dong-A University，[2]Dong-A University，[3]Kosin University）

3J11p16　Functional analysis of murine regulatory T cells induced by naringenin derived from citrus fruits

16:54 ○Hsi-Kai Wang，Chen-Hao Yeh，Taku Iwamoto，Hideo Satsu，Makoto Shimizu，Mamoru Totsuka（Dept.Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3J11p17　発酵食品微生物由来環状ジペプチド類と関連化合物の抗酸化活性評価

17:15 ○高津綾香，福田　優，張　　曼，仁戸田照彦，神崎　浩（岡山大院・自然科学）

3J11p18　酵素分解牡蠣ペプチドにおける抗酸化能評価

17:26 ○飯田ちなつ，安達秀子，松本　聡，田丸靜香[1]，田中一成[2]（常盤薬品工業(株)・薬理研究，[1]長崎県大・シーボルト校・栄養健康，[2]長崎県大・院・人間健康科学）

3J11p19　各種抗酸化物のトコフェロール類に対する併用効果の解析

17:37 ○山元涼子，石川洋哉，松本奈実子，受田浩之[1]，山崎　壮[2]，松井利郎[3]（福岡女子大・国際文理，[1]高知大・農，[2]国立衛研，[3]九大院・農）

3J11p20　β-カロテンは廃用性筋萎縮モデルマウスの筋萎縮関連遺伝子発現を抑制する

17:48 ○假家義裕，小川真弘，原田直樹，山地亮一，細谷圭助[1]，中野長久[2]，乾　　博（大阪府大院・生命環境，[1]成美短大，[2]大阪女子短大）

J12 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―生理機能 – 免疫，神経，内分泌―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3J12a01　消化管を介したファイトケミカルの抗酸化・抗炎症作用の解明

9:00 ○田中遼平，入江一浩，村上　明（京大院農・食品生物）

3J12a02　ルテオリンが HepG2 細胞における薬物代謝系第 I, II 相酵素の発現に及ぼす影響

9:11 ○姜　嵩岩，芦田　均（神戸大院・農）

3J12a03　β−クリプトキサンチンが非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスの遺伝子発現に及ぼす効果

9:22 ○小堀真珠子，渡邉菜摘，杉浦　実[1]，太田嗣人[2]（食総研，[1]果樹研，[2]金沢大）

3J12a04　有機ゲルマニウムとビートファイバーの同時摂取による肝臓脂肪低下作用

9:33 齋藤三季，○中村宜司（浅井ゲルマニウム研）

3J12a05　酵素および機械剪断処理野菜摂取によるヒトでの Ca 吸収促進効果

9:44 ○小林明美，園田拓三[1]，角尾進悟，中村純二（花王・生科研，[1]花王・加工プロセス研）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3J12a06　*Lactobacillus* GG 発酵乳による腸管上皮のホメオスタシス調節機能に関する研究

10:05 ○依田一豊，何　　方，宮澤賢司，川瀬　学，久保田晃，平松　優，Fang Yan[1]（タカナシ乳業(株)・商品研究所，[1]Vanderbilt 大・医）

3J12a07　メタボリックシンドローム改善作用をもつ乳酸菌 *Lactobacillus amylovorus* CP1563 株の選抜

10:16 仲村太志，○石田　優，菅原智詞，芦田延久，澤田大輔，多田裕紀子[1]，高橋信之[1]，河田照雄[1]，藤原　茂（カルピス(株)・発酵応用研究所，[1]京大院農・食品生物科学）

3J12a08　乳酸菌 *Lactobacillus amylovorus* CP1563 株の脂質代謝改善作用

10:27 仲村太志，石田　優，○菅原智詞，澤田大輔，多田裕紀子[1]，高橋信之[1]，河田照雄[1]，藤原　茂（カルピス(株)・発酵応用研究所，[1]京大院農・食品生物科学）

3J12a09　発酵食品が腸内細菌の増殖に与える影響

10:38 ○佐藤一昭，蟻川幸彦[1]，松澤恒友[2]，天野良彦[2]（長野県食工協，[1]長野県工技セ，[2]信州大工・物質工）

3J12a10　セサミンとエピセサミンの投与によるマウス肝臓の遺伝子発現変動の比較解析

10:49 ○姚　瑞卿[1]，安岡顕人[2]，檜木智裕[3]，北川義徳[3]，柴田浩志[3]，阿部啓子[1,4]，三坂　巧[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]前工大・生物工，[3]サントリ・健康研，[4]KAST）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3J12a11　HepG2 細胞を用いた非アルコール性脂肪肝モデルに対するラクトフェリンの作用解析

11:10 ○森下　聡，富田景子[1]，小野知二，村越倫明，大寺基靖，杉山圭吉，加藤久典[1]，西野輔翼[2]（ライオン(株)，[1]東大・総括，[2]立命館大）

3J12a12　シジミ抽出液由来オルニチン含有新規トリペプチド `Acorbine' の肝保護効果

11:21 ○内沢秀光，白川和浩[1]，齋藤ゆかり[2]，Chonnipa Nilubol[2]，玉井美保[2]，田川陽一[2]（青森県産業技術セ・工総研，[1]福島商店，[2]東工大院・生命理工）

3J12a13　食肉成分による腸管細胞における神経栄養因子発現制御

11:32 ○藤井　薫，門岡桂史[1]，松本貴之[2]，森松文毅[2]，片倉喜範[3]（九大農・生資環，[1]九大院・生資環，[2]日ハム・中研，[3]九大院・農院）

3J12a14　Wheat gluten hydrolysate induces PYY secretion and suppresses food intake in rats

11:43 ○Wenya Chen, Tohru Hira, Hiroshi Hara（Grad Sch Agr, Hokkaido Univ）

3J12a15　食物繊維摂取時の杯細胞数・ムチン増加作用への腸内細菌の関与

11:54 ○日野真吾，最田裕善，森田達也（静岡大農・応生化）

J12 会場　午後の部（14:00〜17:59）

食品―生理機能 – 免疫，神経，内分泌―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3J12p02　アロエベラゲル抽出物(AVGE)のエタノール誘導性脂肪蓄積予防効果

14:00 ○齊藤万里江, 田中美順, 三澤江里子, 山田宗夫, 樋田知宏, 岩附慧二, 河田照雄[1]（森永乳業(株)　食基研，[1]京大院農・食品生物）

3J12p03　プチヴェールの機能解析

14:11 ○小瀬木一真，都築育己，山田千佳子，和泉秀彦，松田　幹[1]（名古屋学芸大院・栄養科学，[1]名大院・生命農）

3J12p04　褐藻由来フコキサンチンの白色脂肪組織における UCP1 発現誘導機構

14:22 ○小出　愛，松本伊代，別府史章，前多隼人[1]，細川雅史，宮下和夫（北大院・水，[1]弘前大・農）

3J12p05　乳酸菌を用いた新規共役脂肪酸の生産とその生理機能評価

14:33 ○朴　時範[1]，岸野重信[1,2]，菅原達也[3]，平田　孝[3]，横関健三[1]，清水　昌[2,4]，小川　順[2]（[1]京大院農・産業微生物，[2]京大院農・応用生命，[3]京大院農・応用生物，[4]京都学園大・バイオ環境）

3J12p06　がん予防食品因子イソチオシアネート結合タンパク質の探索

14:44 ○三好規之，米持　巧，中村宜督[1]，大島寛史（静県大院・生活健，[1]岡大院・自然科学）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3J12p07　Genistein の成人 T 細胞白血病細胞増殖抑制メカニズムについて

15:05 ○峰　善広，榊原陽一，水光正仁，森下和広[1]，山﨑正夫，西山和夫（宮崎大農 応生科，[1]宮崎大医 腫瘍生化学）

3J12p08　Effect of cordycepin on apoptosis induction in PC3 human prostate cancer cells

15:16 Hye-Hyeon Lee[1], Min-Jeong Kim[1], Min-Jeong Seo[1,2], Byoung-Won Kang[2], Jeong-Uck Park[2], Yung Hyun Choi[3], ○Yong-Kee Jeong[1,2]（[1]Dong-A University, [2]Dong-A University, [3]Dong-Eui University）

3J12p09　サツマイモ葉ポリフェノールによるインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ阻害および増殖抑制作用

15:27 ○石黒浩二，吉元　誠[1]，西藤岳彦[2]（農研機構　北農研，[1]鹿児島女短大，[2]農研機構　動衛研）

3J12p10　ウルソール酸による子宮内膜癌細胞の MAPK in cyclin D1 signaling と SCF E3s への影響
15:38 ○阿知和弓子，　長谷川清志，　長瀬さやか，　宇田川康博（藤田保健衛生大・医）
3J12p11　薬用植物の血管新生におよぼす影響
15:49 ○吉城由美子，柾谷佳奈（石川県大）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3J12p12　沖縄産プロポリス中のプレニルフラボノイドの血管新生抑制活性に関する研究
16:10 ○土屋育未，太田敏郎，牛田素子，国政和宏[1]，吉田真奈美，熊澤茂則（静岡県大院生活健康・食栄，[1]武庫川女大・国際健康研）
3J12p13　レスベラトロール類縁体を豊富に含むメリンジョ種子抽出物は血管新生に関連した内皮細胞機能及び腫瘍血管新生を抑制する
16:21 ○国政和宏[1]，太田敏郎[2]，谷　央子[3]，加藤榮信[4]，江口良二[5]，加治和彦[2]，　池田克己[1]，　森　英樹[1]，　森　真理[1]，　立藤智基[1,3]，家森幸男[1]（[1]武庫川女大，[2]静岡県大，[3](株)山田養蜂場，[4](株)ホソダ SHC，[5]兵庫医大）
3J12p14　新規乳酸菌発酵物 PS-B1 のヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する細胞増殖抑制作用
16:32 ○野嶽勇一，深澤昌史，榊原隆三（長崎国際大薬・生化）
3J12p15　キクイモ塊茎に含まれる抗ガン活性成分に関する研究
16:43 ○竹花駿平，白岩雅和（茨城大・農）
3J12p16　カフェ酸とそのポリフェノール類縁体による DNA トポイソメラーゼ阻害活性とヒトがん細胞増殖への影響
16:54 ○栗山磯子，布施佑樹[1]，西田浩志[1]，小西徹也[1]，吉田弘美，水品善之（神戸学院大栄養・栄養，[1]新潟薬大・応用生命科学）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3J12p17　酵母を用いたシドケ由来の抗癌活性物質エンドパーオキサイドの作用機序
17:15 ○今村優子，汐谷充博，木村賢一[1]，湯川格史，土屋英子（広島大院先端物質・分子生命，[1]岩手大院・農）
3J12p18　メチルチオ酢酸のマウス皮膚二段階発がんモデルにおける抑制作用
17:26 ○武田和哉，中村考志，青井　渉，朴　恩榮，佐藤健司，松尾友明[1]，岡本繁久[1]，重田友明[1]，鈴木信孝[2]，徳田春邦[2]（京府大・生環，[1]鹿大・農，[2]金大・医）
3J12p19　褐藻類アントクメの前立腺肥大抑制作用
17:37 ○山中典子，呉　　静[1]，伏見圭司[1]，西本壮吾，中村健一郎，小山智之，河岸洋和[1]，矢澤一良（東京海洋大院，[1]静大院・創造）
3J12p20　クルクミン誘導体のアリール炭化水素受容体の抑制作用に対する定量的構造活性相関解析
17:48 ○福田　俊，川瀬雅也[1]，水品善之[2]，芦田　均（神戸大院・農，[1]長浜バイオ大・バイオ，[2]神戸学院大・栄養）

J13 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―生理機能 – 消化，循環―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3J13a01　異なる分子量の食品ペプチドがカルシウム感知受容体を介した Cholecystokinin 分泌を誘導する
9:00 ○中島進吾，比良　徹，原　　博（北大院農）
3J13a02　CCK 依存的動脈弛緩ジペプチド Arg-Phe の摂食および消化管運動抑制作用
9:11 ○影林皆美，紺谷徳泰，山田優子，大日向耕作（京都大・農）
3J13a03　プロバイオティクス乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* OLL2716 はマウス胃体部における Hsp70 発現を促進し，NSAIDs による胃損傷発生を抑制する
9:22 ○石田達也，　横山峰彦，　髙林卓也，小山里美，　本目佳子，樋口智子，古賀泰裕[1]，浅見幸夫（株式会社明治研究本部・食機能科学研究所，[1]東海大学・医学部）
3J13a04　*Bifidobacterium bifidum* BF-1 株のヒト胃粘膜への接着性の検討
9:33 ○五味　淳，曽根春恵，狩野光芳，宮崎幸司，野中千秋[1]，渡邉　治[1]，吉岡真樹[1]，大草敏史[2]（ヤクルト中研，[1]ヤクルト本社，[2]東京慈恵会医科大学附属柏病院）
3J13a05　*Lactobacillus pentosus* S-PT84 株によるラットの脂質代謝改善効果
9:44 ○周　涌衛，井上奈穂，都築　毅，池田郁男，前川敏宏[1]，出雲貴幸[1]，井田正幸[1]，中村淳一[1]，北川義徳[1]，柴田浩志[1]（東北大院農・食品化学，[1]サントリーウエルネス）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3J13a06　日常飲酒者の血清 GGT に対する *Lactobacillus brevis* SBC8803 株の影響
10:05 ○脇田義久，清水千賀子[1]，中北保一，金田弘拳[1]，神田　一，瀬川修一，執行達朗，大竹孝明[2]，藤谷幹浩[2]，高後　裕[2]（サッポロビール・価値創造フロンティア研究所，[1]サッポロホールディングス・食品開発 IC，[2]旭川医科大学・内科学講座）
3J13a07　「発表取消」
3J13a08　「発表取消」
3J13a09　「発表取消」
3J13a10　「発表取消」

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3J13a11　かつおだし単回摂取のヒト胃運動および満腹感に対する効果
11:10 ○松永哲郎，種村一識[1]，山崎英恵，津田謹輔[1]，近藤高史（京大院・農・食の未来戦略，[1]京大院・人間環境学）
3J13a12　ウシ後期初乳中の腸細胞増殖に関わる活性成分の検討
11:21 ○Cairang zhuoma[1]，　村西晴香[2]，　- xijir[1]，　稲垣瑞穂[2]，内田健志[3]，　川西　貴[3]，　齋藤正一郎[4]，　矢部富雄[1,2]，　金丸義敬[1,2]（[1]岐阜大院・連農・生資科，[2]岐阜大院・応生・資源生命，[3]小林製薬(株)・中研，[4]岐阜大・応生・獣医）
3J13a13　ナリンゲニンによる大腸バリア機能保護作用と炎症抑制作用は，他のポリフェノール(ケルセチン，クルクミン，ヘスペレチン)よりも強い
11:32 重白みづき，野田咲乃，田辺創一，○鈴木卓弥（広大院・生物圏）
3J13a14　エピガロカテキンガレートは JNK 経路を介して LDL 受容体を活性化する
11:43 ○森　一浩，齋藤裕樹，後藤　剛，長岡　利（岐阜大応生・応用生命）
3J13a15　ラクトスタチンは HNF-3α を介してコレステロール分解系を活性化する
11:54 ○井辰かおる，世古聖士，長岡　利（岐阜大応生・応用生命）

J13 会場　午後の部（14:00〜17:59）

食品―生理機能 – 消化，循環―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3J13p02　シラタマカズラ葉抽出物の抗肥満作用
14:00 ○桃井真理子，中村健一郎，西本壮吾，小山智之，矢澤一良（東京海洋大院）
3J13p03　漢方生薬五倍子の脂質吸収抑制作用
14:11 ○賀　勝捷，中村健一郎，西本壮吾，小山智之，矢澤一良（東京海洋大院）
3J13p04　フラボノイドによるコレステロール腸管吸収阻害機構の解析
14:22 ○猫橋茉莉，荻原琢男[1]，阿部啓子，小林彰子（東大院農生科・応生化，[1]高崎健大・薬）
3J13p05　シイタケフレーバー成分レンチオニンの四塩化炭素誘発肝障害抑制効果
14:33 ○片山倫陽，遠藤麻恵，鈴木大介，赤尾　真，熊谷日登美（日大・生資科・生化）

3J13p06　ホスファチジン酸によるアスピリン潰瘍抑制
14:44　°森戸克弥，木下正文，大本真弓，近藤宏樹[1]，瓜倉真衣[1]，里内　清[1]，田中　保，徳村　彰（徳島大院ヘルスバイオサイエンス，[1]福山大・生命工）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3J13p07　乳酸菌菌体の 2 型糖尿病モデルマウスに対する抗糖尿病作用
15:05　本田佳代子，°本三保子，内田菜穂子，何　　方[1]，橋詰直孝（和洋女大院・総合生活，[1]タカナシ乳業）
3J13p08　Flavan 3-ols のラット循環およびエネルギー代謝に対する影響
15:16　°越阪部奈緒美，プウンサムパンアヌワン，椎葉奈保子，柴田政廣（芝工大　シス理　生命）
3J13p09　高コレステロール食摂取ラットにおける乳酸発酵豆乳の肥満予防効果
15:27　°平畑理映，　小林麻貴[1]，　小野三起子，　江草信太郎[2]，都築公子[2]，福田　滿[1]（武庫川女子大院･食栄，[1]武庫川女子大生環･食栄，[2]マルサンアイ・開発統括部）
3J13p10　Caco-2 培養細胞におけるフィロキノンとメナキノン-4 の膜透過
15:38　°林　藍子，山田恵理，土居幸雄（京女大・食物栄養）
3J13p11　P-糖タンパク質によるスフィンゴ脂質の選択的消化管吸収
15:49　°藤井愛生，酒井祥太，菅原達也，都築　毅[1]，池田郁男[1]，間　和彦[2]，平田　孝（京大院，[1]東北大院，[2]日本製粉(株)）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3J13p12　ヒストンコードを介した糖応答性小腸消化吸収関連遺伝子の転写制御機構
16:10　°井上聖哉，望月和樹，合田敏尚（静岡県大院生活健康・食栄）
3J13p13　栗渋皮ポリフェノールのリパーゼ阻害作用
16:21　°辻田隆広，高久武司（愛媛大・総合科学研究支援）
3J13p14　ユリネ摂取のラット腸内環境への影響
16:32　°岡崎由佳子，福田絵里，知地英征，加藤範久[1]（藤女子大･人間生活，[1]広島大院・生物圏科学）
3J13p15　ごぼう摂取のラット腸内環境への影響
16:43　°井上淳詞，　岡崎由佳子[1]，　大西奈々恵[2]，　佐藤怜子[2]，Vivi Novita Sitanggang[2]，友竹浩之[3]，加藤範久[2]（(株)あじかん，[1]藤女子大・人間生活，[2]広島大院・生物圏科学，[3]飯田女子短大）
3J13p16　ヒト腸上皮様細胞株（Caco-2, C2bbe1 および HT-29）によるラクトフェリンの吸収と放出
16:54　°秋山友香，久原徹哉[1]，新光一郎[1]，大島健司，灘野大太，岩附慧二[1]，松田　幹（名大院生命農・応用分子生命科，[1]森永乳業食基研）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3J13p17　腸管上皮細胞におけるフィトケミカルによるフルクトース吸収活性の制御
17:15　°涼　壮平，権藤祐輔，薩　秀夫，清水　誠（東大院・農生科）
3J13p18　腸管上皮細胞におけるスフィンゴシン 1-リン酸の生理機能解析
17:26　°一本松悠，岩本　拓，清水　誠，薩　秀夫（東大院農生科・応生化）
3J13p19　腸管におけるエクオールによる抗炎症作用の解析
17:37　°岩柳智裕，荻原　春，橘　伸彦[1]，和根崎智[1]，河野光登[1]，清水　誠，薩　秀夫（東大院農生科・応生化，[1]不二製油・フードサイエンス研）
3J13p20　タウリンが TXNIP 転写活性に与える影響の解析
17:48　°権藤祐輔，薩　秀夫，清水　誠（東大院農生科･応生化）

J14 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品化学 – 色素，香料―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3J14a01　D-キシロース-グリシン-β-アラニン系メイラード反応により生成する新奇ピロロピロール化合物の同定
9:00　°横関俊昭，渡辺寛人[1]，早瀬文孝（明治大農・農化，[1]明治大農・生命科）
3J14a02　D-キシロース―6-アミノヘキサン酸系メイラード反応により生成する新奇ピロロピロール化合物の同定
9:11　°谷川誠治，渡辺寛人[1]，早瀬文孝（明治大農・農化，[1]明治大農・生命科）
3J14a03　メイラード反応で生じるフルピペート類ならびにジピロロン類の特徴づけ
9:22　°増崎瑠里子，能見祐理，寺沢なお子[1]，村田容常（お茶大院・ライフサイエンス，[1]金沢大・人間科学）
3J14a04　5 種類の醤油の AEDA 法による香気成分の比較
9:33　°金子　秀，熊沢賢二，西村　修（小川香料　解析研）
3J14a05　食用ホオズキの香気成分分析
9:44　°阿閉周之，櫻井和俊（高砂香料工業(株)　研究開発本部）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3J14a06　発芽玄米酒粕製パンの香気成分
10:05　°小木曽加奈，金子昌二[1]，中澤弥子，吉岡由美，佐藤晶子，岡崎光雄[2]（長野県短大・生活科学，[1]長野県工技センター，[2]岡崎酒造）
3J14a07　固相抽出素子（Magic Chemisorber）によるカレーパウダーの香気成分分析
10:16　°則武智哉，岩本陽二，清水　博，吉屋晴夫（UBE 科学分析センター）
3J14a08　有機ニンジンの香気成分の特徴
10:27　°田中福代，唐澤敏彦，建部雅子（農研機構・中央農研）
3J14a09　石菖葉部の香気成分とその香りの効果
10:38　°竹下善庸，田中彩加，赤壁善彦（山口大･農･生物機能）
3J14a10　カモミール精油成分の分析と生理活性
10:49　°見通真衣，中山博登[1]，杉本圭一郎[1]，栗山磯子，実宝智子[2]，金沢和樹[3]，　佐々木芳恵[4]，　紙透伸治[4]，　菅原二三男，　吉田弘美，水品善之（神戸学院大栄養・栄養，[1]長岡香料・技開研，[2]千里金蘭大・生活科学，[3]神戸大農・生機化，[4]東理大院理工・応生科）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3J14a11　北海道産赤ワインにおける特徴的な香気成分の探索
11:10　°曽　少豊，妙田貴生，戸枝一喜，西澤　信，中川純一，藤森　嶺（東農大生物産業・食香）
3J14a12　NIRS によって計測される唾液腺活動に伴う血流変化に対する鰹節フレーバーの添加効果
11:21　°松本知奈，齋藤佳奈，中村明朗，斉藤　司，南木　昂，伏木　亨[1]，森　憲作[2]（長谷川香料(株)･総合研，[1]京大院・農，[2]東大院・医）
3J14a13　鶏だしの品質に寄与する香気成分の選定
11:32　°高倉友紀子，林　和寛，水島まゆこ，増沢拓也（味の素食品研究所）
3J14a14　ベタレインがマウス悪性黒色腫細胞のメラニン形成に及ぼす影響
11:43　°渡邊智之，堤千香子[1]，香川祐輝，田辺　渚[1]，細野　崇，川上忠夫[2]，関泰一郎，有賀豊彦（日大院･応生科，[1]日大･生命化，[2]株式会社リバー食品）
3J14a15　熟成中の赤ワインの色素重合体の変化
11:54　°藤原　陽，久本雅嗣，鈴木淳平，斉藤史恵，奥田　徹（山梨大・ワイン研）

J14 会場　午後の部（14:00〜17:59）

食品―生理機能 – その他―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3J14p02　桑実中の機能性ポリフェノールの研究
14:00 ○阿部麻里奈，安岡顕人（前橋工科大）

3J14p03　*Lactobacillus plantarum* OLL2712 の脂質代謝改善効果に関する研究
14:11 ○利光孝之，北　純子，池上秀二（株式会社　明治　食機能科学研究所）

3J14p04　トマト種子由来サポニンの含有量と血中コレステロールに及ぼす影響
14:22 ○山中孝雄[1,2]，木下恵美子[1]（[1]キッコーマン　研究開発本部，[2]日本デルモンテ）

3J14p05　マクサ抽出物の破骨細胞形成抑制作用
14:33 ○高山真規子，三和敬明，呉　静[1]，伏見圭司[1]，崔　宰熏[1]，西本壮吾，中村健一郎，小山智之，河岸洋和[1]，矢澤一良（東京海洋大院，[1]静大院・創造）

3J14p06　水環境浄化型植物「ヒシ」の高機能性素材としての可能性
14:44 ○武富和美，安田みどり[1]，日野まど香[1]，宮山　瞳[1]（西九大・短大，[1]西九大・健栄）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3J14p07　in vitro での食品成分によるストロンチウムの吸着特性
15:05 ○八並一寿（玉川大・農）

3J14p08　鶏卵白プロテアーゼ分解物による抗疲労効果
15:16 ○釣木隆弘，渡部耕平，田辺聖子，木村　守，増田泰伸（キユーピー(株)）

3J14p09　食品成分による生体タンパク質品質管理機構の活性化
15:27 ○大西康太，中畑恵利奈，石坂朱里[1]，河合慶親[1]，寺尾純二[1]，木岡紀幸[2]，入江一浩，村上　明（京大院農・食品生物，[1]徳島大院・ヘルスバイオサイエンス，[2]京大院農・応用生命）

3J14p10　短期食餌性亜鉛欠乏がもたらすラットの味嗜好性変化の解析
15:38 ○山本　遼，岡田晋治，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

3J14p11　塩封入人工餌を用いた小型魚類の塩味嗜好性の解析
15:49 ○齊藤健佑，高木陽介，岡田晋治，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3J14p12　フレーバー化合物によるヒト甘味受容体活性化機構の解析
16:10 ○藤原　聡，中北智哉[1]，岡田晋治[1]，齋藤佳奈，南木　昂，阿部啓子[1]，三坂　巧[1]（長谷川香料(株)，[1]東大院農生科・応生化）

3J14p13　シンナムアルデヒド構造類縁体が有するヒト甘味受容体活性調節機構の解析
16:21 ○中北智哉，藤原　聡[1]，赤尾寛子[1]，南木　昂[1]，三坂　巧（東大院農生科・応生化，[1]長谷川香料(株)）

3J14p14　蛍光物質を含有するリガンドを測定可能な客観的甘味評価系の開発
16:32 ○戸田安香，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

3J14p15　甘味受容体におけるアルコール類の相互作用部位の同定
16:43 ○鈴木あゆ，中北智哉，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

3J14p16　味神経における味覚情報コーディング機構の解析
16:54 ○前田尚廣，黒川あずさ，山本くるみ，長井千草，石丸喜朗，應本　真，三坂　巧，松本一朗，阿部啓子（東大院農生科・応生化）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3J14p17　アカゲザル味覚関連遺伝子群の茸状・有郭乳頭味蕾における発現解析
17:15 ○阿部美樹[1]，石丸喜朗[1]，朝倉富子[1]，今井啓雄[2]，阿部啓子[1,3]（[1]東大院農生科・応生化，[2]京大霊長類研，[3]KAST）

3J14p18　メダカ PLC-β2 発現細胞を起点とした経シナプス性トレーサー輸送の経時的解析
17:26 ○家木誉史，岡田晋治，藍原祥子，應本　真，阿部啓子，安岡顕人[1]，三坂　巧（東大院農生科・応生化，[1]前橋工科大・生物工学科）

3J14p19　メダカを用いた新規経シナプス性トレーサー探索系の開発
17:37 ○池永直弥，家木誉史，岡田晋治，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

3J14p20　脳味覚野・体性感覚野における SNAP25 遺伝子発現の離乳マウスにおける経時的変化
17:48 ○伊藤俊輔，川上晋平[1]，應本　真，岡田晋治，藍澤広行，三坂　巧（東大院農生化・応生化，[1]森永製菓(株)・ヘルスケア事業部）

J15 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品化学 – その他―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3J15a01　炭酸水の体温低下抑制作用
9:00 ○沢村信一，岡部利恵，三富敦浩，栗野いづみ，瀧原孝宣，成川真隆[1]，渡辺達夫[1]（(株)伊藤園，[1]静岡県大・食栄）

3J15a02　炭酸飲料嚥下時の舌圧と咽頭部における速度との関係
9:11 ○森髙初恵，高松のぞみ，橘　宏美，北出昌美，沢村信一[1]，瀧原孝宣[1]，栗野いづみ[1]，小野高裕[2]，田峰謙一[2]，堀　一浩[3]（昭和女大・生，[1]伊藤園・中央研，[2]大阪大・歯，[3]新潟大・歯）

3J15a03　シンナムアルデヒドのう蝕原因菌 *Streptococcus mutans* に対する抗菌作用
9:22 ○伊藤央貴，湊健一郎，小原章裕（名城大・農）

3J15a04　ナノサイズ粒子ビタミン E の小腸における吸収機構の解析
9:33 ○室田佳恵子[1,2]，村上陽子[3]，菅田　望[2]，原田聖也[1]，大久保剛[4]，伊佐治知也[4]，河田照雄[3]，寺尾純二[2]，松村康生[5]（[1]近畿大理工・生命科，[2]徳島大院・ヘルスバイオサイエンス，[3]京大院農・食品生物，[4]日油(株)，[5]京大院農・農）

3J15a05　Phytol およびその代謝物が糖・脂質代謝異常に及ぼす影響
9:44 ○安　芝英，後藤　剛，高橋春弥，永井宏幸，金　英一，高橋信之，河田照雄（京大院農・食品生物）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3J15a06　メープルシロップ抽出物が糖尿病モデルマウス肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響
10:05 ○飯田晃太[1]，林ちひろ[1]，渡部由貴[2]，亀井飛鳥[2]，石島智子[1]，阿部啓子[1,2]，中井雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]KAST）

3J15a07　オリーブに含まれるマスリン酸による炎症及び浮腫軽減作用
10:16 ○福光　聡，安本秀幸[1]，間　和彦，落合　潔（日本製粉・中研，[1]東洋オリーブ）

3J15a08　ラットを用いた野菜フラボノイド長期摂取時の適正量の比較検討
10:27 ○八巻幸二，石川祐子，高橋陽子（農研機構・食総研）

3J15a09　NF-κB シグナルはイソチオシアネート誘導アポトーシスを正に制御する
10:38 ○安部奈緒美，村田芳行，中村宜督（岡山大院・自然科学）

3J15a10　デヒドロジンゲロンのアナログによるヒト大腸がん細胞増殖抑制効果
10:49 ○山田恭正，与五沢真吾[1]，Qi Sun[1]，玉木友梨，酒井敏行[1]（同志社女子大・食栄，[1]京都府立医大・分子標的癌予防医学）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3J15a11　*Lactobacillus plantarum* の免疫調節作用に関わる因子の探索
11:10 ○杉浦雅彦，奥津雄太，信田幸大[1]，田中尚人，佐藤英一，保井久子[2]，岡田早苗（東農大応生科・化学，[1]カゴメ(株)，[2]元信州大）

3J15a12　松樹皮抽出物(フラバンジェノール®)の外用による美白

作用の検討

11:21 ○草場宣廷，神谷智康，池口主弥，髙垣欣也，中山樹一郎[1]（(株)東洋新薬，[1]福岡大学・医）

3J15a13　LC/MS/MS 法を用いた 6-gingerol, 6-shogaol の高感度分析，および生姜摂取時の血中濃度の解析

11:32 ○石川茉莉花, 加藤範久, 矢中規之（広島大院･生物圏科学）

3J15a14　ジオスゲニンは，ヒト肝臓培養細胞において LXR の転写活性を阻害し，脂肪蓄積を抑制する

11:43 ○森脇さや香，植村　卓，後藤　剛，武谷圭子[1]，星野彰平[1]，柘植信昭[1]，檳島　誠[2]，高橋信之，河田照雄（京大院農･食品生物，[1]ハウス食品，[2]阪大）

3J15a15　化学成分によるシークワシャー果汁の識別

11:54 ○山本健太，矢羽田歩，佐々木久美，吉田淳子，坂本宏司[1]，小川一紀[2]，太田英明（中村学園大，[1]広島総研･食品工技セ，[2]果樹研）

J15 会場　午後の部（14:00～18:10）

食品―食品化学 – その他―

p02～p06 発表者の接続時間④ 13:50～14:00

3J15p02　エクオールのエストロゲン受容体非依存的な作用を担う遺伝子の同定

14:00 ○山下修矢，蒲池祥子，隅田崇文，阿比留晶子，山田耕路，立花宏文（九大院農院・生機科）

3J15p03　短期間吸水により機能性を高めた大豆の DNA マイクロアレイ解析

14:11 ○田村倫子，金井友子，遠藤祥子，村　清司，荒井綜一[1]（東農大応生科・栄養，[1]東農大・総研）

3J15p04　クルクミンに交差性を有する抗体の作製と解析

14:22 ○柘植雅大，大塚麻美，徐　　龍，日坂真輔，大澤俊彦[1]，能勢充彦（名城大薬，[1]愛知学院大・心身）

3J15p05　脱脂米ぬか由来ジペプチジルペプチダーゼ－ IV 阻害剤の作成

14:33 ○畑中唯史, 井上良計[1], 熊谷祐也, 臼木博一[2], 川上賀代子, 木村昌代, 向原隆文（岡山生物研, [1](株)サタケ, [2]学振･特別研究員）

3J15p06　ヘキサンを用いない製法による米油の機能性成分について

14:44 ○井上良計，熊谷祐也[1]，徳井圭裕[2]，植向直哉[2]，福森　武[2]，畑中唯史[1]（リピッドラボ，[1]岡山生物研，[2](株)サタケ）

p07～p11 発表者の接続時間⑤ 14:55～15:05

3J15p07　高分解能 LC-Orbitrap MS によるトウモロコシ中のかび毒配糖体(マスクドマイコトキシン)のノンターゲットスクリーニング

15:05 ○中川博之，坂本　茂[1]，佐合由紀，久城真代，長嶋　等（農研機構・食総研，[1]サーモフィッシャー）

3J15p08　マヌカ蜂蜜に由来する新規配糖体 Leptosin のケミカルマーカーとしての有用性について

15:16 ○加藤陽二，梅田菜月，前田明日菜，松本大樹，北元憲利，菊崎泰枝[1]（兵庫県立大・環境人間，[1]奈良女子大・生活環境）

3J15p09　南米産食用キノコの生理活性

15:27 山田由華，○湊健一郎[1]，横手将太，原田栄津子[2]，森園智浩[2]，小原章裕[1]（名城大・農，[1]名城大・院，[2]岩出菌研）

3J15p10　NMR によるコーヒーの非破壊分析：スペクトルの帰属，焙煎による成分変化の解明および品種・産地の鑑別への応用

15:38 ○魏　菲菲，降旗一夫，甲田正則，胡　芳宇，宮川拓也，田之倉優（東大院・農生科・応生化）

3J15p11　桂ウリ果実の成分と熟度の関係とその特徴を活かした利用方法の検討

15:49 ○佐々木梓沙，中村考志，朴　恩榮，佐藤健司，城田浩治[1]，末留　昇[1]，重田友明[2]，岡本繁久[2]，松尾友明[2]（京府大・生環，[1]京府農林セ，[2]鹿大・農）

p12～p16 発表者の接続時間⑥ 16:00～16:10

3J15p12　庄内メロンのメタボローム解析

16:10 ○及川　彰[1,2]，阿部香織[2]，渡辺絵理子[3,4]，星　宏良[3]，冨田　勝[2]，曽我朋義[2]（[1]理研 PSC(鶴岡)，[2]慶應大 IAB，[3]機能性ペプチド研究所，[4]山形大・農）

3J15p13　静岡県産クラウンメロンにおけるアミノ酸の分布および抗酸化活性

16:21 ○吉川尚子（静岡理工科大・理工）

3J15p14　鮮度低下に伴う組織変化が冷凍魚肉の氷結晶形態に与える影響

16:32 ○小南友里，渡辺　学，鈴木　徹（海洋大・食品）

3J15p15　リグナンは植物エストロゲンか？

16:43 ○岸田太郎，本永芳恵，梶原秀平，山内佳也，村上　聖，海老原清，山内　聡（愛媛大・農・生資）

3J15p16　Microbiological and proximate analysis of Cambodian traditional fermented fish products

16:54 ○Chuon Mony Roth，Takashi Koyanagi，Mimoe Shiomoto，Tetsuya Sasaki[1]，Toshihide Michihata[1]，Shizuo Nakamura[1]，Toshiki Enomoto（Dept. Food Sci., Ishikawa Pref. Univ., [1]Indus. Res. Inst. Ishikawa）

p17～p21 発表者の接続時間⑦ 17:05～17:15

3J15p17　アルコール処理酵母を用いた"生臭み"低減ワインの開発-(1)

17:15 ○金井圭子，辻　俊一，横山亜紀，田村隆幸[1]，花牟礼研一[1]，佐々木佳菜子[1]，高田良二[1]，吉田　聡（キリンホールディングス・フロンティア技術研，[1]メルシャン・商品開発研）

3J15p18　アルコール処理酵母を用いた"生臭み"低減ワインの開発-(2)

17:26 ○辻　俊一，金井圭子，横山亜紀，田村隆幸[1]，花牟礼研一[1]，佐々木佳菜子[1]，高田良二[1]，吉田　聡（キリンホールディングス・フロンティア技術研，[1]メルシャン・商品開発研）

3J15p19　亜硫酸塩添加がワイン発酵過程における微生物叢変化に与える影響

17:37 ○高橋正之，大田　民，正木和夫，水野昭博，後藤奈美（酒類研）

3J15p20　ワラ納豆のおいしさの化学的解明を目的としたポリスチレンパック納豆との比較分析

17:48 ○稲垣　穣，小杉　悟[1]，三島　隆[2]，小嶋大介（三重大院生資，[1](株)小杉食品，[2]三重大院地域イノベ）

3J15p21　発酵小豆味噌の抗酸化活性

17:59 山下紗季，湊健一郎[1]，井上五郎[2]，野田　廣[2]，○小原章裕[1]（名城大・農，[1]名城大院・農，[2](株)小出物産）

J16 会場　午前の部（9:00～11:43）

食品―食品工学 – 製造工学―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

3J16a01　定速昇温法による麺の吸水挙動に基づく糊化温度の新規測定法

9:00 ○長谷川絢子，小川剛伸，小林　敬，安達修二（京大院･農）

3J16a02　ダイスの材質がパスタの表面形状および吸水挙動に及ぼす影響

9:11 ○吉野将史，小川剛伸[1]，小林　敬[1]，安達修二[1]（京大・農，[1]京大院・農）

3J16a03　パスタの吸水条件が水分分布および食感に及ぼす影響

9:22 ○小川剛伸，小林　敬，安達修二（京大院・農）

3J16a04　Crystal transformation from hydrous sugars to anhydrous sugars with ethanol dehydration

9:33 ○NICOLAS VERHOEVEN，Hidefumi Yoshii[1]（Tottori Univ., [1]Kagawa Univ.）

3J16a05　1-メチルシクロプロペン包接 α-シクロデキストリン包括ポリスチレンエレクトロスピニングファイバーの湿度応答緩和現象

9:44 ○吉井英文，Tze Loon Neoh，藪野あおい，Patricia Menénzed[1]（香川大・農，[1]Public Univ. of Navarre）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

3J16a06　ジュール加熱殺菌処理した液全卵の物性・構造解析

10:05 ◦梅森　賢，中村　卓，星野　貴[1]，滝田裕二[1]，山口祐輝[1]，五十部誠一郎[2]（明治大院農・農化，[1](株)フロンティアエンジニアリング，[2](独)農研機構・食総研）

3J16a07　直流通電処理による腸炎ビブリオ汚染水の殺菌効果

10:16 ◦崎山高明，西村政晃，須磨谷淳，萩原知明（海洋大・海洋科）

3J16a08　短波帯交流瞬間加熱による豆乳中の枯草菌芽胞の失活

10:27 ◦植村邦彦，高橋千栄子，小林　功（食総研）

3J16a09　急速加減圧式抽出技術による新規緑茶の開発

10:38 ◦安田みどり，　中多啓子，　大城あゆみ，　石川洋哉[1]，林　伊久[2]，相浦正文[3]，塚本敏朗[3]（西九大・健栄，[1]福女大・国際文理，[2]福岡工技セ・機電，[3](株)ワコー）

3J16a10　高圧処理によるダイズ GABA 生成の反応工学的解析

10:49 片山拓巳，重松　亨[1]，◦上野茂昭，藤井智幸（東北大院・農，[1]新潟薬大・応生科）

a11〜a13 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3J16a11　高圧熱水処理によるタンパク質の部分分解反応の速度論的解析

11:10 ◦一井洋和，片山拓己，上野茂昭，藤井智幸，岩元　靖[1]（東北大院・農，[1]太子食品）

3J16a12　β-ラクトグロブリンの熱凝集体形成がステンレス鋼表面への付着挙動に及ぼす影響

11:21 ◦金子英基，萩原知明，崎山高明（海洋大）

3J16a13　果汁濃縮凝縮液からの果実フレーバー成分の高品質濃縮

11:32 ◦新村希世美，辰野倫子，ミヒリグナティラカ，小林康弘[1]，宮脇長人（石川県大院・生資環，[1](株)果香）

J16 会場　午後の部（14:00〜18:10）

食品―食品工学 – 製造工学―，―食品工学 – 加工学―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3J16p02　界面前進凍結濃縮におけるエタノール及びスクロース溶液の極限分配係数

14:00 ◦Mihiri Gunathilake，新村希世美，辰野倫子，宮脇長人（石川県大院・生資環）

3J16p03　赤タマネギ添加による玄米の発芽促進効果

14:11 ◦菅原雅通，本間佑介，中村澄子，田村良浩[1]，石崎和彦[1]，松井崇晃[1]，大坪研一（新潟大院・自然，[1]新潟県農総研）

3J16p04　タピオカ澱粉の糊化・老化に対するキサンタンガム添加の影響

14:22 Prawta Chantaro[1,2]，Rungnaphar Pongsawatmanit[2]，◦西成勝好[1]（[1]阪市大院生科・食健康，[2]カセサート大農・農業生産）

3J16p05　餅の消化酵素に対する耐性機構の解明

14:33 ◦佐々木朋子，　鈴木保宏[1]，　岡本和之[2]，　神山かおる（(独)農研機構・食総研，[1](独)農研機構・作物研，[2]茨城農総セ）

3J16p06　米デンプン分解酵素の生米および炊飯中の分布解析

14:44 ◦大倉哲也，露久保美夏[1]，馬橋由佳[1]，香西みどり[1]（食総研，[1]お茶大院・人間文化）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3J16p07　新規アミロライスの胚乳および分離澱粉の構造解析と糊化特性

15:05 ◦阿久澤さゆり，　佐藤かお理，　花城　勲[1]，　伊藤紀美子[2]（東京農大・応用，[1]鹿児島大・農，[2]新潟大院・自然研）

3J16p08　日本晴変異体米の分離澱粉の構造と粘弾性に関する研究

15:16 ◦峰村貴央，池上　亨，藤田直子[1]，阿久澤さゆり（東京農大・応用，[1]秋田県大・生物資源）

3J16p09　米粉パンにおける適正加水量について

15:27 ◦奥西智哉，中村健治[1]，宮本　守[2]，宮下香苗（農研機構・食総研，[1]日清製粉つくば穀物研，[2]日の本穀粉）

3J16p10　赤色パプリカ中, 糖質（グルコース / フラクトース混合）区分の示す製パン性改良効果について

15:38 ◦瀬口正晴，小澤美貴[1]，中村智英子[1]（神戸女子大・家，[1]神戸女子短大）

3J16p11　ミキシング中の小麦粉生地に発生するフリーラジカルの ESR 法による解析

15:49 ◦加地俊紀，松宮健太郎，松宮知子，隈丸　潤[1]，大村雅人[1]，松村康生（京大院農，[1](株)日清製粉グループ本社）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3J16p12　パスタの製造工程および乾燥条件の違いがデンプンに与える影響

16:10 ◦大村雅人，松宮健太郎[1]，林由佳子[1]，松村康生[1]（(株)日清製粉グループ本社，[1]京大院農）

3J16p13　パスタの加工条件(ダイと乾燥温度)による構造と物性への影響

16:21 ◦佐藤　純，檜貝雄哉[1]，中村　卓[1]（明治大院・農，[1]明治大・農）

3J16p14　タンパク質重合と澱粉糊化特性の異なるパスタでの破壊過程の比較

16:32 ◦川田可南子，中村　卓（明治大院・農・農化）

3J16p15　地下澱粉の糊化特性への高湿加熱処理(パスタ乾燥条件)の影響

16:43 ◦小林佳祐，中村　卓（明治大院農・農化）

3J16p16　塩のにがり成分が調理特性へ与える影響について

16:54 ◦黒澤隆紀，築舘亜由美[1]，遠藤由香，郡司花梨，石川匡子（秋田県立大　生物資源，[1]秋田県立大院　生物資源）

p17〜p21 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3J16p17　塩の結晶粒径が調理特性に及ぼす影響

17:15 ◦築舘亜由美，鈴木　晶[1]，菅原弘人[1]，秋山美展[1]，石川匡子[1]（秋田県立大院・生物資源，[1]秋田県立大・生物資源）

3J16p18　GABA と ACE 阻害ペプチドを含む京漬物(糠漬け)

17:26 ◦上野義栄，森　義治[1]，山根吉人[2]，今西貴紀[2]，小田耕平[3]（京都府中小企業技術セ，[1](株)もり，[2](株)本田味噌本店，[3]京工繊大）

3J16p19　味覚センサー，官能検査，アミノ酸分析による新規魚醤群の呈味性評価

17:37 ◦阿部憲太郎，池崎秀和，田中淳也[1]，半明桂子[1]，有富和生[1]，和田律子[2]，宮崎泰幸[2]，原田和樹[2]（インセント，[1]山口県産技セ，[2]水大校・院）

3J16p20　ジュール加熱によって調製した豆乳の性状

17:48 ◦下山田真，板橋由紀，都築公子[1]，江草信太郎[1]，本多芳孝[1]（宮城大・食産，[1]マルサンアイ(株)研）

3J16p21　抗酸化能を発揮するマルトース修飾鶏筋原線維タンパク質のゲル化およびそのゲル特性

17:59 ◦礒野　舞，佐伯宏樹[1]，西村公雄（同志社女大・食栄，[1]北大院・水）

B18 会場　午前の部（9:00〜11:43）

微生物―物質生産 – 発酵(二次代謝産物，抗生物質)―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3B18a01　海洋微生物 *Crypthecodinium* sp. D31 株によるドコサヘキサエン酸を含有するリン脂質の生産

9:00 ◦奥田知生，安藤晃規[1]，櫻谷英治，小川　順（京大院農・応用生命，[1]京大・生理化学）

3B18a02　油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 の *ku80* 遺伝子破壊株の作製

9:11 中谷政人，櫻谷英治，◦菊川寛史，安藤晃規[1]，清水　昌[2]，小川　順（京大院農・応用生命，[1]京大・生理化学ユニット，[2]京都学園大・バイオ環境）

3B18a03　アミノグリコシド系抗生物質ミノサミノマイシン生合成遺伝子クラスターの解析

9:22 ◦春日　和，辻本敏博，桑原直哉，小林正之，上松　仁[1]，五十嵐雅之[2]，小嶋郁夫（秋田県大生資科・応生科，[1]秋田高専，[2]微化研）

3B18a04　*Streptomyces avermitilis* SUKA 株を宿主としたシキミ酸経路由来二次代謝産物の異種生産
9:33　◦小松　護，尾仲宏康[1]，Marvyn J. Bibb[2]，池田治生（北里大・北里生命研，[1]富山県大，[2]John Innes Centre U.K.）

3B18a05　沖縄の自然界からの乳酸菌の単離および乳酸菌代謝産物の機能性の探索
9:44　◦森田この美，柳久美子[1]，比嘉　瞳[2]，金本昭彦[3]，要　　匡[1]，池松真也（沖縄高専・生物資，[1]琉球大・医，[2]第一三共，[3]オーピーバイオファクトリー）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3B18a06　γ-アミノ酪酸資化欠損パン酵母変異株を用いたパン生地発酵
10:05　◦安藤　聡，中村敏英（農研機構・食総研）

3B18a07　*Streptomyces blastmyceticus* 由来(-)-indolactam V 生合成遺伝子の放線菌における発現
10:16　◦奥田治子，谷　修治，炭谷順一，入江一浩[1]，林　英雄，川口剛司（阪府大院・生環科，[1]京大院・農）

3B18a08　Cyclo(Leu-Phe)oxidase 変換反応を受ける糸状菌由来二次代謝産物の検出
10:27　◦高橋佳子，福田　優，仁戸田照彦，神崎　浩（岡山大院・自然科学）

3B18a09　*Pantoea ananatis* 由来の 6 個のカロテノイド生合成遺伝子を発現した大腸菌を用いた新規配糖体カロテノイドの創製
10:38　◦大澤絢子，　伊東桂衣，　内山　愛，　鈴木真衣，Seon-Kang Choi[1]，三沢典彦[2]，新藤一敏（日女大家政・食物，[1]Gangneung BCIT，[2]石川県大・生資研）

3B18a10　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* が生産するカロテノイドの構造決定
10:49　◦野本竜平[1,2]，大澤絢子[3]，新藤一敏[3]，松井美里[1]，泉川美穂[2]，金昭ヨン[1]，高木基樹[2]，新家一男[4]，大西康夫[1]（[1]東大院・農生科，[2]JBIC，[3]日女大家政・食物，[4]AIST）

a11〜a13 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3B18a11　Analysis of gene cluster involved in production of the circular bacteriocin leucocylicin Q by *Leuconostoc mesenteroides TK41401*
11:10　◦FUQIN MU[1]，Yoshimitsu Masuda[1]，Hiroshi Ono[2]，Hiroshi Kitagawa[2]，Haruo Ito[2]，Takeshi Zendo[1]，Jiro Nakayama[1]，Kenji Sonomoto[1,3]（[1]Fac. Agric., Kyushu Univ.，[2]Tokai Pickling Co., Ltd.，[3]Bio-Arc., Kyushu Univ.）

3B18a12　Weissellicins YM の環境応答型生産制御機構の解明
11:21　◦益田時光[1]，善藤威史[1]，PEREZ Rodney[1]，園元謙二[1,2]（[1]九大院・農，[2]九大・バイオアーク）

3B18a13　多成分バクテリオシン enterocins NKR-5-3 の菌体外分泌機構の解明
11:32　◦石橋直樹[1]，姫野康平[1]，益田時光[1]，PEREZ Rodney[1]，善藤威史[1]，WILAIPUN Pongtep[2]，中山二郎[1]，園元謙二[1,3]（[1]九大院・農，[2]カセサート大，[3]九大・バイオアーク）

B18 会場　午後の部（14:00〜17:59）

微生物—構造，オルガネラ，小胞，分泌—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3B18p02　新規タンパク質分泌系である Tat システムを標的とした阻害剤の探索
14:00　◦秋葉敬斉，安藤太助，中江太治[1]，磯貝恵美子，米山　裕（東北大院・農，[1]北里研・抗感染症）

3B18p03　好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株における細胞表層タンパク質の生理学的解析
14:11　◦藤浪　俊，伊藤政博（東洋大　バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター）

3B18p04　枯草菌における脂質代謝と細胞分裂間の新規ネットワーク解析
14:22　◦高田　啓[1]，盛田雅人[1]，田中(福島)早苗[1]，志波　優[2]，松本幸次[3]，吉川博文[1,2]（[1]東京農大・応生科・バイオ，[2]東京農大・ゲノム解析セ，[3]埼玉大・理・分子生物）

3B18p05　枯草菌における plsX 温度感受性変異の抑圧因子 S21 の機能解析
14:33　◦盛田雅人[1]，高田　啓[1]，志波　優[2]，松本幸次[3]，吉川博文[1,2]（[1]東京農大・応生科・バイオ，[2]東京農大・ゲノム解析セ，[3]埼玉大・分子生物）

3B18p06　枯草菌における緊縮応答と脂質合成の関連性解析
14:44　◦清水　翔[1]，高田　啓[1]，志波　優[2]，松本幸次[3]，吉川博文[1,2]（[1]東京農大・応生科・バイオ，[2]東京農大・ゲノム解析セ，[3]埼玉大・理学部・分子生物）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3B18p07　Thermus thermophilus の AEC 超感受性機構の解析
15:05　◦金丸由布子，長谷部文人，富田武郎，葛山智久，西山　真（東京大学・生物工学セ）

3B18p08　ナトリウムイオン添加による低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の エイコサペンタエン酸欠損株の生育回復
15:16　◦朴　貞河，川本　純，江崎信芳，栗原達夫（京大･化研）

3B18p09　低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の細胞分裂に関わる膜タンパク質の機能解析
15:27　◦永久由利絵，青柳美穂，川本　純，江崎信芳，栗原達夫（京大化研）

3B18p10　低温誘導性外膜タンパク質 Omp74 の構造形成における EPA 含有リン脂質の生理機能解析
15:38　◦水谷彩乃，代　先祝，川本　純，佐藤　智[1]，江崎信芳，栗原達夫（京大化研，[1]京大 LTM センター）

3B18p11　低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 のエイコサペンタエン酸含有リン脂質と外膜タンパク質の相互作用解析
15:49　◦杉浦美和，朴　貞河，代　先祝，川本　純，江崎信芳，栗原達夫（京大化研）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3B18p12　アミド型リン脂質を用いた EPA 含有リン脂質の生理機能解析
16:10　◦上野源次郎，佐藤　翔，川本　純，江崎信芳，栗原達夫（京大化研）

3B18p13　高水圧下における好圧性細菌 Shewanella violacea DSS12 株の細胞膜の構造とその安定性におよぼすエイコサペンタエン酸の効果
16:21　◦臼井けい子[1]，開　俊樹[1]，川本　純[2]，栗原達夫[2]，能木裕一[1]，加藤千明[1]，阿部文快[1,2,3]（[1]海洋研究開発機構，[2]京都大学化学研究所，[3]青山学院大学・理工）

3B18p14　ホスファチジルエタノールアミンの細胞内輸送に関する出芽酵母を用いた解析
16:32　◦小林新吾，福田良一，太田明徳（東大院農生科･応生工）

3B18p15　酵母におけるホスファチジルエタノールアミンの動態への Golgi-associated retrograde protein complex の関わり
16:43　◦高城景子，岩本邦彦，小林新吾，堀内裕之，福田良一，太田明徳（東大院農生科・応生工）

3B18p16　分裂酵母のゴルジ体膜で機能するロンボイドプロテアーゼの解析
16:54　東　玲那，渋谷大介，竹川　薫[1]，田淵光昭，◦田中直孝（香川大・農・応用生物，[1]九大院・農・生物機能）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3B18p17　分裂酵母の胞子形成におけるエキソサイトーシス経路の機能解析
17:15　◦今田一姫，寺口絵理香，中村太郎（阪市大院理・生物地球）

3B18p18　選択的オートファジーに関わる *Pichia pastoris* Atg11 の coiled coil ドメイン機能解析
17:26　◦山口聡大，奥　公秀，由里本博也，阪井康能（京都大・

院農・応用生命）

3B18p19　PpAtg18 のリン酸化はペキソファジーにおける膜動態を制御する

17:37　◦田村直輝[1], 奥　公秀[1], 阪井康能[1,2]（[1]京大院農･応用生命, [2]JST・CREST）

3B18p20　脂質滴動態における出芽酵母 Atg8 の新しい機能

17:48　◦前田佑一郎, 奥　公秀, 阪井康能（京大院農･応用生命）

B19 会場　午前の部（9:00〜11:43）

微生物―遺伝子 – 構造，機能―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3B19a01　IncP-7 群プラスミドの接合伝達宿主域を規定する因子の探索

9:00　◦瀬谷学人，井上　慧，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大・院生命科学）

3B19a02　植物病原糸状菌 *Rosellinia necatrix* における自律複製型ベクターを用いた新規実験系の開発

9:11　◦清水健雄，伊藤　伝，兼松聡子（果樹研・リンゴ）

3B19a03　新規大腸菌-ビフィズス菌シャトルベクターの構築

9:22　◦小野寺愛，平山洋佑，阪中幹祥，吹谷　智，片山高嶺[1]，加納康正[2]，横田　篤（北大院農・応生科，[1]石川県大・資源研，[2]京都薬大・遺伝子工）

3B19a04　*Bifidobacterium longum* 105-A における *pyrE* 遺伝子の選択マーカーとしての利用

9:33　◦坂口広大，鈴木　徹（岐阜大院連農）

3B19a05　ビフィズス菌の薬剤耐性マーカーのためのクロラムフェニコールアセチルトランスフ ェラーゼ遺伝子の分子育種

9:44　林　彦亮，賀　建龍[1]，◦鈴木　徹[1]（岐阜大･院･応用生物，[1]岐阜大・院・連農）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3B19a06　*Lactobacillus plantarum* における細胞壁テイコ酸糖修飾遺伝子の解析

10:05　◦磯貝夏海，田中尚人[1]，佐藤英一，岡田早苗（東農大　応生科　化学，[1]東農大　菌株）

3B19a07　水田土壌脱窒細菌 *Azoarcus* sp. KH32C 株のゲノム解析から見出されたポリケチド合成遺伝子の系統解析

10:16　◦西澤智康[1]，藤井大地[1]，多胡香奈子[1,2]，石井　聡[1,3]，大塚重人[1]，大島健志朗[4]，服部正平[4]，妹尾啓史[1]（[1]東大院･農生科，[2]現　農環研，[3]現　北大院工，[4]東大院・新領域）

3B19a08　ポリリン酸蓄積を安定化する復帰変異株の解析

10:27　◦廣田隆一，中井茂人，本村　圭，池田　丈，黒田章夫（広島大院・先端研）

3B19a09　オーラシンアルカロイドに抗菌活性を付与するシトクロム P450

10:38　◦安武義晃，北川　航，西岡大樹[1]，尾崎太郎[2]，西山　真[2]，葛山智久[2]，田村具博（産総研･生物プロセス，[1]北大・農，[2]東大・生物工学セ）

3B19a10　*Ralstonia pickettii* DTP0602 株の 2,4,6-トリクロロフェノール分解酵素遺伝子群の転写制御機構の解明

10:49　◦鳥居英人，矢部博敬[1]，八田　貴[1]，原　啓文[1]，滝澤　昇（岡山理大院工・システム科学，[1]岡山理大工・生体医工）

a11〜a13 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3B19a11　*Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるリグニン由来ビフェニル化合物の脱メチルシステム

11:10　◦鈴木一也，並木仁宏，上村直史，笠井大輔，大塚祐一郎[1]，中村雅哉[1]，片山義博[2]，福田雅夫，政井英司（長岡技科大・生物，[1]森林総研，[2]阡大・生資科）

3B19a12　*Sphingobium* sp. SYK-6 株のフェニルクマラン型リグニン二量体化合物代謝系遺伝子の単離と解析

11:21　◦高橋健司，上村直史，笠井大輔，菱山正二郎[1]，原　啓文[2]，梶田真也[3]，片山義博[4]，福田雅夫，政井英司（長岡技科大・生物，[1]森林総研，[2]岡山理大工･生体，[3]東農工大院･BASE，[4]阡大生資科）

3B19a13　*Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるフェルラ酸分解遺伝子の転写制御機構

11:32　谷　健太，笠井大輔，◦上村直史，梅田周佑，福田雅夫，政井英司（長岡技科大・生物）

B19 会場　午後の部（14:00〜17:48）

微生物―遺伝子 – ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3B19p02　海洋由来のグラム陽性 *Terrabacter* sp. OC11 株が有するカルバゾール分解遺伝子の解析

14:00　◦大場進太郎，　前田臨太郎[1]，　鈴木敏弘[2]，　岩田健一，大森俊雄（芝工大･シ工･生科，[1]芝工大院･工･応化，[2]芝工大院･地域環境システム）

3B19p03　陸生・海洋性細菌のカルバゾール分解系遺伝子構造の解析と比較

14:11　◦千葉翔子，前田臨太郎[1]，鈴木敏弘[2]，岩田健一，大森俊雄（芝工大・シ工・生科，[1]芝工大院・工・応化，[2]芝工大院・地域環境システム）

3B19p04　*Acidithiobacillus ferrooxidans* のチオ硫酸デヒドロゲナーゼの構造と機能

14:22　◦菊本愛生，野上翔平，襟立佳那，金尾忠芳，高田　潤，上村一雄（岡大院・自然）

3B19p05　揮発性酢酸イソアミルの *Escherichia coli* K-12 に対する生育阻害機構の解析

14:33　◦安藤　仁, 西村日向子[1], 本田映子[2], 堀内喜高[2], 倉田淳志, 岸本憲明（近畿大院・農，[1]近畿大・農，[2]近畿大・ライフ研）

3B19p06　酢酸菌におけるピルビン酸代謝系の遺伝子構成と発現制御

14:44　◦桜井健太，新井博之，石井正治，五十嵐泰夫（東大院農生科・応生工）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3B19p07　ソフトバイオマス分解に関わる *Clostridium cellulovorans* 由来セルロソーム構成酵素サブユニットの同定

15:05　◦山本康介[1]，川出雄二郎[1]，田丸　浩[1,2,3]（[1]三重大院･生資，[2]三重大・生命支セ，[3]三重大・新産業創生）

3B19p08　メタゲノム解析手法を用いた新規クオラムセンシングシグナル合成遺伝子の同定と機能解析

15:16　◦奈須野恵理[1,2]，　木村信忠[1]，　藤田雅紀[3]，　鎌形洋一[1]，花田　智[1,2]（[1]産総研・生物プロセス，[2]筑波大院生命環境，[3]熊本大院・先導機構）

3B19p09　芳香族化合物汚染土壌における経時的メタゲノムによって明らかになった土壌微生物の適応反応

15:27　◦加藤広海，森　宙史[1]，豊田　敦[2]，大坪嘉行，丸山史人[3]，堂園亜由美[1]，永田裕二，藤山秋佐夫[4]，黒川　顕[1]，津田雅孝（東北大院生命科，[1]東工大院生命理工，[2]国立遺伝研，[3]医科歯科大院，[4]国立情報研）

3B19p10　培養非依存的手法による土壌からの新規芳香族化合物分解遺伝子の探索

15:38　◦永山浩史，菅原智詞，遠藤　諒，加藤広海，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大・院生命）

3B19p11　フィニッシング用のツール GenoFinisher の開発

15:49　◦大坪嘉行，奥野　周，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命科）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3B19p12　Genedata Selector™ を用いた醸造酵母ゲノムの網羅的統合解析：凝集性関与遺伝子群の特性比較

16:10　Hans-Peter Fischer，Thomas Hartsch，Ludwig Macko，Sebastien Ribrioux，Niko Bausch，下広英樹[1]，◦新城雅子[1]（Genedata AG，[1]Genedata KK）

3B19p13　菌類重複遺伝子およびオルソログ遺伝子間におけるヌクレオソーム位置の比較
16:21　◦西田洋巳（東大院農生科）
3B19p14　強力にトリ羽毛分解を行う好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株のゲノム塩基配列解析とペプチダーゼ / プロテアーゼ遺伝子群の検討
16:32　◦稲田秀平，村田明紀，渡部邦彦（京府大院・生命環境）
3B19p15　Streptomyces rochei 7434AN4 株の線状染色体の塩基配列解析
16:43　◦曹　志生，Yosi NINDITA，片岡憂祐，荒川賢治，田上道平[1]，Akexander LEZHAVA[1]，志 波　優[2]，吉 川 博文[2]，石川　淳[3]，木梨陽康（広島大院・先端研，[1]理研・OSC，[2]東農大・応生科，[3]国立感染研）
3B19p16　次世代シークエンサー SOLiD5500xl の特性を活用したゲノム解析
16:54　◦寺林靖宣，下地真紀子，保目奈子，照屋邦子，小林靖尚，佐藤万仁，照屋盛実[1]，養王田正文[2]，平野　隆（沖縄科技セ，[1]沖縄県工技セ，[2]東京農工大・院工）

p17〜p19 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3B19p17　産業用糸状菌 Aspergillus 属菌のプロテオーム解析
17:15　◦小島海平，　井原美智子，　寺本　寛，　宇田川裕晃，髙木　忍，大箸信一[1]（ノボザイムズ　ジャパン，[1]金沢工大）
3B19p18　麹菌プロテオーム・マイクロアレイデータベースの開発
17:26　◦相良純一，佐野元昭，大箸信一（金沢工大）
3B19p19　異なる栄養条件下における Synechocystis sp. PCC 6803 株のメタボローム，トランスクリプトーム，代謝フラックスの統合解析
17:37　◦吉川勝徳[1,2]，仲嶋　翼[1,2]，小川健一[1,2]，梶畠秀一[1,2]，平沢　敬[1,2]，古澤　力[1,2]，清水　浩[1,2]（[1]阪大院・情報・バイオ情報，[2]CREST・JST）

C20 会場　午前の部（9:00〜11:54）

微生物—物質生産 – 醸造，発酵（一次代謝産物）—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C20a01　リュウキュウアイからの泥藍の製造に関わる微生物の特性
9:00　◦常盤　豊，世嘉良宏斗，市場俊雄（沖縄県工技セ）
3C20a02　好アルカリ性細菌 *Exiguobacterium* sp. による L-乳酸の生産
9:11　◦世嘉良宏斗，常盤　豊，市場俊雄（沖縄県工技セ）
3C20a03　*Cupriavidus necator* による（*R*）-3-ヒドロキシ酪酸の生産
9:22　◦楽　隆生，平賀美穂，常盤　豊[1]，世嘉良宏斗[1]，市場俊雄[1]（甲南化工（株），[1]沖縄県工技セ）
3C20a04　天然藍染め染料スクモの高速発酵生産法の開発
9:33　◦諸麥豪二，李　恩映，新居　修[1]，大森勇人[2]，土居克己[2]，大島敏久[2]（九大院・生資環，[1]新居製藍所，[2]九大院・農）
3C20a05　泡盛酒造所間および醸造過程におけるもろみ中微生物叢の解析
9:44　◦喜舎場拓，平良東紀，塚原正俊[1]，伊藤　進（琉球大・農，[1]株式会社バイオジェット）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C20a06　*Candida sp.SN-18* のグリセロール生成に関わる *glyceroi 3-phosphate ndehydrogenase* の取得と機能解析
10:05　◦水島大貴，石川浩介[1]，小山善幸[1]，荻原　淳，加藤　順[1]，春見隆文（日大院生資科，[1]日大生資科・生化）
3C20a07　培養条件の検討による *Candida* 属酵母からの高グリセロール生産方法の検討
10:16　◦石川浩介，水島大貴[1]，小山善幸[2]，荻原　淳[1]，加藤　順[2]，春見隆文[1]（日大生資科・農化，[1]日大院生資研究科・生資利用，[2]日大生資科・生命化）
3C20a08　プロリン蓄積と一酸化窒素合成の亢進による実用パン酵母の乾燥・冷凍耐性と発酵力の向上
10:27　◦笹野　佑，灰谷　豊[1]，大津厳生，島　　純[1]，高木博史（奈良先端大・バイオ，[1]京大・微生物科学）
3C20a09　Lactobacillus plantarum VL103 pflB2 欠損株によるコハク酸生成
10:38　◦辻　　聡，今井祐斗，Pascal Hols[1]，岡田早苗，佐藤英一（東農大応生科・化学，[1]ルヴァンカトリック大学・生命科学）
3C20a10　醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の aspartate: alanine 交換輸送体 AspT の TM3 変異体を用いた基質認識機構の解析
10:49　◦木村拓哉，鈴木聡美，笹原綾子，七谷　圭[1]，阿部敬悦（東北大・院・農，[1]東北大・院・工）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C20a11　不飽和脂肪酸ハイドロキシル化能の高い乳酸菌の分離と焼酎製造への利用
11:10　◦金子健太郎，進藤　斉，佐藤和夫，高橋康次郎（東農大）
3C20a12　乳酸菌による不飽和脂肪酸のヒドロキシル化に関する研究
11:21　◦鈴木由佳，金内　誠，下山田真，石田光晴（宮城大・食産）
3C20a13　Lactobacillus plantarum VL103 株における phosphoenolpyruvate calboxykinase 高発現による生育向上
11:32　◦大場　彩，辻　　聡，梶野敦史，Pascal Hols[1]，岡田早苗，佐藤英一（東農大応生科・化学，[1]ルヴァンカトリック大学・生命科学）
3C20a14　*Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 株における糖輸送系遺伝子欠損株の代謝解析
11:43　◦塚田崇典，辻　　聡，Pascal Hols[1]，岡田早苗，佐藤英一（東農大応生科・化学，[1]ルヴァンカトリック大学・生命科学）

C20 会場　午後の部（14:00〜17:59）

微生物—代謝 – 代謝調節，発酵生理，メタボローム—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C20p02　キャピラリー電気泳動を用いた 27 種類の濃口醤油のクラスター分析
14:00　大西茂彦，◦松岡博美，浅井貴子，稲津忠雄（香川産技センター）
3C20p03　27 種類の濃口醤油のピログルタミン酸と他の成分の回帰分析
14:11　◦大西茂彦，松岡博美，浅井貴子，稲津忠雄（香川産技センター）
3C20p04　発酵改善のための酵母総合診断システムの開発
14:22　◦善本裕之，榎本賢一，目瀬友一朗，川久保武，櫟　友彦（キリンビール・酒類センター）
3C20p05　糖類以外の栄養源がビール類の発酵性・香味に及ぼす影響について
14:33　◦川久保武，岩崎健太郎，田中美佐，目瀬友一郎，林　伸之，善本裕之（キリンビール・酒類センター）
3C20p06　薬剤による酵母中心代謝制御
14:44　◦松田史生，近藤昭彦[1]（神戸大・自然科学，[1]神戸大・工）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C20p07　放線菌の新規窒素代謝経路の解明
15:05　◦小口　悠，佐々木康幸，小林卓矢，高谷直樹[1]，矢島俊介，池田治生[2]，高野英晃[3]，大澤貫寿，祥雲弘文（東農大応生，[1]筑波大・生命研，[2]北里大・北里生命研，[3]日大生資科・生命セ）
3C20p08　「発表取消」
3C20p09　グリオキシル酸経路が *Acetobacter aceti* の酢酸代謝に与える影響
15:27　◦山崎翔子，桜井健太，新井博之，石井正治，五十嵐泰夫（東大院農生科・応生工）
3C20p10　酢酸菌 Acetobacter pasteurianus SKU1108 の膜結合型アルデヒド脱水素酵素が酢酸発酵に関与する遺伝学的証拠
15:38　児玉知大，◦薬師寿治，松谷峰之介，ティーラグールガンジャナ[1]，

松下一信（山口大・農，[1]カセサート大・理）

3C20p11　Acetobacter pasteurianus の酢酸排出能に対する培養条件及び菌膜多糖の影響

15:49　◦川邉宣彦, Watchara Kanchanarach, 薬師寿治, 足立収生, 松下一信（山口大・農）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C20p12　階層的な代謝応答から理解する大腸菌緊縮応答の代謝メカニズム

16:10　◦斎藤菜摘，中東憲治，増田　豪，曽我朋義，冨田　勝（慶大・先端生命研）

3C20p13　腸内常在菌が大脳皮質メタボロームに与える影響

16:21　◦松本光晴, 木邊量子[1], 大賀拓史[2], 相場勇志[3], 澤木笑美子, 古賀泰裕[3], 辨野義己[1]（協同乳業・技術開発，[1]理研・辨野研，[2]HMT，[3]東海大・医）

3C20p14　*pdhR*欠失変異が大腸菌の糖代謝に与える影響

16:32　◦前田壮矢，紀平知枝，清水久美子，吹谷　智，和田　大，横田　篤（北大院農・応生科）

3C20p15　NADH dehydrogenase II 過剰発現による大腸菌の糖代謝特性の変動

16:43　◦紀平知枝，林由香里，吹谷　智，和田　大，横田　篤（北大院農・応生科）

3C20p16　Corynebacterium glutamicum I2L における高温で誘導されるグルタミン酸生産のメカニズム

16:54　◦丸山拓真，　中野由希子，　Nawarat Nantapong[1], Savitr Trakulualeamsai[2]，　松谷峰之介，　薬師寿治，　松下一信（山口大・農，[1]Suranaree University of Technology，[2]Kasetsart University）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3C20p17　*Corynebacterium glutamicum* のピルビン酸キナーゼ欠失およびクエン酸シンターゼ変異がアミノ酸生産に与える影響

17:15　◦澤田和典，下野雄太，小倉紘太郎，和田　大，横田　篤（北大院農・応生科）

3C20p18　*Corynebacterium glutamicum* のピルビン酸キナーゼ欠失およびアナプレロティック経路変異がアミノ酸生産に与える影響

17:26　◦下野雄太，澤田和典，和田　大，横田　篤（北大院農・応生科）

3C20p19　Prediction of glycolysis pathway of *Lactococcus lactis* using time-series data

17:37　◦Kansuporn SRIYUDTHSAK[1,2], Fumihide SHIRAISHI[3], Masami Yokota HIRAI[1,2]（[1]RIKEN PSC, [2]JST CREST, [3]kyudai）

3C20p20　鉄還元菌 *Shewanella* における代謝活性の電気化学的制御

17:48　◦松田翔一，劉　歓[1]，中西周次[1]，橋本和仁（東大院工，[1]ERATO/JST）

C21 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物—遺伝子 – 発現制御，トランスクリプトーム—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C21a01　枯草菌におけるゲノムワイドな転写開始点解析

9:00　◦松本貴嗣[1]，吉川博文[1,2]（[1]東京農大ゲノムセ，[2]東京農大応生科・バイオ）

3C21a02　ゲノムデザイン学：人工解糖系オペロンの転写・翻訳解析

9:11　◦柘植謙爾，中東憲治，富樫　貴，長谷部雅子，高井　幸，長谷川美紀，　五十嵐康行，　杉山直幸，　石濱　泰，　冨田　勝，板谷光泰（慶應大・先端生命研）

3C21a03　好気性光合成細菌*Roseobacter denitrificans* OCh114 の光合成遺伝子制御因子の機能解析

9:22　◦青山晴菜，木村真人，石井正治，五十嵐泰夫，新井博之（東大院農生科・応生工）

3C21a04　*Vibrio parahaemolyticus* のキチンオリゴ糖デアセチラーゼ遺伝子発現解析

9:33　◦小笠原講平[1], 池上孝紀[1], 神田裕士[1], 平野貴子[2], 袴田　航[1,2], 西尾俊幸[1,2]（[1]甲大院生資科・生物資源利用，[2]甲大生資科・生命化）

3C21a05　土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株の鉄応答転写因子 Fur と過酸化水素応答転写因子 OxyR の各種表現型への関与

9:44　◦木村明音，　湯原悟志，　大坪嘉行，　永田裕二，　津田雅孝（東北大院生命科）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C21a06　枯草菌ファージ *ϕ*29 の複製に関わる RNA 結合蛋白質 gp1 の欠損は RNaseH によって補償される

10:05　◦竹内　有，刀禰高広，牧野　修（上智大・遺伝学）

3C21a07　生育条件の変化に応答した Lpp-ペプチドグリカントランスペプチダーゼ遺伝子の発現調節

10:16　◦青木　将，福本　玲，徳田　元[1]，松山伸一（立教大･理，[1]盛岡大・栄養科学）

3C21a08　枯草菌の緊縮制御による胞子形成誘導機構の解明

10:27　◦東條繁郎，広岡和丈，藤田泰太郎（福山大 生命工）

3C21a09　枯草菌において銅イオンに応答する YcnK および CsoR 制御因子による *ycnKJI* オペロンおよび *ycnL* 遺伝子の発現制御機構の解析

10:38　広岡和丈，◦枝廣貴成，木村晃輔，藤田泰太郎（福山大生命工・生物工）

3C21a10　シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 のシグマ因子 SigF2 による概日時計に依存した転写制御

10:49　小堀奈美[1]，秋元勇輝[1]，田中　寛[1,2]，◦華岡光正[1]（[1]千葉大院・園芸，[2]東工大・資源研）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C21a11　Thermus thermophilus におけるプロリン分解系酵素遺伝子群の発現制御機構に関する研究

11:10　◦志水正敏，岩永直樹，富田武郎，葛山智久，西山　真（東大生物工学セ）

3C21a12　超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* の低温誘導型 RNA ヘリカーゼの系統学的及び遺伝学的解析

11:21　◦長岡英里子[1,2]，島田陽子[1]，福田青朗[3]，今中忠行[3]，藤原伸介[1,2]（[1]関西学院大･理工，[2]関西学院大院･生命環境センター，[3]立命館大・生命科学）

3C21a13　超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の水素・硫化水素発生を調節する転写因子の機能解析

11:32　◦山下敬太[1,2]，秀瀬涼太[1,2]，金井　保[3]，跡見晴幸[3]，今中忠行[4]，藤原伸介[1,2]（[1]関西学院大院・理工，[2]関西学院大院・生命環境セ，[3]京大院・工，[4]立命館大・生命）

3C21a14　超好熱始原菌 Thermococcus kodakarensis の二つの転写開始因子 TK1280 と TK2287 の生理機能解析

11:43　◦秀瀬涼太，牛村友一，高　楽，跡見晴幸[1]，今中忠行[2]，藤原伸介（関学大院・理工・生命科学，[1]京大院・工・合成，[2]立命大院・生命・生物工）

3C21a15　大腸菌における全リボソームタンパク質遺伝子オペロンの発現解析

11:54　◦笹生春菜，梅林　章，石浜　明[1]，前田理久（明治大農・農化，[1]法政大生命・生命）

C21 会場　午後の部（14:00〜17:59）

微生物—遺伝子 – 発現制御，トランスクリプトーム—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C21p02　コリネ型細菌 RNase E/G ファミリー酵素の酢酸代謝における役割

14:00　◦前田智也，和地正明（東工大院生命理工･生物プロセス）

3C21p03　コリネ型細菌のグローバルレギュレーター GlxR の転

写制御システムの解析

14:11 ○豊田晃一，寺本陽彦，乾　将行，湯川英明（RITE）

3C21p04　コリネ型細菌の嫌気硝酸呼吸条件下における SOS 応答の役割

14:22 ○西村　拓，寺本陽彦，乾　将行，湯川英明（RITE）

3C21p05　コリネ型細菌における NAD *de novo* 生合成オペロンの転写制御因子

14:33 ○寺本陽彦，乾　将行，湯川英明（RITE）

3C21p06　Regulation mechanism of L-pantoyl lactone dehydrogenase gene expression by LplR

14:44 ○Dayong Si[1]，Nobuyuki Urano[1,2]，Sakayu Shimizu[1]，Michihiko Kataoka[1,2]（[1]Appl. Life Sci., Agric., Kyoto Univ., [2]Appl. Life Sci., Life & Environ., Osaka Pref. Univ.）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C21p07　乳酸球菌 *Lactococcus lactis* IO-1 株におけるキシロースオペロンの転写調節

15:05 ○上原彰浩，簗瀬弘明，森下英治，東崎　正，善藤威史[1]，千葉櫻拓，門多真理子[2]，園元謙二[1]，吉川博文（東農大・バイオ，[1]九大院・農，[2]武蔵野大・環境）

3C21p08　ウェルシュ菌バイオフィルム形成における Spo0A 及び AbrB の機能解析

15:16 ○尾花　望，野村暢彦，中村幸治（筑波大・生命環境）

3C21p09　大腸菌における GGDEF/EAL ドメインタンパク質の機能解析

15:27 ○塚田海斗[1]，渡部大樹[2]，杉本華幸[1,2]，渡邉剛志[1,2]，鈴木一史[1,2]（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大農・応生化）

3C21p10　大腸菌における GGDEF-EAL ドメインタンパク質 CsrD による small RNA 半減期の調節

15:38 高橋優介[1]，岡山明裕[1]，伊藤　学[1]，杉本華幸[1,2]，渡邉剛志[1,2]，○鈴木一史[1,2]（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大農・応生化）

3C21p11　Post-transcriptional regulation of GcvB, a conserved small RNA regulator of amino acid metabolism

15:49 ○Masatoshi Miyakoshi，Yanjie Chao，Kai Papenfort，Cynthia M. Sharma[1]，Jörg Vogel（IMIB, Uni. Würzburg, [1]ZINF, Uni. Würzburg）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C21p12　*Rhodococcus jostii* RHA1 における PCB 分解遺伝子群の転写に対するカテコールの影響

16:10 ○伊藤　拓，遠藤銀朗[1]，福田雅夫[2]，宮内啓介[1]（東北学院大院・工，[1]東北学院大・工，[2]長岡技大・生物）

3C21p13　各宿主特異的なプラスミド pCAR1 上の分解遺伝子群の発現を調節する因子の解析

16:21 ○岩田　修，松本貴嗣[1]，新谷政己[2]，高妻篤史[3]，山根久和，野尻秀昭（東大生物工学セ，[1]東農大ゲノム解析セ，[2]理研 BRC-JCM，[3]東大先端研）

3C21p14　プラスミドを保持した際の宿主の反応の網羅的検出と異なる宿主での反応の比較

16:32 ○高橋裕里香[1]，新谷政己[1,2]，山根久和[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大生物工学セ，[2]理研 BRC-JCM）

3C21p15　宿主によって異なる転写プロファイルを示すプラスミド上の遺伝子の網羅的検出

16:43 高橋裕里香，新谷政己[1]，山根久和，○野尻秀昭（東大・生物工学セ，[1]理研 BRC-JCM）

3C21p16　ナフタレン分解プラスミド NAH7 の接合伝達関連遺伝子群の single cell レベルでの発現解析

16:54 ○井上　慧，宮崎　亮[1]，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院・生命科，[1]ローザンヌ大学）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3C21p17　*Pseudomonas* に存在する新しい光センシング機構

17:15 ○高野英晃，江淵鉄平，牟田口尚敬，新谷政己[1]，野尻秀昭[1]，上田賢志（日大生資科・生命セ，[1]東大・生物工学セ）

3C21p18　H-NS 様因子を介したプラスミド-宿主染色体間相互作用の解明

17:26 ○鈴木千穂[1]，尹　忠鉄[1,2]，堀田彰一朗[3]，寺田　透[2]，田之倉優[3]，山根久和[1]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大院農生科・アグリバイオ，[3]東大院農生科・応生化）

3C21p19　カルバゾール分解プラスミド pCAR1 にコードされる核様体タンパク質の pCAR1 の安定性への寄与

17:37 ○廣谷龍輔[1]，高瀬誠之[1]，武田俊春[1]，鈴木千穂[1]，尹　忠鉄[1,2]，新谷政己[1,3]，山根久和[1]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大･生物工学セ，[2]東大院･農生科・アグリバイオ，[3]理研 BRC-JCM）

3C21p20　IncP-7 群プラスミド pCAR1 が宿主のバイオフィルム形成に与える影響の解析

17:48 ○李　昇昱，高橋裕里香，大浦　啓[1]，山根久和，野村　暢[1]，野尻秀昭（東大生物工学セ，[1]筑波大院生命環境）

C22 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―物質生産 – 酵素，タンパク質―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C22a01　好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株が生産するケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体の構造解析

9:00 ○片岡真亜知，野村圭史，川崎一則[1]，茂里　康[1]，渡部邦彦（京府大院・生命環境，[1]産総研・健康工学）

3C22a02　Study of the proteolytic Bacillus subtilis strains and their extracellular protease genes

9:11 ○Xujun HAN[1]，Hiroko Nagano[1,2]，Tohru Suzuki[1]，Hirofumi Yashikawa[3,4]，Yuh Shiwa[4]（[1]United.Grad.Sch.Agric. Sci.Gifu Univ, [2]Fac.Edu. Gifu Univ, [3]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [4]Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric）

3C22a03　Detection of a unique fibrinolytic enzyme in *Aeromonas* sp. JH1

9:22 ○Jeong-Uck Park[1]，Min-Jeong Seo[1,2]，Byoung-Won Kang[1]，Yong-Kee Jeong[1,2]（[1]Dong-A University, [2]Dong-A University）

3C22a04　*Aspergillus oryzae* KexA の機能解析

9:33 ○冨田沙耶子，森田寛人，前田　浩，竹内道雄，古崎利紀[1]，石井一夫[1]，有江　力[1]，山形洋平（東農工大院・応生化，[1]東農工大院・農学系ゲノム科学人材育成プログラム）

3C22a05　黄麹菌 serine-type carboxypeptidase の *Aspergillus nidulans* における高分泌化の解析

9:44 ○佐野和紀，森田寛人[1]，前田　浩[1]，山形洋平[1]，竹内道雄[1]（東農工大院・応生化，[1]東農工大院）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C22a06　大腸菌 RNase G の mRNA 切断部位の認識について

10:05 ○伊藤和敬，浜崎孝信，柏森　綾，グエンフンアンティ，和地正明（東工大院生命理工・生物プロセス）

3C22a07　海洋性光合成細菌による short hairpin RNA の菌体外生産と RNA プロセシング

10:16 ○長尾信義，鈴木宏道，梅影　創，沼野利佳[1]，菊池　洋（豊橋技科大･工，[1]豊橋技科大･エレクトロニクス先端融合研究所）

3C22a08　紅色非硫黄性細菌 *Rhodobacter capsulatus*を用いた機能性 RNA 生産法の開発

10:27 ○横田哲朗，藤田能亘，鈴木宏道，長尾信義，梅影　創，菊池　洋（豊橋技科大　環境・生命工学）

3C22a09　細胞性粘菌における新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素 SteelyA の機能解析

10:38 ○成田隆明，森田直樹[1]，齊藤玉緒[2]（上智大院・理工，[1]産総研・生物プロセス，[2]上智大・理工）

3C22a10　ビフィズス菌の Galacto- *N*-biose/lacto-*N*-biose phosphorylase の発現を誘導する糖質源の検討

10:49 ○清原正志，川上真理子，中井博之，西本　完，北岡本光（農研機構・食総研）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C22a11　*Bifidobacterium* のハチミツ構成糖の利用性およびフラクトオリゴ糖分解酵素生産
11:10　°村松　圭, 鎌塚心和子, 小野寺秀一, 上野敬司, 塩見徳夫, 菊地政則（酪農大・食品科学）

3C22a12　リボゾーム工学により育種したサイクロデキストラン合成酵素生産菌の解析
11:21　田中幸徳，舟根和美[1]，保坂　毅[2]，稲岡隆史[1]，°越智幸三（広島工大，[1]農研機構食総研，[2]信州大・若手拠点）

3C22a13　黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のペクチンメチルエステラーゼ A, B に関する研究
11:32　°水谷　治, 柿薗ダララット, 高橋　徹, 山田　修（酒総研）

3C22a14　*N*-アセチルスクロサミンの酵素合成及び諸性質について
11:43　°和田　徹[1]，重網麻依[2]，平野貴子[2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）

3C22a15　*Aspergillus oryzae* 乾燥菌糸を全細胞触媒として用いた *N*-アセチルスクロサミンの連続生産法の検討
11:54　°佐藤　仁[1]，　横地佐江子[2]，　平野貴子[1,2]，　袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）

C22 会場　午後の部（14:00〜17:59）

微生物―物質生産 – 酵素，タンパク質―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C22p02　異なる培養条件での *Ruminococcus albus* F40 のタンパク質の解析
14:00　°笠井美帆，苅田修一（三重大院・地域イノベ）

3C22p03　エンドグルカナーゼ分泌生産型放線菌を用いたセルロースからの有用タンパク質生産
14:11　°河井禎文，野田修平，田中　勉，荻野千秋，近藤昭彦（神戸大・工）

3C22p04　*Bacillus circulans* KA-304 由来 α-1,3-グルカナーゼの基質結合ドメインの解析
14:22　°suyotha wasana，矢野成和，立木　隆，若山　守（立命館大生命・生工）

3C22p05　*Clostridium cellulovorans* が生産するセルロソーム骨格タンパク質 CbpB の機能解析
14:33　°中島大地，永野彰彦，森坂裕信[1]，黒田浩一[1]，植田充美[1]，田丸　浩，三宅英雄（三重大学院生資，[1]京大院農・応用生命）

3C22p06　枯草菌ゲノムベクターシステムを利用したミニセルロソームの構築
14:44　°中山　薫，原　裕一，松岡　聡[1]，吉川博文（東京農大・応生科・バイオ，[1]埼玉大・理・分子生物）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C22p07　セルラーゼ複合体を応用したエチレン生産系の構築
15:05　°神藤定生，伊藤ユキ[1]，松田隆之介[1]，細田晃文[1]，田村廣人[1]（名城大理工，[1]名城大農）

3C22p08　低温倍数化処理によるシイタケ菌体の微結晶セルロース分解力の向上
15:16　°外山英男（南九大）

3C22p09　可溶性炭素源を用いた *Trichoderma reesei* の連続フィード培養による細胞壁分解酵素の生産制御
15:27　°池　正和，田伏美峰，徳安　健（農研機構・食総研）

3C22p10　*Trichoderma* 属のセルラーゼと相乗作用を示す放線菌由来キシラナーゼの遺伝子クローニングと発現
15:38　°吉本結香，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院・生環科）

3C22p11　*Prevotella copri* のキシラナーゼ　Xyn10A の酵素の性質および発現解析
15:49　°田中芳貴，田中裕興，對馬裕誠，林　秀謙（前工大･工）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C22p12　*Agrobacterium tumefaciens* 由来キヌクリジノン還元酵素の高活性に関する構造基盤
16:10　°侯　峰[1]，　宮川拓也[1]，　片岡道彦[2,3]，　熊代祥子[3]，竹下大二郎[1]，永田宏次[1]，清水　昌[3,4]，田之倉優[1]（[1]東大院･農生科，[2]阪府大院・生命環境，[3]京大院・農，[4]京都学園大・バイオ環境）

3C22p13　好熱菌 Geobacillus kaustophilus 由来 L-グルタミン酸合成酵素が持つ新規色素依存性 L-グルタミン酸脱水素活性の機能解析
16:21　°黒木俊行，松川博昭[1]，大森勇門[1]，若松泰介[1]，土居克実[1]，大島敏久[1]（九大院・生資環，[1]九大院・農）

3C22p14　糸状菌 *Ascochyta viciae* G-21 由来クロロペルオキシダーゼの単離・精製
16:32　°新藤正人, 司馬　肇, 細野邦昭（日本大学･生物資源科学）

3C22p15　組換え出芽酵母高密度懸濁液による難生産性ラッカーゼの効率的生産
16:43　齋藤雄太，木全浩一，山口真也[1]，山根恒夫[2]，矢野　明[3]，伊藤圭祐，°河原崎泰昌（静岡県大食栄，[1]静岡県大院生活健康・食栄，[2]中部大応用生物，[3]岩手生工研セ）

3C22p16　ゲノム情報を利用した多様な細菌由来のハロアルカンデハロゲナーゼの解析
16:54　°田中裕興, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝（東北大院生命科）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3C22p17　ヒラタケにおける香気成分 1-オクテン-3-オールの生合成とリポキシゲナーゼの発現
17:15　°田崎裕二，佐藤亮二，佐藤　直，城斗志夫[1]（長岡高専･物質工，[1]新潟大・農）

3C22p18　中度好塩菌 *Halomonas* sp. 593 由来好塩性アルカリフォスファターゼのクローニング・発現・精製と Na イオンによる活性化
17:26　°石橋松二郎，小田一輝，荒川　力[1]，徳永正雄（鹿大･農，[1]Alliance Protein Lab.）

3C22p19　*Thermoactinomyces* sp. T7-1 株由来ポリ乳酸分解酵素の性質
17:37　°藤森健夫，原　兆子，徳山真治（静岡大・農）

3C22p20　*Lactobacillus salivarius* AC21 の 2 分子ペプチドバクテリオシン salivacin K21 の異種発現
17:48　飯干翔子，°外村彩夏[1]，元村あかね，Nitisinprasert Sunee[2]，善藤威史[3]，中山二郎[3]，園元謙二[3]，松崎弘美（熊本県大･環境共生，[1]熊本県大院・環境共生，[2]カセサート大，[3]九大院・農）

C23 会場　午前の部（9:00〜11:54）

微生物―物質生産 – 微生物変換，微生物酵素反応―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C23a01　4-アミノピリジンの分解に関わる微生物群集の組成と分解経路の推定
9:00　°竹中慎治，野村亮介，吉田健一（神戸大院・農）

3C23a02　Chryseobacterium sp. 5-3B 由来 N-アセチルトランスフェラーゼの特性解析
9:11　°吉田健二，竹中慎治，吉田健一（神戸大院・農）

3C23a03　*Rhodococcus jostii* RHA1 株における β ケトアジピン酸経路の新規バイパス経路の解析
9:22　°山梨智也，原　啓文[1]，鮒　信学（静岡県大院生活健康・食栄，[1]岡山理大院工・生体医工）

3C23a04　微生物代謝を用いたリグニン由来低分子化合物からのβ―ケトアジピン酸(KA)の生産
9:33　°西村　圭，笠井大輔[1]，政井英司[1]，福田雅夫[1]，大塚祐一郎[2]，中村雅哉[2]，佐藤かんな，梶田真也，片山義博[3]（東農工大院・BASE，[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研，[3]日大・生物資）

3C23a05　有機溶媒耐性細菌 *Pseudomonas putida* T-57 株によるカテコール化合物の生産

9:44 渥美貴大，°田島誉久，片岡尚也，工藤大蔵，中島田豊，加藤純一（広島大院先端物質・分子生命）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C23a06 光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* におけるコリスミ酸リアーゼ遺伝子の同定と解析
10:05 °氏原哲朗，三宅浩一郎（協和発酵バイオ）

3C23a07 大腸菌休止菌体を用いた catechol からの reticuline 生産
10:16 °松田元規，山本恵子，中川　明，松村栄太郎，南　博道，片山高嶺，佐藤文彦[1]，熊谷英彦，山本憲二（石川県大・資源研，[1]京大院・生命）

3C23a08 糸状菌 *Aspergillus niger* における oxaloacetate hydrolase 遺伝子の高発現による高収率シュウ酸生産
10:27 °小林慶一，本田裕樹，服部貴澄，桐村光太郎（早大理工・応化）

3C23a09 *Pseudomonas* sp. WU-0701 由来アコニット酸イソメラーゼの酵素的諸性質の検討と遺伝子クローニング
10:38 °米原広海，本田裕樹，服部貴澄，桐村光太郎（早大理工・応化）

3C23a10 油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 由来アシル CoA 合成酵素遺伝子の過剰発現による脂質生産性向上
10:49 櫻谷英治，°浅岡卓也，安藤晃規[1]，落合美佐[2]，小川　順（京大院農・応用生命，[1]京大・生理化学ユニット，[2]サントリー HD）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C23a11 乳酸菌における不飽和脂肪酸の飽和化反応に関わる鍵酵素の発見
11:10 °岸野重信[1,2]，横関健三[2]，清水　昌[1,3]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物，[3]京都学園大・バイオ環境）

3C23a12 非天然カロテノイド経路における不飽和化酵素の進化分子工学
11:21 °古林真衣子，李　　伶，高市真一[1]，斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化，[1]日本医科大・生物）

3C23a13 基質消費活性スクリーニングを用いたゲラニオール合成酵素の進化工学
11:32 °岩嵜美希，梶原　順，生悦住茉友，古林真衣子，斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

3C23a14 生体触媒として微生物を用いた xanthohumol の変換
11:43 °宮澤三雄，鹿島悠生（近畿大・理工）

C23 会場　午後の部（14:00〜17:48）

微生物―物質生産 – 微生物変換，微生物酵素反応―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C23p02 ピペリジン誘導体の立体異性体生産に有用なカルボニル還元酵素の探索及び立体選択性の評価
14:00 日比　慎，°脇田祐太[1]，野田哲治[2]，佐々木美江[2]，詫摩勇樹[2]，横関健三，清水　昌[1]，小川　順[1]（京大院農・産業微生物，[1]京大院農・応用生命，[2]有機合成薬品工業(株)）

3C23p03 不斉還元による含フッ素光学活性アルコールの生産
14:11 °三橋和也，林　素子，松山彰収（ダイセル・グリーンプロダクト開発センター）

3C23p04 *Ralstonia eutropha* H16 株由来可溶型 NAD^+ 還元型ヒドロゲナーゼを用いた *Escherichia coli* 内共役系構築
14:22 °加藤聖樹，二俣　翔，新井博之，石井正治，五十嵐泰夫（東大院農生科・応生工）

3C23p05 メタゲノムを用いた酸化還元酵素遺伝子の探索とその応用
14:33 °礒谷健太郎，石母田剛，加藤真輝，黒川純司，牧野祥嗣，伊藤伸哉（富山県大・工・生工）

3C23p06 フェニルアセトアルデヒド還元酵素(PAR)相同遺伝子のメタゲノムスクリーニングとその解析
14:44 °伊藤伸哉，礒谷健太郎，竹内奈美，牧野祥嗣，大段友美，黒川純司（富山県大・工・生物工）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C23p07 白色腐朽菌 *Hericium coralloides* 由来ラッカーゼの諸性質と遺伝子クローニング
15:05 °高木伸也，三木亜沙美，黒川純司，伊藤伸哉（富山県大・工・生物工）

3C23p08 ラッカーゼが触媒する不飽和脂肪酸の炭素-炭素結合開裂反応によるジカルボン酸生産
15:16 °竹内道樹[1]，岸野重信[1,2]，日比　慎[2]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物）

3C23p09 放線菌 Streptomyces griseus 由来シトクローム P450 の網羅的機能解析
15:27 °牧野拓也，大野翔登，音松俊彦[1]，原田尚志[1]，三沢典彦[2]，大西康夫（東大院農生科・応生工，[1]神戸天然物化学，[2]石川県大生資研）

3C23p10 紅藻オゴノリ由来シクロオキシゲナーゼ(*COX*)遺伝子の単離と組換え大腸菌によるプロスタグランジンの生産
15:38 °金本浩介，竹村美保，大山莞爾（石川県立大・生物資源研）

3C23p11 酵素法による光学活性 3-ヒドロキシアスパラギン酸異性体の調製
15:49 °武田由希，田中　修，横田　篤，和田　大（北大院農・応生科）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C23p12 *Bacillus thuringiensis* 2e2 株由来 Fe(II)/α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼによる光学活性スルフォキシド生産
16:10 °日比　慎，清水　昌[1]，横関健三，小川　順[1]（京大院農・産業微生物，[1]京大院農・応用生命）

3C23p13 アミノ基修飾酵素と水酸化酵素を共役させた β-ヒドロキシアミノ酸生産系の開発
16:21 日比　慎，°笠原拓也[1]，河嶋隆志[1]，清水　昌[1]，横関健三，小川　順[1]（京大院農・産業微生物，[1]京大院農・応用生命）

3C23p14 コリネ型細菌を用いたプトレシンの生産
16:32 °岡井直子，畑田一樹[1]，高橋千尋[1]，荻野千秋[1]，近藤昭彦[1]（神戸大・自・研究環，[1]神戸大院・工）

3C23p15 生もと由来 *Lactobacillus sakei* のグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子導入 *Corynebacterium glutamicum* を用いる D-グルタミン酸生産
16:43 °矢野正博，老川典夫（関大・化学生命工）

3C23p16 グルタチオンを高生産する大腸菌株の作成および直接醗酵法の開発
16:54 °関田　葵[1]，大西晶子[2]，佐藤郁恵[1,2]，佐藤優理[3]，井塚俊介[2]，梶本陽子[2]，福井啓太[4]，鈴木秀之[1]（[1]京工繊大院・工科・応生，[2]京大院・生命科学・統生，[3]京工繊大・工科・先端，[4]京大院・農学・応生）

p17〜p19 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3C23p17 リボソーム蛋白質 L10 をアダプターとする ClpP 型プロテアーゼによるリジン脱炭酸酵素の分解
17:15 °沼子仁志，李　耀召，金子　淳[1]，高塚由美子，神尾好是（山形大院・理工，[1]東北大院・農）

3C23p18 オカラからの機能性食品素材の開発
17:26 °浜中大夢，小山和貴，綱　達也，尾関健二，大箸信一，川嶋正男[1]，斉藤道夫[1]，藤原英二[1]，武　春美[2]，中村静夫[2]（金沢工大・ゲノム研，[1]羽二重豆腐，[2]石川県工試）

3C23p19 有機溶媒耐性が向上したニトリラーゼ変異体の構造特性
17:37 °吉田豊和，大原祐樹，満倉浩一，長澤　透（岐阜大･工）

C24 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物—細胞 – 情報伝達，細胞応答，ストレス—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C24a01　分裂酵母の胞子発芽の分子メカニズムの解析
9:00 ◦東谷未来，今田一姫，中村太郎（大阪市立大･院理･生物地球）
3C24a02　分裂酵母の低浸透圧ショック応答に必要な機械受容チャネル
9:11 ◦中山義敬，飯田秀利（東学芸大・教育・生命科学）
3C24a03　分裂酵母プロテインキナーゼ A の新規機能の確立
9:22 山家雅之，川向　誠，◦松尾安浩（島根大･生物資源･生命工）
3C24a04　メタノール資化性酵母 Msn5p はホルムアルデヒド耐性機構に関与する
9:33 ◦ZHAI Zhenyu, 由里本博也, 阪井康能（京大院農･応用生命）
3C24a05　リボソームの不完全性は大腸菌に塩耐性をもたらす
9:44 ◦樽澤武房，長谷要一，武藤あきら，姫野俵太（弘前大農学生命・応用生）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C24a06　抗菌剤処理で生じるスーパーオキシドストレスの細菌細胞死滅への影響
10:05 ◦中田訓浩[1]，富田安哉子[2]，松村吉信[1,2]（[1]関西大・ORDIST，[2]関西大・化学生命工）
3C24a07　コネクター分子 SafA を介した大腸菌二成分制御系 PhoQ/PhoP の活性化分子機構の解明
10:16 ◦石井英治，江口陽子，内海龍太郎（近畿大･院･農･バイオ）
3C24a08　大腸菌鉄(Fe3+)応答性二成分制御系 BasS/BasR に対する新規調節因子 YibN の機能解析
10:27 ◦植田健陽，石井英治，江口陽子，仲宗根薫[1]，内海龍太郎（近大院・農・バイオ，[1]近畿大・工・生化工）
3C24a09　大腸菌二成分制御系 EvgS/EvgA 系のセンサー EvgS におけるシグナル認識領域の解析
10:38 ◦江口陽子，村上絵津，内海龍太郎（近畿大農・バイオ）
3C24a10　イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* における植物毒素トロポロンの生産制御に関する二成分制御系遺伝子の解析
10:49 ◦紀平絵梨，岡本　尚，仲宗根薫[1]，関根光雄[2]，藤田信之[2]，波多野和樹[3]，五十嵐雅之[3]，内海龍太郎（近畿大院農・バイオ，[1]近畿大工・生化工，[2]NITE，[3]微化研）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C24a11　リポポリサッカライド修飾と二成分糸御系の活性化状態を繋ぐ small gene
11:10 ◦加藤明宣，Groisman Eduardo（近畿大院・農）
3C24a12　枯草菌二成分制御系多重破壊株の構築と解析
11:21 ◦美浦裕介，加藤孝弘，高田　啓，朝井　計[1]，吉川博文（東京農大・応生科・バイオ，[1]埼玉大・理工学・分子生物）
3C24a13　枯草菌のシグマ因子 SigI による細胞壁溶解酵素遺伝子群の転写調節機構
11:32 ◦朝井　計，市島睦生，中風呂裕樹，関口順一[1]（埼玉大院･理工，[1]信州大・繊維）
3C24a14　枯草菌における転写開始点に依存した新規熱ショック応答機構の解析
11:43 ◦佐藤　絢，小林郷菜，小川陸雄，渡辺　智，千葉櫻拓，吉川博文（東京農大応生科・バイオ）
3C24a15　耐熱性酵母の高温下における細胞応答と発酵特性
11:54 ◦古田雅一，荒井尊裕，松永祐一，石川悦子，小池佳都子，Leelavatcharamas Vichai[1]，岸田正夫[2]（阪府大院・理，[1]Khon Kaen Univ，[2]阪府大院・生環）

C24 会場　午後の部（13:49〜18:10）

微生物—細胞 – 情報伝達，細胞応答，ストレス—

p01〜p06 発表者の接続時間④ 13:39〜13:49

3C24p01　酵母における一酸化窒素の下流経路の解析
13:49 ◦真砂裕紀，西村　明，高木博史（奈良先端大・バイオ）
3C24p02　サルモネラ RcsC/RcsD/RcsB 系の活性化に関わるコネクター様因子 RcsG の単離と解析
14:00 ◦萩原　慧，加藤明宣，内海龍太郎（近畿大院・農）
3C24p03　絶対嫌気性菌の O_2 存在下における生育と H_2O_2 の影響
14:11 ◦山本聖也，鈴木一平，熊井康人，小野寺央，上條真紀子，新村洋一，川崎信治（東農大応生科・バイオ）
3C24p04　嫌気性菌ビフィズス菌の生育に及ぼす環境要素
14:22 ◦熊谷茉生子，小島裕貴，伊集院奨，田中邦房，新村洋一，川崎信治（東農大応生科・バイオ）
3C24p05　トランス型脂肪酸高利用性プロバイオティクスの探索とその特性解析
14:33 ◦有友亮太，鈴木将憲，川井　泰，北澤春樹，齋藤忠夫（東北大院・農）
3C24p06　乳酸菌のコール酸耐性への Resveratrol の効果，及びサーチュインホモログの解析
14:44 ◦新　穂高，藤村朱喜，田中尚人[1]，岡田早苗[1]，中川純一（東農大院　食科，[1]東農大　菌株保存室）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C24p07　*Lactobacillus gasseri* JCM1131^T のリポテイコ酸：胆汁酸適応への関与
15:05 ◦白石　宗，冨田　理[1]，田中尚人[2]，吹谷　智，森田直樹[3]，横田伸一[4]，岡田早苗[2]，横田　篤（北大院農・応生科，[1]NIZO food research，[2]東農大･応生科，[3]産総研･生物プロセス，[4]札医大医･微生物）
3C24p08　過酷な環境に生息する藻類の探索と環境ストレス応答
15:16 ◦水口佳祐，佐藤　大，二ノ宮千夏，甫木隼貴，高橋妙華，川崎信治（東農大応生科・バイオ）
3C24p09　過酷な環境から単離された藻類の環境ストレス耐性機構
15:27 ◦佐藤　大，水口佳祐，甫木隼貴，二ノ宮千夏，三島　直，新村洋一，川崎信治（東農大応生科・バイオ）
3C24p10　高圧力に耐える深海微生物のべん毛運動
15:38 ◦仲宗根薫，山野由美子，加藤千明[1]，西山雅祥[2]（近畿大･院・システム工学，[1]海洋機構，[2]京都大・院・理）
3C24p11　酢酸菌 *Tanticharoenia sakaeratensis* の有する高濃度グルコース耐性に対するゲノム解析
15:49 ◦波多野裕美，平川英樹[1]，松下一信[2]，武部　聡，東　慶直（近畿大院・生物工，[1]かずさ DNA 研，[2]山口大・農）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C24p12　超好熱始原菌のリボソーム画分に存在する高温依存的なタンパク質の解析
16:10 ◦青木　俊[1,2]，大西優介[1,2]，秀瀬涼太[2]，細川桂一[3]，跡見晴幸[4]，今中忠行[5]，藤原伸介[1,2]（[1]関学大院・理工・生命科学，[2]関学大院・理工・生命環境科学研セ，[3]関学大院・理工・化学，[4]京大院工・合成生化，[5]立命館大・生命科学・生物工学）
3C24p13　シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 のバイオフィルム形成に関与するポリアミン合成酵素系の検討
16:21 ◦七谷　圭，佐伯千香，冨永　昂，東　恭平[1]，五十嵐一衛[1]，古川壮一[2]，森永　康[2]，赤井政郎，魚住信之（東北大・院工，[1]千葉大・院薬，[2]日本大・生資科）
3C24p14　シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 の増殖機構
16:32 ◦渡辺　智，黒田　恵，大林龍胆，兼崎　友[1]，千葉櫻拓，吉川博文（東京農大･応生科･バイオ，[1]東京農大･ゲノム解析セ）
3C24p15　シアノバクテリアにおける分子シャペロン dnaK2 のストレス応答機構の解明

16:43 ○小林一幾，佐藤真純，渡辺　智，千葉櫻拓，吉川博文（東京農大・バイオ）

3C24p16　*Staphylococcus aureus*の産生する *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing 阻害物質の同定と阻害効果

16:54 ○皆川　周，新野啓介，山田裕美，老川　綾，藤井健二[1]，加藤文紀[2]，鹿山鎭男[2]，奥田　潤，北山　隆[1]，菅井基行[2]，後藤直正（京都薬大・微生物・感染制御学，[1]近畿大院・農・バイオ，[2]広島大院・医歯薬・細菌）

p17〜p21 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3C24p17　An antisense RNA that affects *Rhodopseudomonas palustris* quorum sensing-signal receptor activity

17:15 ○Hidetada Hirakawa，Amy L. Schaefer，Caroline S. Harwood，E. P. Greenberg（Department of Microbiology University of Washington）

3C24p18　The Role of Proteasome Phosphorylation in Mycobacterium tuberculosis

17:26 ○Choong-Min Kang，Jaeil Han，Tripti Anandan，Heather Baun，Imjoo Jang，Min-Seon Kim，Seeta Nyayapathy，Scott Fair（Wayne State University）

3C24p19　腸炎ビブリオのトキシン / アンチトキシンシステムの生化学的性質

17:37 ○日野まど香，高木久徳[1]，角田佳充[1]，木村　誠[1]（西九大・健，[1]九大院・農）

3C24p20　STM 法で同定した土壌細菌 Burkholderia multivorans ATCC 17616 株の土壌環境下での生残に重要な遺伝子の解析

17:48 ○石橋蓉子，千本木淳子，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命科）

3C24p21　超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 が低栄養生育時に発現するシャペロンシステム

17:59 ○毛戸香織，吉田信行，高木博史（奈良先端大・バイオ）

C25 会場　午前の部（9:00〜11:54）

微生物―細胞 – 分離，分類，生態―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C25a01　環境中より分離した酵母からの *S. cerevisiae* の効率的二次スクリーニング法の開発

9:00 ○藤原秀彦，浅田貴美子，古川謙介，梶原康博[1]，高下秀春[1]（別府大学・食物栄養，[1]三和酒類(株)）

3C25a02　PCR-DGGE によるナチュラルチーズ細菌叢解析における培養依存的および非依存的手法の比較

9:11 ○守重美香，古座野智弘，栃原孝志，三浦豊史，山下昭芳，竹田保之（酪農大・食科）

3C25a03　PCR-DGGE を用いたかつお節かびの同定とその変遷解析

9:22 ○小山　大，竹中慎治[1]，土居幹治（マルトモ(株)，[1]神戸大院・農）

3C25a04　ブナの森から分離した野生酵母と食品製造への利用

9:33 ○蟻川幸彦，米持昭太郎[1]，水谷智洋，中澤久美子（長野県工技セ，[1]米持製菓）

3C25a05　雪室保存の野沢菜漬けから分離した低温増殖性乳酸菌の特性

9:44 ○西脇俊和，下條　明，安藤　聡[1]（新潟農総研・食品研，[1]食総研）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C25a06　*Fructobacillus* 属細菌の糖代謝解析

10:05 ○及川　容，田中尚人[1]，佐藤英一，岡田早苗（東農大応生科・化学，[1]東農大・菌株）

3C25a07　好フルクトース乳酸菌 *Fructobacillus* 属の分離

10:16 ○田中尚人，及川　容[1]，佐藤英一[1]，岡田早苗[1]（東農大・菌株，[1]東農大応生科・化学）

3C25a08　MALDI-TOF MS を用いた S10-GERMS 法による乳酸菌の分類

10:27 ○堀田雄大，山本奈緒美，佐藤浩昭[1]，細田晃文，田村廣人（名城大・農，[1]産総研・環境管理）

3C25a09　能登のなれずしの微生物フローラ〜ピロシークエンス法による優勢菌種の解明〜

10:38 ○小柳　喬，　清原正志[1]，　松井　裕[1]，　山本恵子[1]，バルラフローリン，武　春美[2]，勝山陽子[2]，辻　篤史[2]，宮前博人[3]，近藤哲史[4]，中村静夫[2]，榎本俊樹，片山高嶺[1]，熊谷英彦[1]（石川県大・生資環・食品，[1]石川県大・資源研，[2]石川県・工試，[3]柳田食産(株)，[4]ISICO）

3C25a10　*Rhodoligotrophos appendicifer* gen. nov., sp. nov., a bacterium with projections isolated from a lake in Skarvsnes, Antarctica.

10:49 ○Wakao Fukuda，Kozo Yamada，Yuki Miyoshi[1]，Hirokazu Okuno，Haruyuki Atomi[1]，Tadayuki Imanaka（Ritsumeikan Univ.，[1]Kyoto Univ.）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C25a11　Induction of non-dividing cell in *Tomitella bifomata* AHU1821^T and its characterization

11:10 ○Dewi PUSPITA Indun[1]，Moe Uehara[1]，Taiki Katayama[2]，Michiko Tanaka[1]，Wataru Kitagawa[1,2]，Kozo Asano[1]，Yoichi Kamagata[1,2]（[1]Grad. Sch. Agric. Hokkaido Univ.，[2]AIST）

3C25a12　高温好気型堆肥における高度好熱菌 *Calditerricola satsumensis* に関する研究

11:21 ○吉井貴宏，森屋利幸，大島泰郎（共和化工・環微研）

3C25a13　氷楔単離株由来の覚醒因子は同環境下細菌のコロニー形成を促す

11:32 ○上原　萌[1]，Indun Dewi Puspita[1]，片山泰樹[2]，田中みち子[1]，北川　航[1,2]，浅野行蔵[1]，鎌形洋一[1,2]（[1]北大院農・応生科，[2]産総研）

3C25a14　深海サンプルからの放線菌の選択的分離法の確立

11:43 ○堀内俊輔，能木裕一[1]（横浜市立大学院・生命ナノシステム科学研究科，[1]海洋研究開発機構）

C25 会場　午後の部（14:00〜17:05）

微生物―細胞 – 複合微生物，共生微生物―，―その他―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C25p02　潰瘍性大腸炎の炎症緩和効果を有するプロバイオティクスに関する基盤的研究（その 1）

14:00 ○佐藤優理，坂本光央[1]，小川　仁[2]，三浦　康[2]，柴田　近[2]，川井　泰，北澤春樹，大熊盛也[1]，堀井　明[2]，齋藤忠夫（東北大院農・生物産業創成，[1]理研・BRC-JCM，[2]東北大病院・胃腸外科）

3C25p03　マウス腸管内容物のメタボローム解析

14:11 ○山本優理[1,2]，中西裕美子[1,3]，村上慎之介[1,3]，野津量子[4]，植野昌未[4]，日置恭司[4]，高倉　彰[4]，中東憲治[1,3]，平山明由[1]，杉本昌弘[1,3,5]，曽我朋義[1,2,3]，伊藤　守[4]，野村達次[4]，冨田　勝[1,2,3]（[1]慶大・先端生命研，[2]慶大・環境情報，[3]慶大・政策・メディア，[4]実中研，[5]京大・医）

3C25p04　Feeding rats yacon powder increases intestinal fermentation and alters microbial community profiles

14:22 ○Arya UTAMI Ni Wayan，Michiko Tanaka，Teruo Sone，Cindy Nakatsu，Kozo Asano（Grad. Sch. Agr., Hokkaido Uni.）

3C25p05　牛乳中の優占種細菌がウシ乳腺上皮細胞の遺伝子発現に与える影響

14:33 ○萩　達朗，麻生　久[1]，野村　将（農研機構・畜草研，[1]東北大院農・応生科）

3C25p06　異なるメタン濃度により集積された微生物菌叢の大量配列解析

14:44 ○下村義典[1]，山岸卓弥[1]，北川　航[1,2]，片山泰樹[3]，佐藤朋之[2]，田中みち子[1]，浅野行蔵[1]，鎌形洋一[1,2]（[1]北大院農・応生科，[2]産総研・生物プロセス，[3]産総研・地圏資源）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C25p07　牛糞堆肥培養物に生育する好熱性微生物叢とその共生によるメタン生成能の解析
15:05　○守　次朗，原新太郎，前田高輝[1]，橋床泰之（北大院農・応生科，[1]北農研センター）

3C25p08　*Methylobacterium* 属細菌の植物への優占化機構の解析
15:16　○中村由貴，森　　泉，鈴木信弘，金原和秀[1]，谷　明生（岡山大・植物研，[1]静岡大・工）

3C25p09　花に生息する嫌気性菌の探索と特性
15:27　○菅原麻美，　黒沢佳奈，　宮崎真努華，　世木田勇気，加藤幹雄，新村洋一，川崎信治（東農大応生科・バイオ）

3C25p10　シロイヌナズナ内生細菌の培養依存法・非依存法による群集構造解析
15:38　○小田嶋成徳，大塚重人，磯部一夫，妹尾啓史（東大院農生科・応生化）

3C25p11　共生系におけるアルファルファ根粒菌のシグナルレセプター McpS の機能
15:49　山本　裕，吉村　理，斎藤勝晴，○田渕　晃（信州大･農）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C25p12　植物遺体食性土壌動物 *Armadillidium vulgare*（オカダンゴムシ）排泄物の細菌群集解析
16:10　○國則成史[1,2]，飯田敏也[2]，宇佐美論[1]，大熊盛也[2]（[1]東洋大院・工，[2]理研 BRC-JCM）

3C25p13　メタ開裂酵素の多様性と新たな class の提唱
16:21　○石部貴映，鈴木敏弘[1]，岩田健一，大森俊雄（芝工大・シ工・生科，[1]芝工大院・地域環境システム）

3C25p14　海洋性プロピレン資化性細菌の単離・特徴およびアルケン酸化関連遺伝子の比較
16:32　○鈴木敏弘，古松星来[1]，森下直紀[1]，布施博之[1]（芝工大院・地環システム，[1]芝工大・シス理工・生命）

3C25p15　自然環境からの親水性イオン液体耐性菌及び耐性酵素の探索
16:43　○妹尾文哉，戸山真仁[1]，松原千明[1]，倉田淳志，岸本憲明（近畿大院・農，[1]近畿大・農）

3C25p16　深海底泥からの D-アミノ酸資化性菌の分離と解析
16:54　○窪田高秋，小林　徹，出口　茂（海洋研究開発機構）

C26 会場　午前の部（9:00〜12:05）

動物―生理 – 栄養，ビタミン，ミネラル，その他食品成分―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C26a01　高脂肪食給与マウスにおける短梗五加の脂質代謝制御
9:00　○西田美也子，西田浩志，川上賀代子，新野由佳，近藤桃子，清水太郎，小西徹也（新薬大・応生科）

3C26a02　大豆イソフラボンの肝脂肪低下および脂肪組織重量低下作用の解析
9:11　○寺澤佳織，小林美里，浦川千鶴[1]，佐藤　旭[1]，青山博昭[1]，村井篤嗣，堀尾文彦（名大院生命農・応用分子生命科，[1]残農研・毒性部）

3C26a03　スダチ果皮抽出物であるスダチチンによる食餌誘発性肥満マウスの糖・脂質代謝改善効果
9:22　○吉田知美，笹賀早也香，三好まどか，堤　理恵，首藤恵泉，保坂利男[1]，　新居佳孝[2]，　津嘉山正夫[2]，　岡久修己[2]，　岩田深也[2]，酒井　徹（徳島大院 HBS 研究部実践栄養，[1]埼玉医科大学，[2]徳島県工業技術センター）

3C26a04　カカオ由来プロシアニジン高含有組成物の肥満予防効果
9:33　○山下陽子，岡部正明[1]，夏目みどり[1]，芦田均（神戸大院･農，[1](株)明治）

3C26a05　黒大豆成分の血糖値上昇抑制作用とその作用機構の解明
9:44　○栗本雄太，滝川雅仁，柴山勇樹，曽我　実，山下陽子[1]，芦田　均[1]，津田孝範（中部大・応生，[1]神戸大院・農）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C26a06　レスベラトロール誘導体の抗肥満作用
10:05　○鶴田はねみ，土井　聡[1]，來住明宣[1]，松川泰治[1]，茶山和敏（静岡大・農，[1]UHA 味覚糖・開発）

3C26a07　キサントフモール高含有ホップ抽出物の OLETF ラットに対する肥満抑制作用および機序の解明
10:16　○由井一希，清藤文音，松薗飛鳥，池田さと美，森永真央，長田恭一（明治大・農・農化）

3C26a08　ホップ搾りかす抽出物の血糖値上昇抑制作用に関する研究
10:27　○植松大樹，堀井大輔，日野原顯，長田恭一（明治大 農･農化）

3C26a09　ハスカップ抽出物による抗糖尿病効果の解明
10:38　○堀井大輔，　植松大樹，　日野原顯，　由井一希，　長田恭一（明治大・農・農化）

3C26a10　本わさび粉末混合食摂取による糖尿病態緩和効果
10:49　○渡部達也，小野弥奈，伊藤芳明，長澤孝志（岩手大院・応生化）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C26a11　コーヒー摂取による糖尿病抑制作用とその機序解明
11:10　○曽我　実，滝川雅仁，小谷健人，中根康貴，安田龍司，津田孝範（中部大・応生）

3C26a12　マウス動脈硬化症発症に対するアスタキサンチンの効果
11:21　○渡邉晴香，山下栄次[1]，茶山和敏（静岡大・院・農，[1]富士化学工業・リテール事業部）

3C26a13　高コレステロール食給餌マウスへの杜仲葉熱水抽出液投与の効果
11:32　○荒木真由美[1]，　宮澤真紀[2]，　瀬戸山央[1]，　廣川隆彦[1]，青木信義[1]，　安間智慧子[3]，　小林征洋[4]，　亀井飛鳥[5]，　阿部啓子[5,6]（[1]神奈川県産技セ，[2]神奈川県衛研，[3](有)碧山園，[4]東京海洋大院・海洋科学・食品流通，[5]神奈川科学技術アカデミー，[6]東大院・農生科・応生化）

3C26a14　UV 長期間暴露マウスに対する燕窩抽出物投与の皮膚老化予防効果
11:43　○松川典子，塚原隆充，中山啓三，武川和琴[1]（栄養・病理学研究所，[1]コンビ）

3C26a15　アミノ酸摂取によるキヌレン酸産生を介したドーパミン放出の調節
11:54　○福渡　努，奥野海良人[1]，佐野光枝，柴田克己（滋賀県大･人間文化，[1]国立長寿医療研究セ・RI 管理室）

C26 会場　午後の部（14:00〜17:05）

動物―生理 – 栄養，糖質，脂質，タンパク質―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C26p02　大豆の脂質代謝調節機能におけるタンパク質および脂質成分の役割
14:00　○高橋陽子，八巻幸二（農研機構・食総研）

3C26p03　大豆タンパク質が食後糖吸収とインスリン分泌に及ぼす影響
14:11　○高梨浩之，向後雄一郎，竹中麻子（明治大農・農化）

3C26p04　大豆ペプチドおよび大豆のアミノ酸組成が食後インスリン分泌に及ぼす影響
14:22　○堀内真美，向後雄一郎，高梨浩之，竹中麻子（明治大農･農化）

3C26p05　低タンパク質食摂取によるインスリン分泌低下機構の解析
14:33　○武田知也，尾崎　依，伯野史彦[1]，高橋伸一郎[1]，竹中麻子（明治大農・農化，[1]東大院農生科・応動）

3C26p06　低タンパク質食摂取ラットにおけるインスリン分泌の低下が肝臓の IGF-I 合成抑制および中性脂質量増加に及ぼす影響
14:44　○尾崎　依，武田知也，豊島由香[1]，時田玲子[1]，南　史朗[1]，伯野史彦[2]，高橋伸一郎[2]，竹中麻子（明治大農･農化，[1]日医大老研･

生体機能制御，[2]東大院農生科・応動）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C26p07　アミノ酸欠乏やインスリン欠乏が培養肝細胞のインスリン様成長因子システムおよびインスリン応答性に及ぼす影響の解析
15:05　◦赤西成美，伯野史彦，千田和広，加藤久典[1]，豊島由香[2]，竹中麻子[3]，高橋伸一郎（東大・院農生科，[1]東大・総括プロジェクト機構，[2]日本医大・老研，[3]明治大・農）

3C26p08　低タンパク質栄養時における Leu 過剰摂取が可欠アミノ酸代謝酵素の発現に与える影響
15:16　◦吉村亮二，今村　渉[1]，金本龍平，加藤久典[1]（京都府大院・応用生命，[1]東大院農生科・応生化）

3C26p09　高脂血症治療薬ピタバスタチンは抗動脈硬化作用を有するプラスマローゲンの血漿濃度を増加させる
15:27　◦山元貴之，西向めぐみ[1]，前場良太[2]，原　博[1]（北大農・生機化，[1]北大院農・応生科，[2]帝京大・医）

3C26p10　オキアミより抽出したアルキル型リン脂質の摂取はラット血漿中 DHA 含有プラスマローゲンを特異的に増加させる
15:38　◦西向めぐみ，山崎裕也[1]，小池誠治[1]，前場良太[2]，原　博（北大院農・応生科，[1](株)ADEKA，[2]帝京大・医）

3C26p11　摂取するイソマルトオリゴ糖 / メガロ糖の重合度は実験的大腸炎症状に影響する
15:49　◦岩谷一史，Jae-Sung Lee，山岸晋也，篠 木亜季，Weeranuch Lang，Hee-Kwon Kang，原　博，木村淳夫，石塚　敏（北大・院農）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C26p12　直鎖イソマルトメガロ糖はラット小腸におけるケルセチン配糖体吸収を促進する
16:10　◦篠木亜季，Lang Weeranuch，木村淳夫，石塚　敏，原　博（北大・院農）

3C26p13　妊娠期における糖質制限食がメタボリックシンドローム発症に及ぼす影響
16:21　◦森　成美，平井　静，大橋　洸，田高梨子，越野由希絵，江頭祐嘉合（千葉大・園芸）

3C26p14　酸化コレステロール負荷アポ E 欠損マウスに対するエゼチミブの抗動脈硬化作用
16:32　◦照沼彰一郎，小川莉絵子，長田恭一（明治大・農）

3C26p15　U-^{13}C-Leu を用いた HepG2 細胞の定量的プロテオーム解析― Lys・Arg 欠乏に応答するタンパク質の検索 ―
16:43　◦木戸口隆，川端博秋（明治大院・農）

3C26p16　糖尿病ラットの糖代謝に及ぼす *Lactobacillus gasseri* SBT2055 の影響
16:54　◦森田有紀子，白石　彩[1]，小川哲弘[2]，門岡幸男[2]，城内文吾[3]，佐藤匡央[3]（九大・農，[1]九大院・生資環，[2]雪印メグミルク，[3]九大院・農院）

C27 会場　午前の部（9:00〜11:00）

動物―遺伝子・タンパク質 – 構造，機能―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C27a01　Ca2+ 依存性ホスファチジルセリン結合タンパク質 AnnexinA5 のアイソフォームの解析
9:00　◦横山奈央子，八野充子，武本淳史，池上春香，松本和也，田口善智（近大・生物理工）

3C27a02　酵母 split-ubiquitin システムによるヒト MPDU1 蛋白質の解析
9:11　◦高橋哲夫，岩本栄介（東海大・工・生命化学）

3C27a03　ビネキシンはビンキュリンの活性化を促進する
9:22　◦市川尚文[1]，山下　寛[1]，木村泰久[1]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・iCeMS）

3C27a04　腎臓における Lgr4 の機能解析
9:33　◦霜田貴宏，毛利泰彰，大山一徳，赤松　篤，西森克彦（東北大・農）

3C27a05　ヒト hArp5 および hArp8 遺伝子ノックアウト細胞を用いた INO80 クロマチンリモデリング複合体の機能解析
9:44　◦高橋裕一朗，松田　涼，北村大志，加茂真理子，西嶋　仁[1]，柴原慶一[1]，原田昌彦（東北大・院農・分子生物，[1]国立遺伝研）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C27a06　ヒト前立腺型タンパク質架橋化酵素の発現と前立腺由来タンパク質の基質配列解析
10:05　◦樋口　幾，伊藤みほ，福井美奈，鞍本克真，清水由隆，人見清隆（名大院生命農・応用分子生命科）

3C27a07　モデル生物としてのメダカ（*Oryzias latipes*）におけるタンパク質架橋化酵素の解析
10:16　◦斉藤麻衣，樋口　幾，伊藤みほ，人見清隆（名大院生命農・応用分子生命科）

3C27a08　レトロウイルスインテグラーゼと核内タンパク質 PML の相互作用とその機能
10:27　◦三宅克英，沖野雄気，小島佑介，木渓俊介，西島謙一，飯島信司（名古屋大・工）

3C27a09　前シナプス制御分子 ComplexinII と結合するタンパク質の同定
10:38　松永みどり，　◦志田麻紀子，　兼田　悠，　山森早織[1]，高橋正身[1]，片岡正和（信州大院・工，[1]北里大・医・生化）

3C27a10　黄色ブドウ球菌鉄取り込み Isd 蛋白質-金属ポルフィリン間の結合および輸送機構解析
10:49　◦森脇由隆，寺田　透，Jose M. M. Caaveiro[1]，堤　浩[2]，浜地　格[3]，津本浩平[1]，清水謙多郎（東大院・農・応生工，[1]東大・医科研，[2]東工大院・生命理工，[3]京大院・工・合成生化）

C27 会場　午後の部（14:00〜16:43）

動物―遺伝子・タンパク質 – 発現制御―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C27p02　細胞老化因子のゴルジ体形成に対する寄与
14:00　◦鵜殿美弥子，山下俊太郎[1]，片倉喜範[2]（九大院・生資環，[1]九大院・シス生，[2]九大院・農院）

3C27p03　単一細胞操作による B16 メラノーマ細胞の選別とチロシナーゼ遺伝子発現解析
14:11　◦ムジュジヒラリーウィリアム，栗原　誠，飯田泰広（神奈川工科大学・応用バイオ）

3C27p04　催奇形性因子による転写調節因子への影響性
14:22　◦小島拓哉，西谷　健，山根一祐[1]，高橋直樹（東大院・農生科・応生化，[1]テレ研）

3C27p05　発達段階に依存した精巣特異的リボソームタンパク質 L10-like の発現
14:33　◦佐土原英司，杉原圭彦，大島健司，松田　幹，灘野大太（名大・院生命農）

3C27p06　PAX2 を介したアンドロゲン非依存性癌の発生・増殖制御メカニズムの解明
14:44　◦伊藤紗弥，上田　崇，三木恒治（京都府立医大）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C27p07　男性ホルモンは小胞体ストレスの制御により肥満を抑制する
15:05　◦佐藤隆史，沢津橋俊，三宅由花，溝端健亮，齋田佳織，新福摩弓[1]，　佐々木努[1]，　北村忠弘[1]，　柳瀬敏彦[2]，　森　和俊[3]，加藤茂明[4]，北川浩史（群馬大・生体調節・核内情報，[1]群馬大・生体調節・代謝シグナル，[2]福岡・医・内分泌，[3]京大院・理，[4]東大分生研）

3C27p08　オートファジーの活性化によるアンドロゲン受容体の発現調節について
15:16　◦三谷塁一，南　真人，山地亮一，原田直樹，中野長久[1]，乾　博（大阪府大院・生命環境，[1]大阪女子短大）

3C27p09　膵 β 細胞におけるアンドロゲン受容体の役割と高グルコース下での分解について
15:27 ○増田達哉，高橋勇次，原田直樹，山地亮一，中野長久[1]，乾　博（大阪府大・生命環境，[1]大阪女子短大）
3C27p10　Y 染色体遺伝子 Uty は骨格性差形成を規定する
15:38 ○井上和樹，松本高広，今井祐記，加藤茂明（東大･分生研）
3C27p11　ショウジョウバエ核内受容体 EcR をモデルとした新たな脂質代謝制御因子群の探索の試み
15:49 ○鴨志田祐己，藤山沙理，木村周平，鈴木絵里子，林　珍仙，武山健一，加藤茂明（東大分生研）

p12〜p14 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C27p12　熱ショックにより誘導されるショウジョウバエ hsp70 mRNA はそのアンチセンス転写産物より産生される内因性 siRNA により分解される
16:10 ○鈴木絵里子，　伊藤紗弥，　林　珍仙，　木村周平，中村(藤山)沙理，鴨志田祐己，　泊　幸 秀，加藤茂明，武山健一（東大分生研）
3C27p13　核内受容体 HNF4 α の翻訳後修飾の網羅的同定
16:21 ○横山　敦，桂　彰吾，伊藤　亮，橋場和華，関根弘樹，藤木亮次，加藤茂明（東大　分生研）
3C27p14　PPAR γ における新規翻訳後修飾の探索
16:32 ○桂　彰吾，横山　敦，藤木亮次，加藤茂明（東大分生研）

C28 会場　午前の部（9:00〜11:43）

動物―細胞工学 – 細胞培養，組織培養，物質生産―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C28a01　ラッキョウ由来多糖フルクタンを用いた無血清細胞凍結液による細胞保護効果
9:00 ○小川亜希子，　宮野靖子，　水井慎也[1]，　清水雅史[1]，寺田　聡[1]，大浦　剛[2]，小林恭一[2]，安川沙織[3]，森山展行[3]（鈴鹿高専，[1]福井大院工，[2]福井県食加研，[3]エル・ローズ）
3C28a02　リラキシン関連因子(RLF)の受容体 RXFP2/LGR8 発現昆虫細胞安定株の作製
9:11 ○加藤　光，Vipin Kumar Deo[1]，高坂哲也，朴　龍洙[1]（静大院・農・応生化，[1]静大・創科院）
3C28a03　昆虫細胞を用いたヒト ABCB6 の大量発現および精製
9:22 ○大貫　元[1]，木村泰久[1]，松尾道憲[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大 iCeMS）
3C28a04　Ligation-independent cloning 法を用いたカイコ-バクミド発現系用ベクターの構築
9:33 ○加藤竜也，トンプソンジェームス[1]，朴　龍洙[2]（静岡大農･応生化，[1]メイヨ医科大学，[2]静岡大・創科技院）
3C28a05　Virus-like particles of human papillomavirus L1 major capsid protein and chimeric forms produced and purified using silkworm expression system
9:44 ○Muthukutty Palaniyandi，Tatsuya Kato[1]，Enoch Y. Park（Grad. Sch. Sci. & Technol., Shizuoka University, [1]Fac. of Agric., Shizuoka University）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C28a06　カイコ幼虫を用いた BmNPV 表面上への *Neospora caninum* 抗原タンパク質の提示
10:05 ○大月隆寛，董　金華[1]，加藤竜也，朴　龍洙[1]（静岡大農･応生化，[1]静岡大創科技院）
3C28a07　新規牛ネオスポラ症診断法の開発
10:16 ○董　金華，大月隆寛[1]，加藤竜也[1]，朴　龍洙[2]（静岡大創科技院，[1]静岡大農・応生化，[2]静岡大・創科技院）
3C28a08　培養基材の幾何学的性質が細胞挙動へ与える影響の解析
10:27 ○吉村英晃，末信一朗[1]，藤田　聡[1]（福井大院・工・生物応用，[1]福井大院・工・ファイバー）
3C28a09　カーボンナノチューブ(CNT)による神経細胞内 Ca イオンレベル変化と細胞内への CNT の取り込み
10:38 ○松本光太郎[1]，鏡石良太[2]，Whitby Raymond[3]，清水範夫[1,2]（[1]東洋大･バイオナノエレクトロニクス研究センター，[2]東洋大院･生命科学，[3]ブライトン大学）
3C28a10　神経成長因子結合カーボンナノチューブを配置した基板上での神経ネットワーク形成
10:49 ○鏡石良太[1]，松本光太郎[2]，竹井弘之[1,2]，清水範夫[1,2]（[1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター）

a11〜a13 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C28a11　ガンマ線照射高分子ゲル上におけるマウス神経幹細胞/前駆細胞の培養
11:10 ○川瀬文音，森　英樹，原　正之（阪府大院・理）
3C28a12　重金属イオンのマウス神経幹細胞/前駆細胞の神経分化に対する影響
11:21 ○佐々木豪，森　英樹[1]，原　正之[1]（阪府大院，[1]阪府大）
3C28a13　マウスマスト細胞ハイブリドーマの IgE 刺激を介した即時相・遅延相応答
11:32 ○河原岳志（信州大院・農）

C28 会場　午後の部（14:00〜17:59）

動物―生理 – 生体機能，生体制御―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C28p02　リポ蛋白質受容体ファミリー LRP10 の組織特異性
14:00 ○鹿田　星，細田明美，山岸あづみ，立花太郎，福村智恵，金　東浩，佐伯　茂（大阪市大・生活科学・生体情報）
3C28p03　Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路に対するリポタンパク質受容体ファミリーの影響
14:11 ○鬼丸祐二，平田倫子，関家麻奈未，細田明美，山岸あづみ，福村智恵，金　東浩，佐伯　茂（大阪市大･生活科学･生体情報）
3C28p04　リポ蛋白質受容体ファミリーLRP10 による Wnt シグナル経路を介する骨芽細胞の分化制御
14:22 ○鋳方綾香，平田倫子，関家麻奈未，細田明美，山岸あづみ，福村智恵，金　東浩，佐伯　茂（大阪市大･生活科学･生体情報）
3C28p05　ラクトフェリン結合タンパク質の精製と機能解析
14:33 ○金　東浩，岡本涼子，池田一雄[1]，福村智恵，佐伯　茂（大阪市大・生活科学・生体情報，[1]大阪市大・医学）
3C28p06　NMDA 型グルタミン酸受容体に対する日本酒に含まれるアミン類の効果
14:44 ○則包潔人，伊豆英恵[1]，松丸克己[1]，山田康枝（近畿大･工･院，[1]酒総研）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C28p07　揮発性化学物質の神経系細胞への効果
15:05 ○大谷航平，増田修一，伊豆英恵[1]，松丸克己[1]，白石浩平，青島　均[2]，山田康枝（近畿大・工・院，[1]酒総研，[2]山口大院）
3C28p08　株化肝実質細胞(RLN-10)における iNOS mRNA 発現および NO 産生に及ぼすリゾープス水抽出物の影響
15:16 ○武田悠史，小野雄平[1]，内田真祐子，鈴木武人，宮崎陽子，田中和明，滝沢達也（麻布大院・獣医，[1]麻布大・獣医）
3C28p09　中心子目植物に含有する抗酸化性含窒素色素 Betaxanthin の体内動態と生理作用
15:27 ○高橋あずさ，　新関えりか[1]，　堅田優実[1]，　奥村純子[1]，福田絵里[1]，　菊地裕人[2]，　有塚　勉[2]，　渡辺　純[3]，　鈴木　卓，知地英征[1]（北大･院農，[1]藤女子大･食物栄養，[2]日甜総研，[3]食総研）
3C28p10　生体内硫酸基供与体 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate の育毛効果
15:38 ○中川原康介，加藤真一[1]，柴　肇一[1]，石毛和也（ヤマサ醤油・医薬化成品，[1]リジェンティス）
3C28p11　UVA 照射ヘアレスマウスに対する緑藻シフォナキサンチンの光老化抑制作用

15:49 ◦松尾明香，菅原達也，平田　孝（京大院・農）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C28p12　北方系小果実類(*Aronia melanocarpa*)のラット肝グルタチオン代謝への影響
16:10 ◦水口喜代，　黒坂友里恵，　齋藤靖香，　中村由貴子，高橋あずさ[1]，鈴木　卓[1]，知地英征，中河原俊治（藤女子大，[1]北大）

3C28p13　心筋 Mn-SOD はミトコンドリア呼吸とタンパク質アセチル化を制御する
16:21 ◦戸田年彦，川上　哲[1]，野尻英俊[1]，清水孝彦（千葉大・院医・先進加齢医学，[1]都健康長寿医療センター・老化機構）

3C28p14　細胞質で代謝する活性酸素は細胞死を制御する
16:32 ◦渡辺憲史，澁谷修一，清水孝彦（千葉大院医･先進加齢医学）

3C28p15　皮膚と被毛における細胞質スーパーオキシドの役割
16:43 ◦澁谷修一[1,2]，小澤裕介[1,2]，清水孝彦[1,3]（[1]千葉大院医・先進加齢医学，[2]ジェー・エー・シー，[3]都健康長寿医療セ･老化機構）

3C28p16　酸化ストレスに起因した皮膚萎縮に対するグルコサミンの改善作用
16:54 ◦合田彩美[1,2]，小林慶司[1,3]，澁谷修一[1,2]，清水孝彦[1,4]（[1]千葉大院医・先進加齢医学，[2]ジェー・エー・シー，[3]順天堂大院医・整形外科，[4]都健康長寿医療センター・老化機構）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3C28p17　細胞質酸化ストレスによるアミロイド β オリゴマー形成能および記憶異常の促進
17:15 ◦村上一馬[1,2]，村田　央[2]，野田義博[2]，田原正一[2]，金子孝夫[2]，木下憲明[3]，初田裕幸[2]，村山繁雄[2]，入江一浩[1]，白澤卓二[4]，清水孝彦[2,5]（[1]京大院農，[2]都老人研，[3]免疫生物研究所，[4]順天大院医，[5]千葉大院医）

3C28p18　インスリン抵抗性による高インスリン血症はアルツハイマー病様症状を増悪しない
17:26 ◦清水孝彦[1,2]，村上一馬[2,3]，横山慎也[2]，村田　央[2]，小澤裕介[1,2]，入江一浩[3]，白澤卓二[4]（[1]千葉大院医，[2]都健康長寿研，[3]京大院農，[4]順天大院医）

3C28p19　Ecdysone 生合成における Black Box 初期経路の中間体候補物質の解析
17:37 ◦木村亮太，吉永直子，森　直樹，西田律夫，小野　肇（京大農・応用生命）

3C28p20　Ecdysone 生合成中間体候補物質となる 3-オキソステロイド類の解析
17:48 ◦小野　肇，森田沙代，浅倉一洋，木村亮太，吉永直子，森　直樹，西田律夫（京大院農）

C29 会場　午前の部（9:00〜11:43）

動物―細胞 – 細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C29a01　Scr3 のパルミトイル化依存的なエキソソーム分泌
9:00 ◦猪川　亮，犬塚達俊，陳　　岑，木津久美子[1]，柴田秀樹，成田宏史[1]，牧　正敏（名大院生命農・応用分子生命科，[1]京女大・食物栄養）

3C29a02　ESCRT-III 関連因子 CHMP1A のリン酸化に関する解析
9:11 ◦前本佑樹，木曽里美，大迫洋平，柴田秀樹，牧　正敏（名大・院生命農）

3C29a03　小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送におけるカルシウム結合タンパク質 ALG-2 と annexin A11 の生理的役割
9:22 ◦京　卓志，横山　健，山室　南，杉浦洋文，牧　正敏，柴田秀樹（名大院生命農・応用分子生命科）

3C29a04　新規 ALG-2 相互作用因子 CHERP の細胞内局在と分子特性解析
9:33 ◦大杉桂奈江，井元千晶，柴田秀樹，牧　正敏（名大院生命農・応用分子生命科）

3C29a05　mRNA 輸送因子 DBP5 の核-細胞質間輸送と mRNA 輸送の相関性
9:44 ◦志 岐 拓 哉，宮前友策，永尾雅哉，神戸大朋，増田誠司（京大生命・統合生命）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C29a06　ヒト老化細胞における核内構造の変化
10:05 ◦新井留実，谷脇歩美，三木健輔[1]，藤井道彦[1]，鮎沢　大[1]（横浜市大・国際総合，[1]横浜市大・生命ナノシステム）

3C29a07　老化による血管の機能変化とその予防法の確立
10:16 ◦都築　毅，谷中美由紀，池田郁男（東北大院・農）

3C29a08　老化関連因子による肝機能制御に関する研究
10:27 ◦續　祐実，鵜殿美弥子，片倉喜範[1]（九大院・生資環，[1]九大院・農院）

3C29a09　アルギニン変異導入法による ABCA1 の TM6 と TM12 の配向性の予測
10:38 ◦伊藤晋平[1]，山崎　亮[1]，長尾耕治郎[2]，植田和光[2,1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大・iCeMS）

3C29a10　Cyclospoline A による ABCA1 の阻害機構の解析
10:49 ◦長尾耕治郎[1]，前田　南[2]，植田和光[1,2]（[1]京大・iCeMS，[2]京大院農・応用生命）

a11〜a13 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C29a11　接着斑でのメカノセンシングにおけるビネキシンの役割
11:10 ◦山下　寛[1]，市川尚文[1]，松山大輔[1]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]（[1]京大院・農，[2]京大・iCeMs）

3C29a12　間葉系幹細胞における接着斑タンパク質ビンキュリンの細胞外基質の堅さに応じた挙動変化
11:21 ◦和田洋樹[1]，山下　寛[1]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大 iCeMS）

3C29a13　クローン病関連タンパク質 Dlg5 と TGF-βI 型受容体の結合部位の同定
11:32 ◦瀬崎拓人[1]，市川尚文[1]，Lucia Tomiyama[1]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大 iCeMS）

C29 会場　午後の部（14:00〜17:05）

動物―細胞 – 情報伝達，細胞応答―

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C29p02　ヒト上皮ナトリウムチャネル活性化剤 S3969 の蛍光膜電位測定による活性評価
14:00 ◦松田龍星[1]，櫻井敬展[1,2]，石丸喜朗[1]，森　直紀[1]，渡邉秀典[1]，三坂　巧[1]，阿部啓子[1]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]日清食品 HD・食総研）

3C29p03　β-ユーデスモールによる冷受容チャネルの活性化
14:11 ◦小原一朗，北尾紗代子，岡田紘幸，高橋千佳，眞鍋簡利，大内　潤[1]，佐々木克敏[1]，形山幹生（キリンホールディングス株式会社，[1]協和発酵キリン株式会社）

3C29p04　マウス味細胞における酸味物質および ATP の受容機構の解析
14:22 ◦北田　亮，松村成暢，呉　性姫，林由佳子（京大院･農）

3C29p05　消化管内分泌細胞におけるカゼインによる CCK 分泌機構の解析
14:33 ◦後藤健仁，比良　徹，中島進吾，原　　博（北海道大学大学院農学院）

3C29p06　Synergistic effect of lysophosphatidylcholine on NGF-induced survival signaling pathways through receptor TrkA in PC12 cells
14:44 ◦QIMUGE WUHAN，Katsuhiko KITAMOTO，Manabu ARIOKA （Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C29p07　ヒト毛乳頭細胞におけるアーユルヴェーダハーブの生

理作用

15:05 ○山口葉子，Mohammad N Hossain，三木健輔，山下律郎[1]，藤井道彦，鮎沢　大（横浜市大・生命ナノシステム，[1](株)SLH BCL カンパニー）

3C29p08　アーユルヴェーダハーブによるヒト線維芽細胞の増殖効果

15:16 ○三木健輔，三田充真，藤井道彦，Mohammad N Hossain，山下律郎[1]，鮎沢　大（横浜市大・生命ナノシステム，[1](株)SLHBCL カンパニー）

3C29p09　アマラキ(*Emblica officinalis*)の不死化ヒト表皮角化細胞に対する生理作用

15:27 ○杉本量平，三木健輔，山上義巳，Mohammad Nazir Hossain，山下律郎[1]，藤井道彦，鮎沢　大（横浜市立大･生命ナノシステム，[1](株)SLH BCL カンパニー）

3C29p10　G タンパク質 γ サブユニット GNG11 の細胞老化における役割

15:38 ○工藤　生，伊藤陽平，古賀慎太郎，Mohammad N Hossain，三木健輔，藤井道彦，鮎沢　大（横浜市大・生命ナノシステム）

3C29p11　高脂肪食がアルツハイマー病モデルマウスの記憶形成に与える影響

15:49 ○田村　南，Bruno Herculano，大庭彩香，久恒辰博（東大院・新領域・先端生命）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C29p12　脳の加齢変化を評価する MRI 計測を用いた網羅的画像解析

16:10 ○大庭彩香，阿部欣史，陳　　揚，左達秀敏[1]，仁木佳文[1]，時光一郎[1]，久恒辰博（東大院･新領域･先端生命，[1]花王株式会社･ヒューマンヘルスケア研究センター）

3C29p13　イメージングサイトメーターを用いた細胞老化プロセスの定量化解析

16:21 ○黒田真衣，鵜殿美弥子[1]，片倉喜範[2]（九大院シス生・シス生，[1]九大院生資環・遺資工，[2]九大院農院・生機科）

3C29p14　バルプロ酸のヒストン脱アセチル化酵素阻害活性を介したオリゴデンドロサイト前駆細胞系への老化作用

16:32 丸橋拓人，○長井　薫（山梨大院・医工総合）

3C29p15　ブラジル産プロポリスによるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)活性制御と神経保護作用

16:43 ○石合　忍，田原　渉[1]，山本倫大[1]，長井　薫（山梨大院･医工総合，[1]日本自然食品(有)）

3C29p16　準致死量の界面活性剤によるヒト正常細胞の未成熟老化の誘導機構

16:54 ○山上義巳，藤井道彦，鮎沢　大（横浜市大･バイオ科学）

A30 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物—環境応答，ストレス応答，生物間相互作用—，—植物ホルモン，成長調節物質—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3A30a01　イネの病害抵抗性を制御する転写因子 OsWRKY53 の機能発現機構の解析

9:00 ○小川哲史[1]，清水崇史[1]，宮本皓司[1,2]，西澤洋子[3]，南　栄一[3]，増田優花[1]，中条哲也[1]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]，山根久和[1]（[1]東大生物工学セ，[2]学振 DC1，[3]農生資研）

3A30a02　イネのジテルペン型ファイトアレキシン生合成を制御する新規転写因子の同定

9:11 中川　仁，田中惇訓[1]，岡田憲典[2]，前田　哲，鎌倉高志[1]，山根久和[2]，○森　昌樹（農業生物資源研，[1]東理大院･理工，[2]東大･生物生産工学研究センター）

3A30a03　イネのファイトアレキシン生合成酵素遺伝子クラスターに存在する P450 遺伝子の機能解析

9:22 ○山崎浩平，蓑田裕美，岡田　敦，岡田憲典，宮崎　翔[1]，川出　洋[1]，　渋谷直人[2]，　古賀仁一郎[3]，　矢島　新[4]，　薮田五郎[4]，豊増知伸[5]，野尻秀昭，山根久和（東大生物工学セ，[1]東農工大・連合農，[2]明治大農・生命科，[3]明治製菓，[4]東農大応生科・醸造，[5]山形大農・生物資源）

3A30a04　イネのジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子クラスターの発現制御におけるヒストン修飾の関与

9:33 ○宮本皓司[1,2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]，山根久和[1]（[1]東大生物工学セ，[2]日本学術振興会特別研究員 DC）

3A30a05　イネのサクラネチン合成酵素 OsNOMT の単離とキャラクタリゼーション

9:44 ○清水崇史，林　鳳秋，長谷川守文[1]，岡田憲典，野尻秀昭，山根久和（東大生物工学セ，[1]茨大・農）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3A30a06　Myc-LCO の化学酵素合成とミヤコグサ共生関連遺伝子の発現誘導活性

10:05 ○河原千春，秋山康紀[1]，林　英雄[1]（阪府大・生命環境，[1]阪府大院・生命環境）

3A30a07　イネ根圏土壌でのヒ素代謝に関わる微生物の関与

10:16 ○倉俣正人，片岡良太，馬場浩司，石坂真澄，山崎健一，安部　匡，井倉将人，高木和広，平舘俊太郎，石川　覚（農環研）

3A30a08　タバコ葉トライコームのカドミウム蓄積および排出に関与する遺伝子の探索

10:27 ○原田英美子[1,2,3]，　金　志娥[2]，　Andreas J. Meyer[4,5]，Ruediger Hell[4]，　Stephan Clemens[3,6]，　崔　龍義[2]（[1]滋賀県大・環境科学，[2]江原大・山林資源，[3]ライプニッツ植物生化学研，[4]ハイデルベルク大，[5]ボン大，[6]バイロイト大）

3A30a09　シロイヌナズナ細胞質型 APX 変異体の強光ストレス応答性

10:38 ○大森瑶子，岩間勝久，丸田隆典，澤　嘉弘，重岡　成[1]，石川孝博（島根大・生資科・生命工，[1]近畿大・農・バイオ）

3A30a10　ユーグレナチオレドキシンペルオキシダーゼの同定と機能解析

10:49 ○玉木　峻，山口由貴，丸田隆典，澤　嘉弘，重岡　成[1]，石川孝博（島根大生資科・生命工，[1]近畿大農・バイオ）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3A30a11　LC-MS/MS による新奇ストリゴラクトン探索法の確立

11:10 ○上野琴巳[1]，水谷正治[1]，滝川浩郷[1,2]，杉本幸裕[1,2]（[1]神戸大院農・生機科，[2]JST/JICA SATREPS）

3A30a12　合成ストライゴラクトン GR24 の植物による代謝と生成物の同定

11:21 ○中嶌　瞳[1,2]，　平垣内雅規[1]，　本並宜子[1]，　上野琴巳[1]，水谷正治[1]，滝川浩郷[1,2]，杉本幸裕[1,2]（[1]神戸大院・農，[2]JST/JICA SATREPS）

3A30a13　ストリゴラクトン生合成阻害剤の植物に対する効果

11:32 ○伊藤晋作，　戸塚直哉，　梅原三貴久[1]，　花田篤志[1]，山口信次郎[1]，浅見忠男（東大院・農生科・応生化，[1]理研 PSC）

3A30a14　新規ストリゴラクトンミミック Debranone の創製研究

11:43 ○福井康祐，伊藤晋作，浅見忠男（東大院・農）

3A30a15　アブシジン酸により誘導されるゼニゴケの二次代謝産物

11:54 ○蔭山暁人，高橋公咲[1]，鍋田憲助[1]（北大･農，[1]北大院･農）

A30 会場　午後の部（14:00〜17:59）

植物—植物ホルモン，成長調節物質—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3A30p02　アブシジン酸受容体アンタゴニスト ASn

14:00 ○武藤拓也，岡本昌憲[1]，Sean Cutler[1]，平井伸博[2]，轟　泰司[3]（静大院・農，[1]California Univ.，[2]京大院・農，[3]静大・農）

3A30p03　配座エントロピー縮小型アブシジン酸受容体アンタゴニストの創出

14:11 ○野武　晃，武藤拓也[1]，竹内　純[2]，轟　泰司（静大･農，[1]静大院・農，[2]静大院・創造）

3A30p04　エチレン様活性化合物の選抜と作用機構の解析

14:22 ○北畑信隆，早瀬大貴，湯本弘子[1]，中野雄司[2]，中山真義[1]，

浅見忠男（東大院・農生科，[1]花き研究所，[2]理研）

3A30p05　ジベレリン代謝に関わる CYP714 ファミリーの阻害剤

14:33　◦新間優子，酒井杏奈[1]，内記久美[1]，水谷正治[2]，平井伸博[3]，大西利幸[4]，轟　泰司（静大農，[1]静大院農，[2]神戸大院農，[3]京大院農，[4]静大・若手グローバル研究リーダー育成拠点）

3A30p06　標的因子 DELLA との結合におけるジベレリン受容体の親和性決定領域の研究

14:44　◦Seung-Hyun Park，中嶋正敏，尹　禎敏，大谷征史，浅見忠男（東大院農生科・応生化）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3A30p07　ジベレリン様活性を示す合成化合物；探索と活性発現機構

15:05　◦下高原宏明，大谷征史，羅　　明，中野雄司[1]，浅見忠男（東大院・農生科・応生化，[1]理研基幹研究所）

3A30p08　ジベレリン受容体機能阻害剤を用いた信号伝達過程を標的とする変異体選抜

15:16　◦尹　禎敏，中嶋正敏，大谷征史，増口　潔，Park Seung-Hyun，浅見忠男（東大院農生科・応生化）

3A30p09　ハバチによるシバヤナギのゴール(ハウラタマフシ)形成における植物ホルモンの役割

15:27　◦山口大貴，田中弘毅[1]，徳田　誠[2]，浅見忠男[1]，鈴木義人（茨城大・農・資源生物，[1]東大院農生科・応生化，[2]佐賀大農・応生科）

3A30p10　タマバエによるゴール形成における植物ホルモン類の関与

15:38　◦田中祐一朗，岡田浩一[1]，徳田　誠[2]，浅見忠男[1]，鈴木義人（茨城大・農・資源生物，[1]東大院農生科・応生化，[2]佐賀大農・応生科）

3A30p11　アブラムシによるハルニレのゴール形成機構に関する研究

15:49　◦吉田彩夏，鈴木義人（茨城大農・資源生物）

p12〜p16発表者の接続時間⑥16:00〜16:10

3A30p12　アミノ基転移酵素を標的とするオーキシン生合成阻害剤

16:10　成川　恵[1]，喜久里貢[1,2]，佐藤明子[1]，田代早苗[2]，三谷由佳[2,1]，三井麻利江[1]，　中村郁子[1]，　小倉岳彦[2]，　軸丸裕介[2]，　神谷勇治[2]，林謙一郎[3]，　浅見忠男[4]，　添野和雄[5]，　藤岡昭三[6]，　吉田茂男[1]，◦嶋田幸久[1,2]（[1]横浜市大・木原生研，[2]理研 PSC，[3]岡山理大・理，[4]東大院・農生科，[5]農研機構・近中四農研，[6]理研・基幹研）

3A30p13　新奇トリアゾール系発根促進剤の探索と機能解析

16:21　◦白井郁也，福井康祐，伊藤晋作，北畑信隆，根岸直希[1]，河岡明義[1]，浅見忠男（東大院・農生科・応生化，[1]日本製紙・アグリ・バイオ研）

3A30p14　ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz 耐性突然変異体群 *bil* 原因遺伝子による情報伝達制御の分子機構とイネ *bil* 形質転換体の解析

16:32　◦中野雄司，山上あゆみ，嶋田勢津子，森　昌樹[1]，中野明彦[2]，Joanne Chory[3]，浅見忠男[4]（理研・基幹研，[1]農業生物資源研，[2]東大院・理，[3]Salk Inst.，[4]東大院・農生科）

3A30p15　新規ブラシノステロイド生合成阻害剤の生物活性

16:43　◦王　敬銘，山田和弘，山上あゆみ[1]，小川敦史，浅見忠男[2]，中野雄司[1]，吉澤結子（秋田県立大・生物資源，[1]理研・基幹研，[2]東大・応生化）

3A30p16　新規ブラシノステロイド生合成阻害剤の構造活性相関研究

16:54　◦山田和弘，矢島　脩，吉澤結子，王　敬銘（秋田県立大・応用生物）

p17〜p20 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3A30p17　ショ糖生合成能強化植物におけるホルモン代謝を介した側枝形成機構の解明

17:15　◦大鳥久美，Daniel Padilla-Chacon，作山治美，田茂井政宏，重岡　成（近畿大・農・バイオ）

3A30p18　シロイヌナズナ由来シトクロム P450 CYP94C1 の機能解析

17:26　◦谷口沙希，和久田真司，北岡直樹，佐分利亘，川出　洋[1]，松浦英幸，鍋田憲助，今井亮三[2]，松井博和（北大院農・応生科，[1]東農工大農・応生科，[2]農研機構・北海道農研）

3A30p19　ヒメツリガネゴケの 12-オキソファイトジエン酸還元酵素の機能解析

17:37　◦高橋知寛，高橋公咲[1]，阿部達也[1]，P.K.G.S.S. Bandara[1]，松浦英幸[1]，鍋田憲助[1]（北大・農，[1]北大院・農）

3A30p20　イチョウウキゴケのリポキシゲナーゼの解析

17:48　◦地阪光生，Veronica S. Chedea，西村浩二[1]，長屋　敦，横田一成（島根大・生資科，[1]島根大・総科研支セ）

A31 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物—タンパク質，酵素 – 機能，調節—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3A31a01　カキ果実に含まれるポリガラクツロン酸分解酵素阻害タンパク質の精製と阻害活性測定

9:00　◦國井沙織，片桐実菜[1]，山西妃早子[1]，尾崎嘉彦[2]，森本康一（近畿大･生物理工，[1]和歌山県･工技センター，[2]農研機構･果樹研）

3A31a02　シロイナズナ *CYP73A5* 遺伝子を機能発現した大腸菌を用いた cinnnamic acid への水酸基導入反応

9:11　◦北村瑛美，青木葉子，太田千裕，藤田尚也[1]，音松俊彦[1]，三沢典彦[2]，新藤一敏（日女大，[1]神戸天然物化学，[2]石川県大･生資研）

3A31a03　タバコ細胞における 1 型プロリン水酸化酵素を含む複合体の解析

9:22　◦長山江理子[1]，陶山明子[2]，松岡　健[1,2,3]（[1]九大院・生資環，[2]九大院・農，[3]九大・生環セ）

3A31a04　ピレトリン生合成に関わる除虫菊リパーゼのアシルトランスフェラーゼ活性の基質認識

9:33　◦山田　現，光森智紀，植田浩一[1]，菊田幸雄[2]，中山幸治[2]，勝田純郎[2]，畑中顯和[3]，松田一彦（近畿大院･農･応生化，[1]近畿大･農・応生化，[2]大日本除虫菊，[3]山口大）

3A31a05　除虫菊におけるピレトリンの局在

9:44　◦武田健吾，植田浩一[1]，財満信宏，森山達哉，河村幸雄，畑中顯和[2]，松田一彦（近畿大院・農・応生化，[1]近畿大・農・応生化，[2]山口大・農）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3A31a06　バラ開花時における香気前駆配糖体 2PEG と 2PEG 生合成酵素の変動解析

10:05　大場幸江，平田　拓[1]，◦大西利幸[2]，渡辺修治[1]（静大院･農，[1]静大院・創造，[2]静大・GRL）

3A31a07　天然変性タンパク質 CP12 による GAPDH 活性調節の分子メカニズムの解明

10:16　◦松村浩由，甲斐章寛，田茂井政宏[1]，和田野晃[2]，井上　豪，重岡　成[1]（阪大院・工，[1]近大・農，[2]羽衣国際大・人間生活学部）

3A31a08　DUF26 タンパク質 Gnk2 の構造とマンノース認識

10:27　◦宮川拓也，澤野頼子，宮園健一，秦野賢一[1]，田之倉優（東大院・農生科，[1]群馬大・工）

3A31a09　植物細胞におけるアラビノガラクタンタンパク質(AGP)の翻訳後修飾の解析

10:38　◦津野雄平[1]，松岡　健[1,2,3]（[1]九大・農，[2]九大院農院，[3]九大生環セ）

3A31a10　イネ由来の抗菌性蛋白質でイネの病気を防ぐ：イネディフェンシン蛋白質の利用可能性の検討

10:49　◦提箸祥幸，高久洋暁[1]，矢頭　治（農研機構・中央農研，[1]新潟薬大・応生科）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3A31a11　酵母 *Candida albicans* における植物ディフェンシンの作用メカニズム解析

11:10　◦小黒芳史，大越映澄，山崎晴丈，梨本正之，高木正道，高久洋暁（新潟薬大応生科）

3A31a12　ダイズ子葉細胞におけるジスルフィド結合を介した *β*-コングリシニン複合体の形成

11:21　◦和田濵裕之[1]，　岩崎健祐[1]，　石本政男[2,3]，　西澤けいと[3]，裏出令子[1]（[1]京大院・農，[2]農生資研，[3]北農研）

3A31a13　米糠由来 GDSL モチーフカルボキシエステラーゼの同定および酵素特性

11:32　◦濱田茂樹，長谷川陽一，鈴木保宏（(独)農研機構 作物研）

3A31a14　高温登熟障害におけるイネ胚乳の品質低下は登熟中の未熟種子の ATP 量に依存する

11:43　八重島充弘，シャク高志[1]，草野博彰，河本健正，大沼万里子，廣政智子，平井望央，松永拓也，田代涼夏，佐々木忠将，◦島田浩章（東京理科大・生物工，[1]東京理科大・RNA 研究センター）

3A31a15　蛋白質酸化還元制御はイネ種子貯蔵蛋白質プロラミンの分子進化に影響した

11:54　◦川越　靖，恩田弥生[1]（生資研・植，[1]山形大・農）

A31 会場　午後の部（14:00〜16:54）

植物—タンパク質，酵素 – 機能，調節遺伝子，情報伝達，分化—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3A31p02　赤色光は苔類ゼニゴケの細胞分裂を制御する

14:00　◦井上佳祐，中村衣里，保坂将志，石崎公庸，西浜竜一，河内孝之（京大生命・統合生命）

3A31p03　青色光受容体フォトトロピンは苔類ゼニゴケの葉状体背腹性決定を制御する

14:11　◦芦原悠紀子[1]，小松愛乃[2]，石崎公庸[2]，西浜竜一[2]，河内孝之[1,2]（[1]京大・農・応用生命，[2]京大生命・統合生命）

3A31p04　イネの JA 応答性 bHLH 型転写因子 RERJ1 と相互作用する JA 情報伝達因子の探索

14:22　◦Ioana Valea[1,2]，岡田憲典[1]，宮本皓司[1,3]，清水崇史[1]，Michael Riemann[2]，Peter Nick[2]，野尻秀昭[1]，山根久和[1]（[1]東大生物工学セ，[2]カールスルーエ工科大学，[3]日本学術振興会特別研究員 DC）

3A31p05　イネのジャスモン酸早期応答性 bHLH 型転写因子 RERJ1 の X 線結晶構造解析に向けた精製

14:33　◦河村奈央子，岡田憲典，野尻秀昭，山根久和（東大生物工学セ）

3A31p06　プラスチドシグナルに応答する新規転写因子の同定と解析

14:44　矢津芙美子，安達ふみ，稲葉靖子，柿崎智博[1]，◦稲葉丈人（宮崎大・IR 推進機構，[1]農研機構・野茶研）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3A31p07　シロイヌナズナ由来シグナルペプチドペプチダーゼ（AtSPP）の過剰発現株を用いた網羅的遺伝子発現解析

15:05　◦養田直倫[1]，星　雅子[1]，田村倫子[1,2]，石丸喜朗[1]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東農大応生科・栄養，[3]KAST）

3A31p08　アブラナ科植物の自家不和合反応を誘導する SRK/MLPK 受容体複合体の活性化機構

15:16　◦垣田　満，村瀬浩司，浅野（下里）裕子，岩野　恵，柴　博史，磯貝　彰，高山誠司（奈良先端大・バイオ）

3A31p09　植物ゲノムの突然変異検出法の開発

15:27　塩谷詩織，牧野耕三，布柴達男[1]，◦平津圭一郎（防衛大・応化，[1]国基大・教養）

3A31p10　ウコギ科およびショウガ科植物由来の新規テルペン合成酵素遺伝子の構造と機能解析

15:38　◦八反順一郎，平良友希，柄谷英里奈，常田実由紀，新藤一敏[1]，三沢典彦（石川県大・生資研，[1]日女大家政・食物）

3A31p11　モリンガにおけるアスコルビン酸生合成酵素遺伝子の発現解析

15:49　◦近藤隆之，藤川愉吉[1]，上田晃弘[1]，長岡俊徳[1]，実岡寛文[1]，Manuel Calcano[2]，Milton Martinez[2]，Jose Martich[2]，江坂宗春[1]（広島大・生生，[1]広島大院・生物圏，[2]UASD 大・農）

p12〜p15 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3A31p12　エンドウマメ葉緑体インビトロ翻訳系の構築と翻訳阻害剤の影響評価

16:10　◦野村勇太，高林泰斗，戸澤　譲（愛媛大・無細胞セ）

3A31p13　Pokeweed Antiviral Protein のコンフォメーション・ダイナミクスに及ぼす NAG の影響

16:21　◦中嶋寛倫，福永幸裕[1]，渡邉啓一[2]，山下昭二[1]，西本悦子[1]（九大院・生資環，[1]九大院・農，[2]佐大・農）

3A31p14　トマト植物体における 2 種のイソレクチン遺伝子の発現

16:32　◦浅野修好，原　梨紗，坂本　光，江面　浩[1]，小栗　秀（東農大生物産業・生物生産，[1]筑波大院・生命環境）

3A31p15　A single nucleotide change in cre1 affects carbon catabolite repression and enhances cellulase expression in a Trichoderma reesei mutant

16:43　◦Juliano de Oliveira Porciuncula，Takanori Furukawa，Kazuki Mori[1]，Hideki Hirakawa[1]，Satoru Kuhara[1]，Yasushi Morikawa，Wataru Ogasawara（Nagaoka Univ. of Tech. Bioeng. Dept，[1]Kyushu Univ. Grad. School of Gen. Res. Tech.）

A32 会場　午前の部（9:00〜10:49）

糖鎖—構造—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3A32a01　子嚢菌類 *Mariannaea elegans* 由来の新奇ガラ系列スフィンゴ糖脂質の構造解析

9:00　◦谷　泰史，中村香里，沢　良太，西尾　匡[1]，齋藤茂樹，伊藤將弘[1]，糸乗　前[2]，三原久明（立命館大・生命科学・生物工，[1]立命館大・生命科学・生命情報，[2]滋賀大・教育・化学）

3A32a02　病原性担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans*，*Malassezia furfur*，*Rhodotorula mucilaginosa* の糖鎖構造解析

9:11　◦大橋貴生，酒井香奈江[1]，五ノ井透[1]，藤山和仁（阪大生物工学国際交流セ，[1]千葉大真菌医学研究セ）

3A32a03　グルコマンナン由来オリゴ糖の構造解析と性能評価

9:22　◦下村周平，岡本真由美，小堀　深，岩井修一[1]，竹本克宏[1]，清水功雄（早大理工・応化，[1]スイスロワール）

3A32a04　魚介類由来グリコサミノグリカンの含有量と組成分析

9:33　◦田村純一，中山　清[1]，増田紳哉[2]，石原幸雄[2]，吉岡俊介[3]，吉岡　忍[3]，白出征三[4]，有馬和也（鳥取大地域・地域環境，[1]カンダ技工，[2]鳥取水試，[3]オーク，[4]㈲謙蒲鉾）

3A32a05　ナイセリア属細菌の産生するリポオリゴ糖の免疫化学分析

9:44　◦田中利弥，山崎良平（鳥大・農）

a06〜a09 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3A32a06　メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* によるヒトサポシン B の生産と解析

10:05　◦渡邉　徹[1]，高岡友紀[1]，川島育夫[2,3]，櫻庭　均[3]，千葉靖典[1,3]（[1]産総研・糖鎖医工学，[2]都医学研，[3]明治薬大・臨床遺伝学）

3A32a07　シアロ型多価糖鎖配位体とニホンニワトコレクチンとの凝集メカニズムの解析

10:16　◦梅村征一郎，尾形　慎[1]，村田健臣，朴　龍洙[1]，中村直樹[2]，松尾一郎[2]，碓氷泰市[1]（静岡大農・応生化，[1]静大院・創科技，[2]群馬大・工・応化生化）

3A32a08　レクチン結合親和力に基づくアシアロ型多価配糖体の分子設計

10:27　◦田見祐一，中馬康志，尾形　慎[1]，村田健臣，碓氷泰市[1]（静岡大農・応生化，[1]静岡大・創科技院）

3A32a09　糖鎖関連遺伝子各種ノックアウトマウスの血清 N-グライコミクス

10:38　◦天野麻穂，橋本　亮，西村紳一郎（北大院・先端生命）

A32 会場　午後の部（14:00〜17:48）

糖鎖—合成・生合成—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3A32p02　*Photobacterium* sp. 由来 α2,3-シアル酸転移酵素反

応への有機溶媒添加の効果

14:00 ○長島　生，峯　利喜[1]，山本　岳[2]，清水弘樹（産技総研生物プロセス，[1]JT 糖鎖ビジネスユニット，[2]JT たばこ事業本部）

3A32p03　糖鎖を基質とした酵素反応におけるマイクロ波効果研究

14:11 ○清水弘樹，長島　生，作田智美，杉山順一[1]，峯　利喜[2]，山本　岳[3]（産技総研生物プロセス，[1]産技総研ナノシステム，[2]JT 糖鎖ビジネスユニット，[3]JT たばこ事業本部）

3A32p04　海洋性細菌由来 α2,3-シアル酸転移酵素のイノシトール類に対する転移活性評価

14:22 ○宮崎達雄，峯　利喜[1]，館田尚家，金子直史，渡部貴幸，梶原ひとみ[1]，鰺坂勝美，山本　岳[1]（新潟薬大・応生科，[1]JT 糖鎖ビジネスユニット）

3A32p05　ヒト ER α-1,2 mannosidase I の *in vitro* におけるマンノース遊離活性の性状

14:33 ○相川順一[1]，松尾一郎[2]，伊藤幸成[1,3]（[1]理研・基幹研，[2]群馬大院・工，[3]ERATO・JST）

3A32p06　*N*-結合型・*O*-結合型糖鎖改変出芽酵母株の開発

14:44 ○冨本和也，藤田康子，千葉靖典[1]，地神芳文[1]，仲山賢一[2]，中島芳浩，安部博子（産総研・健康工学，[1]産総研・糖鎖医工学，[2]産総研・生物プロセス）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3A32p07　ビオチンリンカーに結合したコンドロイチン硫酸オリゴ糖の合成と糖-Midkine 間の相互作用

15:05 ○武田尚子，川野愛美[1]，加藤早紀[1]，灘中里美[2]，北川裕之[2]，田村純一[1]（鳥取大院工・化，[1]鳥取大地域・地域環境，[2]神戸薬大・生化学）

3A32p08　昆虫細胞におけるシアル酸代謝の特徴について

15:16 ○北島　健[1,2]，　藤田明子[1]，　小林隆史[1,2]，　呉　　迪[1,2]，Garenaux Estelle[1]，濵口香代[1,2]，郷　慎司[1,2]，佐藤ちひろ[1,2]（[1]名大・生物機能セ，[2]名大院・生命農学）

3A32p09　*Photobacterium* sp. JT-ISH-224 由来 α2,3-sialyltransferase の受容体基質特異性の解析

15:27 ○岡　修平，山本　岳[1]，峯　利喜[2]，村田健臣（静岡大農・応生化，[1]日本たばこ産業・たばこ事業本部・製品科学部，[2]日本たばこ産業・糖鎖ビジネスユニット）

3A32p10　シアリルオリゴ糖鎖含有デキストリンナノ粒子の合成およびインフルエンザウイルスとの結合能評価

15:38 ○杉山尚弘，梅村征一郎，尾形　慎[1]，渡邊浩史[2]，鷹羽武史[2]，柳瀬美千代[2]，碓氷泰市[1]（静岡大農・応生化，[1]静岡大・創科技，[2]江崎グリコ(株)健康科学研）

3A32p11　フコシル三糖及び五糖含有新規 4 価配位体の合成

15:49 ○森　大地，尾形　慎[1]，朴　龍洙[1]，碓氷泰市[1]（静岡大農・応生化，[1]静岡大・創科技院）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3A32p12　ムラサキヒトデに由来する新奇ガングリオシド GAA-7 の合成研究

16:10 ○玉井秀樹[1,2]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京大・iCeMS）

3A32p13　トラフナマコに由来する新奇生理活性ガングリオシド HPG-7 の全合成

16:21 ○岩山祐己[1,2]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京大・iCeMS）

3A32p14　ニッポンウミシダ由来ガングリオシド CJP-2 の合成研究

16:32 ○水野孝星[1]，玉井秀樹[1,2]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

3A32p15　Siglec-2 阻害剤の効率的合成法の開発

16:43 ○菅沼勇輝[1]，岩山祐己[1,2]，植木章晴[1,2]，今村彰宏[1,2]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京大・iCeMS）

3A32p16　LPS/LOS に存在する Kdo2 糖の合成：Kdo 供与体の反応性

16:54 一柳　剛，○大柿敦嗣，Yi Ruiqin[1]，庄野結大，島田麻衣[1]（鳥取大・農，[1]鳥取大院・農）

p17〜p19 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3A32p17　共通の中間体を用いた LPS に含まれる Kdo2 糖[Kdo(α2-8)Kdo]の合成

17:15 一柳　剛，○庄野結大，大柿敦嗣，島田麻衣[1]（鳥取大・農，[1]鳥取大院・農）

3A32p18　LPS/LOS の分岐酸性コア 3 糖コンジュゲート前駆体の合成

17:26 一柳　剛，○島田麻衣[1]，福永真弓[1]，山崎良平（鳥取大・農，[1]鳥取大院・農）

3A32p19　LacdiNAc 構造を有する複合型糖鎖の効率的合成

17:37 ○宮沢進平，真下竜也[1]，松尾一郎（群馬大院・工，[1]群馬大・工）

C33 会場　午前の部（9:00〜11:00）

生物化学工学—酵素工学・生物反応工学，培養工学(微生物，動植物細胞)—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C33a01　カーボンナノチューブへのアルカリホスファターゼの固定化

9:00 ○橋田泰彦，梅山有和[1]，今堀　博，橋田　充（京大・iCeMS，[1]京大院工・分子工）

3C33a02　糸状菌界面活性蛋白質 RolA と固体表面間の相互作用機構の解析

9:11 ○田邊弘毅[1]，大類景子[1]，上原健二[1]，高橋　徹[2,3]，冨樫貴成[4]，有田稔彦[4]，阿部敬悦[1,3]（[1]東北大院・生物産業創成，[2]酒総研・基盤，[3]東北大・未来研，[4]東北大・多元研）

3C33a03　昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系における翻訳促進配列の解析

9:22 ○島村修司，湧川盛洋[1]，伊東昌章[1]（沖縄高専　専攻科，[1]沖縄高専　生物資源工学科）

3C33a04　植物由来多糖を利用した酵素の安定化

9:33 ○寺田　聡，清水雅史，川原　渉，小林恭一[1]，大浦　剛[1]（福井大・工，[1]福井県食加研）

3C33a05　酵母細胞表層工学を用いたバイオツールに適した新規ルシフェラーゼの創出

9:44 ○伏見達也，三浦夏子，新谷英也，角田弘之[1]，黒田浩一，植田充美（京大院農・応用生命，[1]日立製作所・中央研究所）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C33a06　*Pseudomonas* 属細菌由来 γ-グルタミルトランスフェラーゼの諸性質

10:05 ○椹木庸介，矢野成和，今岡大士，日び隆雄[1]，若山　守（立命大・生命，[1]福井県大・生物資源）

3C33a07　Influence of surface loop (D40 loop) deletion on expression and stability of Streptomyces antibioticus phospholipase D

10:16 ○Damnjanovic Jasmina，Hideo Nakano，Yugo Iwasaki（Dept.bioeng., Grad. Sci., Nagoya Univ.）

3C33a08　深海環境下での好気性微生物活性を推定するための実験装置開発とそれを用いた生分解プラスチック分解

10:27 ○開　俊樹，関口峻允[1]，加藤千明，秦田勇二，丸山　正，阿部文快[2]，小西正朗(独)海洋開発機構，[1]東京海洋大，[2]青山学院大学・理工）

3C33a09　光照射は海産種苗の初期餌料動物プランクトン，ワムシの増殖密度を増加させる

10:38 ○天井友仁，田中賢二，吉松隆夫[1]（近大院・産技，[1]三重大院・生資）

3C33a10　代謝病における CRP 検査の高感度かつ定量域の広いラテックス凝集試薬の研究

10:49 ○板橋忠生，小森谷友絵，吉宗一晃，神野英毅（日大生産工・物応化）

C33 会場　午後の部（14:00〜17:37）

生物化学工学—ペプチド・タンパク質工学，生物材料工学，生体医用工学—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C33p02　*Sphingobium* sp. MI1205 株由来のハロアルカンデハロゲナーゼ LinB_MI における beta-HCH 分解活性に重要なアミノ酸残基の同定
14:00　◦森内良太, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝（東北大院生命科）

3C33p03　超好熱菌由来 CutA1 に異常に多く存在するイオン性残基の熱安定化戦略
14:11　◦松浦祥悟，国島直樹，油谷克英（理研・播磨研）

3C33p04　耐熱性を有する好冷性変異体 *Bacillus* ウリカーゼの構造機能解析
14:22　小川智輝，伊藤貴文，西矢芳昭[1]，岸本高英[2]，◦日ビ隆雄（福井県大　生物資源，[1]摂南大　理工，[2]東洋紡　敦賀バイオ研）

3C33p05　不安定タンパク質の効率的再生法の確立
14:33　◦保田達哉，野稲俊宏，松元俊彦，安藤祥司，井本泰治（崇城大工・応微工）

3C33p06　オボアルブミンのポリマー化機構
14:44　◦川本好博，多田俊治，恩田真紀（大阪府立大・理・生物）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C33p07　Development of bead display system for molecular evolution of cellulases
15:05　◦Bo Zhu，Shoya Mori，Hideki Matsuda，Takaaki Kojima，Hideo Nakano（Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.）

3C33p08　バイオシリカ形成作用をもつ新規ペプチドの構築
15:16　◦木村友紀，藤山一平，松田祐介（関西学院大院・理工）

3C33p09　リバースアラニンスキャン法による腸球菌のクオラムセンシング阻害剤 ZBzl-YAA5911 の創製
15:27　◦横畑綾治[1]，佐藤まみ[1]，西口賢三[1]，園元謙二[1,2]，鈴木　崇[3]，中山二郎[1]（[1]九大院・農，[2]九大・バイオアーク，[3]愛媛大院・医学系研究科）

3C33p10　抗微生物ペプチドを利用した抗菌性素材の開発
15:38　中村　允，鈴木秀明[1]，岩崎　崇[2]，朝岡　愛[2]，河野悠介[1]，解野誠司，永野富郎[1]，◦石橋　純[2]（和歌山工技セ，[1]JITSUBO(株)，[2]農生資研）

3C33p11　イネタンパク質由来ペプチドの生体防御に関する多機能性の解析
15:49　◦谷口正之[1,2]，松橋嘉保[2]，菊地理沙[1]，武井教展[3]，落合秋人[1,2]，田中孝明[1,2]（[1]新潟大・工，[2]新潟大院・自然科学系，[3]新潟大・人材育成セ）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C33p12　ペプチド移植による抗体様 RNA 分解酵素の作製
16:10　◦水巻耕輔，北村昌也，中西　猛（阪市大・院工・化生）

3C33p13　酵母を用いた G タンパク質共役受容体アッセイと細胞膜提示ペプチドリガンドの開発
16:21　◦原　圭祐，黒田浩一，植田充美（京大院農・応用生命）

3C33p14　バイオミメティックゲル新素材“ドーパミルポリ-γ-グルタミン酸”の環境調和合成と機能分析
16:32　◦芦内　誠，大矢遥那，山崎紗千代（高知大・農）

3C33p15　ROCK 阻害剤 Y-27632 の添加が幹細胞の神経細胞への分化に及ぼす影響
16:43　◦上芝原佑[1]，中村麻衣[2]，清水範夫[1,2]（[1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・生命科学）

3C33p16　ナノ材料を用いたマウス ES 細胞の神経細胞への分化誘導
16:54　◦三浦和典，Whitby Raymond[1]，清水範夫（東洋大院・生命科学，[1]ブライトン大学）

p17〜p18 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3C33p17　生体分子によるカーボンナノチューブの水相分散
17:15　◦金　眞熙，金　隆岩[1]，遠藤守信[1]，片岡正和（信州大院・工，[1]信州大・工）

3C33p18　糸状菌由来免疫回避機能性素材を用いた新規医療用ナノ粒子の開発
17:26　高橋　徹，村垣公英[1]，川上和義[2]，冨樫貴成[3]，高見誠一[3]，阿尻雅文[3]，福本　学[4]，◦阿部敬悦[1]（東北大・未来研，[1]東北大院農，[2]東北大院医，[3]東北大・多元研，[4]東北大・加齢研究）

C34 会場　午前の部（9:00〜12:05）

新技術—分析法，解析法—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

3C34a01　脂質二分子膜におけるアンホテリシン B チャネルを介したイオン透過
9:00　◦窪田慎太郎，籠橋宏樹，白井　理，加納健司（京大院農・応用生命）

3C34a02　モデル生体膜系における膜結合型酵素 d-Fructose Dehydrogenase による電子移動に駆動されたイオン透過
9:11　七里　慧，◦白井　理，加納健司（京都大院・農）

3C34a03　薄層リング電極を用いた電気化学測定による微生物活性の定量法
9:22　◦野田達夫，濱本勝美，白井　理，加納健司（京大院農・応用生命）

3C34a04　水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法による正確な MIC の測定
9:33　◦塚谷忠之，末永　光，志賀匡宣[1]，野口克也[1]，松本　清[2]（福工技セ・生物食品研，[1](株)同仁化学研，[2]崇城大・生物生命）

3C34a05　信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタによる RNA 合成反応の検出
9:44　◦西矢芳昭，谷　敏夫[1]，山本佳宏[2]（摂南大・理工・生命科学，[1](株)バイオエックス，[2]京都市産技研・バイオ）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

3C34a06　質量分析に基づく定量的メタボロミクスに資する新規相対定量法の提案
10:05　◦竹林宏祐，喜多村美紀，馬場健史，福崎英一郎（阪大院工・生命先端工）

3C34a07　超臨界流体クロマトグラフィータンデム質量分析を用いた単一観測システムによる残留農薬迅速一斉分析方法の開発
10:16　◦石橋愛実，松原惇起，内方崇人，酒井美穂[1]，安藤　孝[1]，福崎英一郎，馬場健史（阪大院・工・生命先端，[1]宮崎県総合農業試験場）

3C34a08　Discrimination of Roasted Kopi Luwak and Regular Coffee Based on Geographical Origins and Coffee Variety using Gas Chromatography Coupled with Quadrupole Mass Spectrometry
10:27　◦UDI JUMHAWAN，SASTIA PRAMA PUTRI，YUSIANTO YUSIANTO[1]，ERLY MAWARNI[2]，TAKESHI BAMBA，EIICHIRO FUKUSAKI（Grad.Sch.Eng.Osaka Univ.，[1]ICCRI，[2]ITB）

3C34a09　炭素同位体比分析を用いたチャ産地判別技術の確立
10:38　◦村田有明，Uli Engelhardt[1]，山田桂大[2]，吉田尚弘[2]，渡辺修治（静大院・創造，[1]ブラウンシュバイク工科大学・食品化学，[2]東工大理工・化学環境）

3C34a10　GCxGC-QMS を用いた植物中の代謝物分析
10:49　◦坂本雄紀，川名修一，中川勝博，宮川治彦（島津製作所）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

3C34a11　ペプチドの MS/MS フラグメンテーションを改善する

4-アミジノフェニル基の N 末端選択的導入法
11:10 ○吉川　徹，宮下正弘，宮川　恒（京大院農・応用生命）
3C34a12　化合物の分離と混合を同時に行う機能を有する薄層クロマトグラフィーの分析法の開発
11:21 湯本弘子，林　宣之[1]，市村一雄，○中山真義（農研機構・花き研，[1]農研機構・食総研）
3C34a13　Measurement of available zinc in milk and yoghurt by analyzing interaction of the zinc-responsive trans factor and cis element
11:32 ○Mohammad Shohel Rana Siddiki，Shunsaku Ueda[1]，Isamu Maeda[1]（United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [1]Fac. Agric., Utsunomiya Univ.）
3C34a14　鶏卵抗体 IgY の ELISA への利用に関する基盤研究
11:43 ○山城知佳，坪田庄真[1]，湯沢由紀夫[2]，門松健治[1]，池松真也[3]（沖縄高専・創造システム工学，[1]名大院医・生化，[2]藤田保衛大院医・腎内科，[3]沖縄高専・生物資源工学）
3C34a15　メラミンおよびアトラジンの簡易かつ高感度測定法の開発
11:54 ○鈴木勇輔，天野郁香，斉木　博，鈴木義規（工科大院）

C34 会場　午後の部（14:00〜17:48）

新技術—分析法，解析法—，—先端バイオ計測，アレイ，コンビバイオ工学等—，—その他—

p02〜p06 発表者の接続時間④ 13:50〜14:00

3C34p02　20 mer における Tm と Kd の関係
14:00 ○安保　哲，斎木　博，鈴木義規（工科大）
3C34p03　DNA 核酸の結合定数の測定
14:11 ○渡部　翔，斎木　博[1]，鈴木義規[1]（工科大院・バイオ，[1]工科大・応用）
3C34p04　メタミドホス結合 DNA アプタマー取得の試み
14:22 ○皆川宏貴，秋冨　穣，古市真木雄，和賀　巌（NEC ソフト）
3C34p05　リステリア・モノサイトゲネスに結合する DNA アプタマーの取得と評価
14:33 清水かおり，○堀井克紀，森下直樹[1]，秋富　穣，古市真木雄，松本貴之[1]，和賀　巌（NEC ソフト(株)，[1]日本ハム(株)）
3C34p06　グアイアコールを産生する Alicyclobacillus 属細菌の迅速検査
14:44 ○石原武雄，高澄耕次，大嶋利幸，執行達朗（サッポロビール価値創造フロンティア研究所）

p07〜p11 発表者の接続時間⑤ 14:55〜15:05

3C34p07　未知遺伝子組換え作物の同定を目的とした塩基配列解析手法の検討
15:05 ○真野潤一，原田美央子，布藤　聡[1]，近藤一成[2]，穐山　浩[2]，手島玲子[2]，高畠令王奈，古井　聡，橘田和美（農研機構・食総研，[1]ファスマック，[2]国立医薬品食品衛生研）
3C34p08　GM 大豆使用納豆の超高感度遺伝子検査法の開発
15:16 ○執行修司，奥村史朗[1]，冨岡寛治（久留米工業高等専門学校，[1]福岡県工技セ）
3C34p09　zinc フィンガーヌクレアーゼによるニワトリ胚体細胞における遺伝子 ターゲティングの試み
15:27 ○石川幸親，荒木功人（岩手大・工・応化生命）
3C34p10　バイオナノカプセルを用いた抗体整列化技術によるバイオセンサーの高感度化
15:38 ○飯嶋益巳，山本実加子，黒田俊一（名大院・生命農）
3C34p11　ゾルゲル光導波路を用いた有機リン化合物の検出
15:49 ○谷屋早紀，土屋圭司，里村武範，中根幸治[1]，黒田浩一[2]，植田充美[2]，Ashok Mulchandani[3]，榎波康文[4]，末信一朗（福井大院・工・生応化，[1]福井大院・工・材開工，[2]京大院・農・応用生命，[3]カリフォルニア大学，[4]広島大・ナノデバイス研）

p12〜p16 発表者の接続時間⑥ 16:00〜16:10

3C34p12　量子ドットナノプローブを用いた香辛料からのアミロイド β 凝集阻害成分の網羅的スクリーニング
16:10 赤間弘昌，上井幸司，○徳楽清孝（室工大工・応化）
3C34p13　超微小領域の熱応力のクリープによる微生物死滅温度の直観的計測法の開発—ナノサーチ技術 nanoTA の利用
16:21 ○中西弘一，小暮亮雅[1]，藤井岳直[2]，粉川良平[2]，出内桂二（キリンビバレッジコア技術研，[1]島津総合分析試験センター，[2]島津製作所）
3C34p14　Zeocin 耐性遺伝子を用いた遺伝子スイッチの進化工学
16:32 ○池　紘平，福冨浩樹，田代洋平，斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）
3C34p15　高効率な DNA クローニング法
16:43 後藤健太，○永野幸生（佐賀大）
3C34p16　ヌクレオシドキナーゼを用いた微生物ゲノムの連続改変
16:54 ○冨永将大，田代洋平，斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

p17〜p19 発表者の接続時間⑦ 17:05〜17:15

3C34p17　組換え大腸菌の長期保存技術の評価
17:15 大久保将人，久次米夕佳里，岸川昭太郎，中出浩司，○村田武英，小幡裕一（理研 BRC）
3C34p18　自然界の海藻類に由来する生体分子複雑系の異種計測データマイニング
17:26 ○伊達康博[1,2]，坂田研二[2]，伊藤研悟[2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]理研 PSC，[2]横市院生命，[3]名大院生命農，[4]理研 BMEP）
3C34p19　「適正飲酒啓発のためのアルコール体質チェック」有害な飲酒を低減するための取組み
17:37 ○太田　豊，加藤史佳，加藤直樹，佐見　学，小林いずみ[1]，鈴木哲史[2]，北川　泰（アサヒグループ HD(株)食の基盤研，[1]国立がん研・学際的研究支援室，[2]湘南鎌倉総合病院ゲノム室）

講演番号 開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

C01 会場　午前の部（9:00〜11:32）

環境—その他—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4C01a01　根毛形成促進ペプチド(RHPP)の植物への取り込み解析
9:00 ◦松宮芳樹，谷口力哉，久保田謙三，久保　幹（立命館大生命・生物工）

4C01a02　土壌肥沃度指標(SOFIX)に基づく農地土壌データベースの構築
9:11 ◦堀井幸江，松野敏英，久保田謙三，松宮芳樹，久保　幹（立命館大生命・生物工）

4C01a03　フィターゼ遺伝子を用いたリン循環に関与する微生物の定量
9:22 ◦松野敏英，堀井幸江，田篭純太，久保田謙三，松宮芳樹，久保　幹（立命館大・生命・生工）

4C01a04　オイルパーム幹の維管束の偏光顕微鏡を用いた検出
9:33 ◦村田善則，久保智史[1]，小杉昭彦，森　隆，安部　久[1]（国際農研，[1]森林総研）

4C01a05　地球に優しい天然素材サーファクチンナトリウムの有用性
9:44 ◦泉田将司，柳澤恵広，上山　昇（(株)カネカ·QOL 事業部）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4C01a06　カキ果実のクチクラ膜のバイオメカニクス特性に関わるワックスの効果
10:05 ◦椿俊太郎，杉村和紀[1]，寺本好邦[1]，尾崎嘉彦[2]，東　順一[3]（高知大総研セ，[1]京大院農・森林科学，[2]農研機構・果樹研，[3]京大院農・地域環境）

4C01a07　好熱菌発酵産物が植物体内のアミノ酸代謝に与える影響
10:16 ◦宮本浩邦[1,2,3]，石川一人[1]，井藤俊行[4]，申　美來[1]，長尾雅音[1]，宮本　久[3]，児玉浩明[5]（[1]千葉大院・園芸，[2]日環科学，[3]三六九，[4]京葉プラント，[5]千葉大院・融合科学）

4C01a08　マンガン酸化系を構成する 2 種の細菌の分離と相互作用解析
10:27 ◦小野博史，田村　隆，高田　潤，稲垣賢二（岡山大学大学院・自然科学）

4C01a09　河口環境代謝プロファイリング技術による底生物流システム評価法構築の試み
10:38 ◦朝倉大河[1]，葭田征司[1]，伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横市院生命，[2]理研 PSC，[3]理研 BMEP，[4]名大院生命農）

4C01a10　排水処理汚泥の細菌叢解析による硫化水素発生プロセスとその影響因子に関する研究
10:49 森下由唯，水野康平，◦安東晶子[1]，平田　舞[2]，田中賢二[2]（北九州高専，[1]九州電力・総研，[2]近大・産理工）

a11〜a12 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

4C01a11　*Phanerochaete chrysosporium* 自然突然変異株由来のカルボキシン耐性遺伝子
11:10 ◦熊野翔太，田村美理，小篠貴臣，泉津弘佑，阪本鷹行，北浦博法，鈴木一実，入江俊一（滋賀県大・環）

4C01a12　脂肪酸塩の *Fusarium* 及び *Cladosporium* に対する抗カビ効果
11:21 ◦鷲巣　孝，惠良真理子[1]，二宮純子[1]，川原貴佳[2]，完山陽秀[2]，森田　洋[1]（北九大院・国際環境工，[1]北九大・国際環境工，[2]シャボン玉石けん(株)）

C02 会場　午前の部（9:00〜11:54）

環境—環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション，資源変換，資源再生利用—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4C02a01　安定化次亜塩素酸水を基盤とする畜産分野を指向した衛生管理および防疫対策
9:00 ◦田村健治，神戸英昭[1]，大石智哉[1]（首都大産技高専·品川，[1](株)マッキンリー）

4C02a02　ビスフェノール類に走性を示す細菌の集積応答特性
9:11 ◦荷方稔之，近藤孝拓，柿井一男（宇都宮大院工·物質環境）

4C02a03　塩素化エチレン類汚染環境の好気的生物修復の環境影響評価
9:22 ◦俵　陵輔，沼田　充，山副敦司[1]，細山　明[1]，黄地祥子[1]，山崎秀司[1]，野田尚宏[2]，関口勇地[2]，下村有美[3]，早津雅仁[3]，高畑　陽[4]，山根久和，野尻秀昭（東大・生物工学セ，[1]NITE，[2]産総研，[3]農環研，[4]大成建設）

4C02a04　*Xanthobacter autotrophicus* による好気的ジクロロメタン分解条件の検討
9:33 ◦細田晃文，竹内一貴，堀田雄大，田村廣人（名城大・農）

4C02a05　*Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の芳香族環境汚染物質分解に関わる内在性プラスミドの重要性
9:44 ◦上村真央，前川睦乃，奥野将司，小田佳孝，松村吉信[1]（関西大・化学生命工，[1]関西大・ORDIST）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4C02a06　Burkholdelia sp. KU-46 株の 2,4-ジニトロフェノール分解系遺伝子群の取得
10:05 ◦高田健吾，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大·化学生命工）

4C02a07　嫌気集積培養菌液における cis-DCE 分解および有機酸生成に及ぼす高濃度水素の影響
10:16 ◦宮村尚明，長谷川直美，相澤朋子，岩淵範之，安齋　寛[1]，砂入道夫，矢木修身[2]（日大生資科，[1]日大短生，[2]日大生産工）

4C02a08　ズッキーニによるダイオキシン類の取り込みに係わる遺伝子の同定
10:27 ◦乾　秀之[1,2,3]，廣田又士[2]，山崎清志[3]（[1]神戸大・遺伝子，[2]神戸大・農，[3]神戸大院・農）

4C02a09　塩素化ダイオキシン分解菌 *Geobacillus* sp. UZO3 株の機能解析
10:38 ◦鈴木悠造，中村雅哉[1]，大塚祐一郎[1]，川上健志[2]，佐藤かんな，梶田真也，菱山正二郎[1]，高橋　惇[2]，片山義博[3]（東農工大·BASE，[1]森林総研，[2]高砂熱学工業株式会社，[3]日大生資科·森資科）

4C02a10　セレン酸還元菌を用いた発電所排水中のセレン処理
10:49 ◦森田仁彦，庄司　仁，植本弘明（電中研）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

4C02a11　Al 耐性菌 *Pullulanibacillus* 属細菌 CA42 株の生産する Al 吸着性多糖の機能・構造
11:10 ◦佐藤准貴，相澤朋子，浦井　誠，砂入道夫（日大生資科·応生科）

4C02a12　芽胞形成水銀還元細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株を用いた固定化微生物による無機水銀溶液からの水銀除去と回収
11:21 ◦簡　梅芳，今野純平，宮内啓介，遠藤銀朗（東北学院大·工）

4C02a13　高い重金属吸着能を有する環境由来菌の単離
11:32 ◦伊東達郎，森　美穂，坂上吉一（近畿大院・農）

4C02a14　コーヒー抽出滓を用いたキノコ栽培について
11:43 ◦渡邉　悟[1,2]，髙橋智美[3]，中村友幸[3]，藤井繁佳[4]（[1]東京聖栄大，[2](社)食医同源之会，[3](株)ハイファ研究所，[4]味の素ゼネラルフーヅ(株)）

B03 会場　午前の部（9:00〜11:43）

環境—バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオリファイナリー—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4B03a01　*Candida guilliermondii* の *CGUG_05859* がコードするグルコース耐性キシローストランスポーターの性質
9:00　◦大西裕子[1]，　井筒千賀[1]，　小笠勇馬[2,1]，　香村彰利[2,1]，入江祐司[1]，北田雄祐[1]，古道紗斗里[1]，鈴木秀之[1]（[1]京都工繊大院・工科・応生，[2]京大院・生命・統生）

4B03a02　エタノール発酵性大腸菌 KO11 株の *pstG* 遺伝子と *manXYZ* オペロンを破壊した菌株の発酵特性
9:11　◦太田一良，浜砂裕則，塚本淳二，脇山元気，泉　可也[1]，原田佳子[1]（宮崎大農・応生科，[1]BITS）

4B03a03　ユビキチン欠損 *Saccharomyces cerevisiae* 変異株による D-乳酸からのエタノール生産
9:22　◦若松　誠，田口久貴，木田建次[1]，赤松　隆（崇城大，[1]熊大）

4B03a04　エタノール生産性 *Sphingomonas* sp. A1 株によるアルギン酸からのバイオエタノール生産過程
9:33　◦藤井麻理，柳澤満則，河井重幸，村田幸作（京大院農・食品生物）

4B03a05　出芽酵母のマンニトール資化能とフロキュレーション能の自然獲得
9:44　◦河井重幸，太田安里，柳澤満則，村田幸作（京大院農・食品生物）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4B03a06　ポリアミド 4 の生分解性制御
10:05　◦山野尚子，川崎典起，中山敦好（産技総研関西セ）

4B03a07　ブドウの枝・葉におけるポリフェノール類の分布
10:16　◦沼田大志，坂本正弘，北島　宣，東　順一（京大院農）

4B03a08　トウモロコシ果皮の化学的性質
10:27　◦吉田有希，坂本正弘，東　順一（京大・農）

4B03a09　リコンビナントキチナーゼ分泌大腸菌を用いた発酵法によるキチンの糖化
10:38　◦源　崇光[1]，　井坂恵理子[2]，　平野貴子[2]，　袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）

4B03a10　好熱菌発酵産物による脱窒過程の DGGE 解析
10:49　◦石川一人，宮本浩邦[1]，井藤俊行[2]，児玉浩明（千葉大･院，[1]日環科学，[2]京葉プラント）

a11〜a13 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

4B03a11　米糠からの高純度タンパク質・リンの連続回収
11:10　◦渡辺昌規，千原　尚，佐々野和雄[1]（広国院大院工・物質工，[1](株)食協）

4B03a12　合成ガス資化性好熱性細菌 Moorella thermoacetica の遺伝子組換えマーカー遺伝子の探索
11:21　◦岩崎祐樹，喜多晃久[1]，酒井伸介[2]，矢野伸一[1]，村上克治[1]，高岡一栄[2]，田島誉久，加藤純一，中島田豊（広島大院先端物質・分子生命，[1]産総研･バイオマス研セ，[2]三井造船･千葉技術開発セ）

4B03a13　Meta-fermentation : novel method for pure chemical production using of open-mixed culture system
11:32　◦Pramod Poudel，Hiroko Matsumoto，Yuki Okugawa，Hirokuni Miyamoto[1]，Kenji Sakai（Grad Sch. Biores. & Bioenvironl. Sci. Kyushu University，[1]Japan Eco-Science, Co. Ltd.）

A04 会場　午前の部（9:00〜11:00）

有機—天然物 – 単離構造決定 – 植物—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4A04a01　Melaleuca leucadendra からの testosterone 5α-reductase 阻害物質の探索
9:00　◦伊秩誠志, Maria Dewi P. T. Gunawan Puteri, 加藤英介, 川端　潤（北大院農）

4A04a02　シマホオズキ果実抽出物のシワ改善作用
9:11　◦土田克彦, 末次一博, 成田美穂, 森田哲史（ナリス化粧品）

4A04a03　ペルー産キク科植物 2 種に含まれる HL-60 増殖抑制物質の探索
9:22　◦佐藤　綾，　田邊章仁[1]，　常盤野哲生[1]，　北山雅彦[2]，ブリセーニョアルベルト[3]，川井　悟[4]，吉澤結子[1]（秋田県大生資科，[1]秋田県大，[2]京都工繊大遺伝資源，[3]Univ. Catolica de Santa Maria，[4]東電大理工）

4A04a04　ウルシ科植物カイノキの成分研究(3)
9:33　◦稲田　昭，大島千佳，沖出宏美，稲冨由香，邑田裕子，徳田春邦[1]，鈴木信孝[1]（摂南大・薬，[1]金沢大・医）

4A04a05　オニシモツケ地上部からのリパーゼ阻害成分の単離・構造決定
9:44　◦加藤英介，山　理嗣，中込　亮[1]，柴田敏郎[2]，細川敬三[3]，川端　潤（北大院農，[1]北大農，[2]医薬基盤研・薬植セ，[3]兵庫大）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4A04a06　インドネシア産植物 *Eugenia polyantha* 中の膵リパーゼ阻害成分の単離，構造決定
10:05　◦中込　亮，Maria Dewi P.T. Gunawan Puteri[1]，加藤英介[1]，川端　潤[1]（北大農，[1]北大院農）

4A04a07　Search for potential maltase inhibitors from Indonesian herbs
10:16　◦Ines Septi Arsiningtyas，Miyuki Shimada，Maria Dewi P.T. Gunawan Puteri，Eisuke Kato，Jun Kawabata（Graduate School of Agriculture, Hokkaido University）

4A04a08　熱ショックタンパク質誘導活性を有する新規化合物の単離及び構造決定
10:27　◦伊藤知洋，松浦英幸[1]，三浦健人，藤井　創（株式会社アミノアップ化学，[1]北大院農・応生科）

4A04a09　褐藻クロメ *Ecklonia kurome* の新規フロロタンニンの単離・構造決定と抗酸化活性
10:38　近藤左和子，林　宜瑾，豊原治彦[1]，伊藤久富[2]，内田隆史，◦山下まり（東北大・院農，[1]京大・院農，[2]長瀬産業）

4A04a10　マウス精子のハイパーアクチベーション様運動を誘導する植物成分の探索
10:49　◦荒舘　忠，谷井一郎，小宮　顕[1]（富山大・医生物，[1]富山大・医・泌尿器）

A05 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機—天然物 – ケミカルバイオロジー，作用機構—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4A05a01　アネトールが示す相乗的抗真菌作用は薬剤耐性機構の抑制を介して発揮される
9:00　石倉昂幸，城野由衣，山口大輔，荻田　亮[1]，◦藤田憲一，田中俊雄（阪市大院･理，[1]阪市大･都市健康･スポーツ研究センター）

4A05a02　ハイグロマイシン B とポリミキシン B の相乗的殺真菌作用
9:11　◦油谷雅広[1]，荻田　亮[1,2]，藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院･理，[2]阪市大・健康研セ）

4A05a03　出芽酵母に対してジヒドロフェニルアラニンはアポトーシス様細胞死を誘導する
9:22　◦中尾有里[1]，荻田　亮[1,2]，藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院･

理，[2]阪市大・健康研セ）

4A05a04　N-methyl-N"-dodecylguanidine によって増幅される amphotericin B の真菌液胞膜障害作用-蛍光標識誘導体を用いる細胞内動態の可視化-

9:33　°姜　昌慶[1]，　山田圭一[2]，　油谷雅広[1]，　臼杵克之助[1]，荻田　亮[1,3]，藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院･理，[2]群馬大院･工，[3]阪市大・健康研セ）

4A05a05　イソプレノイド誘導体 1-geranylgeranylpyridinium (GGPy)の抗真菌活性における標的タンパク質 の同定と解析

9:44　°幸慎太郎[1]，　臼杵克之助[1]，　荻田　亮[1,2]，　藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院・理，[2]阪市大・健康研セ）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4A05a06　M 期特異的キネシン(KSP)阻害剤 Terpendole E 類の作用機構解析

10:05　°知念拓実，樽井弓佳，南雲陽子，矢島潤一郎[1]，本山高幸[2]，長田裕之[2]，臼井健郎（筑波大院・生命環境，[1]東大院・総合文化，[2]理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

4A05a07　FD-891 のアクチンへの作用機構解析

10:16　°竹内美穂，仙波由行[1]，工藤史貴[2]，江口　正[3]，溝上一敏[4]，片岡孝夫[5]，臼井健郎（筑波大院・生命環境，[1]筑波大・生命環境，[2]東工大院理工・化学，[3]東工大院理工・物質科学，[4]大正製薬，[5]京工繊大院・応生）

4A05a08　真菌を用いたクロラムフェニコールの新規作用点の探索

10:27　°西脇綾香，後藤麻紀子，鎌倉高志（東理大院理工･応生科）

4A05a09　真菌を用いたロキシスロマイシンの新規作用点の探索

10:38　°熊坂茉佑，石井　晶，小泉優希，各務佑哉，鎌倉高志（東理大・理工）

4A05a10　トリコテセン生産阻害物質 precocene II の作用機構に関する研究

10:49　°坂本直子，吉成知也[1]，露木利枝，長澤寛道，作田庄平（東大院・農生科・応生化，[1]国立衛研）

a11～a15 発表者の接続時間③ 11:00～11:10

4A05a11　骨代謝細胞の分化に対する月桃由来化合物の作用

11:10　°夏目矩行[1]，　長谷川森一[1]，　米澤貴之[2]，　車　炳允[1,2]，中川　大[1,2]，照屋俊明[2]，永井和夫[2]，禹　済泰[1,2]（[1]中部大学応用生物学部，[2]中部大学 生物機能開発研究所）

4A05a12　シトクロム *c*-カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ活性発現の分子機構

11:21　°新林良太，安部真人，三芳秀人（京大院農・応用生命）

4A05a13　ユビキノンプローブの創製と出芽酵母におけるユビキノン結合性タンパク質のスクリーニング

11:32　°工藤佐和子，村井正俊，矢崎一史[1]，三芳秀人（京大院農･応用生命，[1]京大・生存研）

4A05a14　T7 ファージディスプレイ法を用いた新規ドキソルビシン結合タンパク質の同定

11:43　°草柳友恵[1,2]，　高草木洋一[3]，　倉持幸司[4]，　紙透伸治[3]，小林　進[5]，　坂口謙吾[3]，　菅原二三男[3]（[1] 東理大院理工･応生科，[2]JSPS 特別研究員 DC，[3]東理大理工，[4]京府大院･生命環境，[5]東理大薬）

4A05a15　新規タモキシフェン類縁体リダイフェン B 結合タンパク質の探索

11:54　°九十田千子，　紙透伸治[1]，　池北雅彦[1]，　椎名　勇[2]，菅原二三男[1]（東理大院理工・応生科，[1]東理大理工・応生，[2]東理大理・応化）

A06 会場　午前の部（9:00～12:05）

有機―その他―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4A06a01　新規タデ藍抽出物の病原性真菌 Malassezia furfur に対する抗真菌活性

9:00　°山下健太郎，草刈　剛，繁田泰民，山本和司，長内理大[1]，中根明夫[1]，北原晴男[1]，花田勝美[1]（サンスター，[1]弘前大）

4A06a02　ヤチヤナギの芳香成分と機能性に関する研究

9:11　°中田真悠子，妙田貴生，脇田陽一[1]，戸枝一喜，藤森　嶺，西澤　信（東農大生物産業・食香，[1]北海道立総合研究機構）

4A06a03　ミツバチの行動学的観察と化学分析による韓国済州島産プロポリスの起源植物の同定

9:22　°下村幸佑，杉山靖正[1]，安　木蓮[2]，中村　純[3]，熊澤茂則（静岡県大院・生活健康，[1]鹿児島大・水産，[2]韓国東亜大・食栄，[3]玉川大・ミツバチ科学研究センター）

4A06a04　オウレン(*Coptis japonica* Makino)根茎由来精油の生理活性について

9:33　°西本有貴，岡田芳治，野村正人（近畿大院・シス工）

4A06a05　フェノールカルボン酸類のラジカル消去機構(32)―プロトカテキュ酸の酸化によるナフタレン骨格形成反応―

9:44　°武田直樹，上杉信太郎[1]，加藤英介[1]，川端　潤[1]（北大農，[1]北大院農）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4A06a06　香気性光学活性テトラヒドロゼルンボンの効率的合成

10:05　°斉藤あゆみ，太田佐昌，北山　隆（近畿大院農バイオ）

4A06a07　中員環骨格をもつ光学活性アレンゼルンボンの合成

10:16　°亀尾昌樹，斉藤あゆみ，萩原敏春[1]，河合　靖[2]，北山　隆（近畿大院農バイオ，[1]近畿大農バイオ，[2]長浜バイオ）

4A06a08　ジンゲロンおよびラズベリーケトン誘導体の合成とその生理活性

10:27　°礒森幸子，関本杏奈[1]，中村　薫[2]，北山　隆（近畿大院農バイオ，[1]近畿大農バイオ，[2]神戸大院環境）

4A06a09　ロドデンドロール配糖体の化学合成と生理活性評価

10:38　°岩舘丈央，柏倉　裕[1]，二瓶賢一（宇都宮大農･生物生産，[1]フジグリーン）

4A06a10　天然ビベンジル構造を基盤としたチロシナーゼ阻害剤の分子設計

10:49　°大貫沙弥香，二瓶賢一（宇都宮大農・生物生産）

a11～a15 発表者の接続時間③ 11:00～11:10

4A06a11　抗真菌性シクロデプシペプチド，W493 A の合成研究

11:10　°太田裕太郎，附田勇也，高森啓介，二瓶賢一（宇都宮大農・生物生産）

4A06a12　シコニンの紫外線保護効果における作用機構の特徴

11:21　°伊藤由加里，若生　豊（八戸工大院機械・生化工）

4A06a13　キノロン関連化合物の合成とその生物活性

11:32　°丸山尚見，川井　悟，常盤野哲生[1]，中澤伸重[1]，吉澤結子[1]（東電大理工，[1]秋田県大生資科）

4A06a14　フラボノイド関連化合物の合成とノックアウト酵母に対する増殖抑制効果

11:43　°田島知子，川井　悟，常盤野哲生[1]，中澤伸重[1]，吉澤結子[1]（東電大院理工・生命理，[1]秋田県大生資科・応生科）

4A06a15　スチルベノイドの合成と遺伝子破壊出芽酵母に対する影響

11:54　°倉持晴樹，潮見あずさ，山本夕貴，川井　悟，常盤野哲生[1]，中澤伸重[1]，吉澤結子[1]（東電大理工，[1]秋田県大生資科）

A07 会場　午前の部（9:00～11:11）

有機―医薬―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4A07a01　抗菌ペプチド「アピデシン」の可変領域への変異導入とその抗菌活性への影響

9:00　°三宅政裕，岩村雄太，松本謙一郎，橋本茂樹[1]，大井俊彦，田口精一（北大院・工・生機高，[1]東理大・基礎工）

4A07a02　セリン構造を利用した SARS 3CL protease 阻害剤の合成と評価

9:11　°高沼大樹，石井　学，赤路健一[1]，今野博行（山形大院理工・バイオ化学，[1]京都薬大）

4A07a03　ミコフェノール酸 6' 位誘導体化による新規 HDAC 阻害剤開発の検討
9:22　◦春原和宏，重冨顕吾，三橋進也，生方　信（北大院農）
4A07a04　アスパラギン合成酵素の新規阻害剤の創製ーガン化学療法への新展開ー
9:33　◦池内秀幸, Ahn Yong-Mo[1], 音川拓哉, 渡辺文太, 平竹　潤, Richards Nigel.G.J[1]（京大化研，[1]フロリダ大学）
4A07a05　抗腫瘍活性分子 Nitidine の光照射による活性増大
9:44　◦岩崎公典，屋　宏典（琉大・熱生研）

a06〜a11 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4A07a06　アミノピリジンを用いた非ペプチド性低分子 BACE1 阻害剤の設計と合成
10:05　◦齋藤悠冴，青木英郎，遠藤　仁，赤路健一[1]，三城　明[2]，今野博行（山形大院理工，[1]京都薬大，[2]プロテインウェーブ）
4A07a07　非ステロイド性抗炎症薬のプロドラッグ化修飾と皮膚透過性の評価
10:16　◦森　亮貴，柴田将義，守金大蔵[1]，高橋秀久[2]，稲垣　穣（三重大院生資，[1]ダイヤ製薬(株)，[2]ATM(株)）
4A07a08　基質ポケット近傍の相互作用を利用したデオキシノジリマイシン型アミラーゼ阻害剤の合成と活性
10:27　◦野澤裕介，山田有二，加藤英介[1]，川端　潤[1]（北大農，[1]北大院農）
4A07a09　甘草エキス薬効評価のためのメタボローム解析の活用
10:38　◦原田和生，小田知佳，平田收正（阪大院・薬）
4A07a10　トリグリセリドを模倣したポリフェノールエステル誘導体の合成とリパーゼ阻害活性
10:49　◦米本龍太，加藤英介[1]，川端　潤[1]（北大農，[1]北大農院）
4A07a11　希少糖とそれらの脂肪酸エステル誘導体の抗線虫活性
11:00　◦砂古口博文，川浪康弘，何森　健[1]，佐藤正資（香川大・農，[1]香川大・希少糖研究セ）

A08 会場　午前の部（9:00〜12:05）

生体高分子—タンパク質，多糖質，脂質，その他—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4A08a01　卵白リゾチーム由来抗菌ペプチドに関する研究
9:00　◦荒木朋洋，　岡本　大，　秋草憲弥[1]，　青木秀男[1]，ソンポンタマシリラク[2]（東海大・農，[1]ドーモコーポレーション，[2]コンケン大・理）
4A08a02　アネキシン A4 の Ca2+ と pH による機能調節メカニズムにはカルシウム結合サイトが関与する
9:11　◦三ッ橋象平[1]，　佛下康平[1]，　三宅奈菜[1]，　今関はる奈[1]，川島　麗[2]，福岡伸一[1]，阿部文快[1,3]（[1]青山学院大・理工，[2]北里大・医療，[3]海洋研究開発機構）
4A08a03　醸造発酵粕からの天然ヒト型セラミドの分析
9:22　◦柚木恵太（(株)ジェヌイン R＆D）
4A08a04　β-グルコシルセラミドによる腫瘍転移抑制
9:33　◦稲福征志，屋　宏典（琉球大・熱生研）
4A08a05　脂肪酸分析による化学合成生態系の解明：Lucinidae 科二枚貝 Mesolinga soliditesta の脂肪酸組成
9:44　◦齋藤洋昭，村田昌一（中央水産研）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4A08a06　リノール酸酸化を指標とした食品機能成分の抗酸化評価法
10:05　◦木村ふみ子，　Zheng Tie-song[1]，　周　秀瑩，　高橋寛基，西内美香，宮澤陽夫（東北大院・農・機能分子，[1]南京師範大学）
4A08a07　リン脂質ヒドロペルオキシドによる血管新生の亢進：動脈硬化への関与分子機構
10:16　◦仲川清隆，齊藤達弥，加藤俊治，宮澤陽夫（東北大院農・機能分子解析学）
4A08a08　アスタキサンチン摂取時の中高齢者の血中カロテノイド組成と抗過酸化脂質機能
10:27　◦宮澤大樹，仲川清隆，佐藤　朗[1]，木村ふみ子，宮澤陽夫（東北大院・農・機能分子解析学，[1]ヤマハ発動機）
4A08a09　Tocotrienol attenuates triglyceride accumulation via multiple lipogenic genes signaling regulation in animal and cell culture studies
10:38　◦Gregor Burdeos，Kiyotaka Nakagawa，Fumiko Kimura，Teruo Miyazawa（Grad. Sch. Agr. Sci. Tohoku Univ.）
4A08a10　LC-MS/MS によるヒト血中 PCOOH 分子種の高感度定量分析
10:49　◦加藤俊治，仲川清隆，宮澤陽夫（東北大院農・機能分子解析）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

4A08a11　アミロース・脂質複合体の水酸化カルシウム処理・炭酸ガス中和処理時における構造変化
11:10　◦松木順子，城間　力，池　正和，徳安　健（農研機構・食総研）
4A08a12　酢酸菌の種々の培養条件におけるセルロース及び水溶性多糖の生産
11:21　◦小竹宏美，水野正浩，渡辺博哉[1]，野﨑功一，天野良彦（信州大院工・物質工，[1]内堀醸造(株)）
4A08a13　*Thiothrix nivea* 由来の β-1,4 グルコサミノグルカンの高次構造
11:32　◦近藤敬子，澄川愛美，武田　穣，小泉淳一，上田一義（横国大院・工）
4A08a14　ミズナ種子由来粘性物質の性質
11:43　◦喜多由香, 坂本正弘, 東　順一（京大院農・地域環境科学）
4A08a15　キチン 6 及び 7 糖の選択的合成とその自己組織化の解明
11:54　◦道下宏祐，服部武史[1]，Aditya Kulkarni，尾形　慎[1]，碓氷泰市[1]（静大院農，[1]静大院・創科技）

C09 会場　午前の部（9:00〜12:05）

酵素—タンパク質・ペプチド，代謝関連酵素—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4C09a01　サーモライシンの N 末端ドメインへの部位特異的変異導入が熱安定性に与える効果
9:00　◦川崎雄一，保川　清，井上國世（京大院・農）
4C09a02　サーモライシンの C 末端領域への部位特異的変異導入が酵素活性および安定性に及ぼす影響
9:11　中田博己，◦兒島憲二，井上國世（京大院・農）
4C09a03　Interaction of 8-anilinonaphtalene 1-sulfonate (ANS) and human matrix metalloproteinase 7 (MMP-7) as examined by MMP-7 activity and ANS fluorescence
9:22　◦VIMBAI SAMUKANGE，　Kiyoshi Yasukawa，Kuniyo Inouye（Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.）
4C09a04　Coniochaeta sp. NISL9330 由来 Fructosyl peptide oxidase の基質特異性の改変
9:33　◦一柳　敦，五味恵子，中津　亨[1]，加藤博章[1]（キッコーマン・研本，[1]京大院・薬）
4C09a05　エタノールアミン型リン脂質の γ-セクレターゼの *in vitro* 活性への影響
9:44　◦小野寺智子，　佐々木広美[1]，　二井勇人[1]，　内田隆史[1]，神尾好是[2]，金子　淳（東北大院農・生物産業創成，[1]東北大院農・応生科，[2]山形大院・理工）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4C09a06　枯草菌からの GABA 代謝の転写制御因子である GabR の X 線結晶構造解析
10:05　◦川嶋　進，加藤志郎[1]，白木俊介[1]，奥田啓太[1]，深田はるみ[2]，伊藤智和[1]，邊見　久[1]，吉村　徹[1]，後藤　勝（東邦大院・理，[1]名大院・生命農，[2]阪府大院・生命環境）
4C09a07　ウド(*Aralia cordata*)由来レニン阻害物質の精製と同定

10:16 ○高橋砂織，常盤野哲生[1]，畠　恵司，佐藤(保刈)美佳，吉澤結子[1]，後藤　猛[2]（秋田県総合食品研究センター，[1]秋田県立大学・生物資源，[2]秋田大学大学院・工学資源）

4C09a08　レニン阻害活性を強化した味噌の開発

10:27 ○渡辺隆幸，佐々木康子，高橋砂織（秋田県総食研）

4C09a09　アンギオテンシン I 変換酵素およびカルボキシペプチダーゼ Y の新規蛍光消光基質の開発

10:38 高橋砂織，小野洋輝[1]，○後藤　猛[1]，熊谷(芳澤)久美子[2]，杉山俊博[3]（秋田県総食研セ，[1]秋田大院・工資，[2](株）ペプチド研，[3]秋田大院・医）

4C09a10　サルナシ果実システインプロテアーゼの酸で誘起される変性について

10:49 木股浩貴, 中根裕子, 水野　仁[1], 鈴木淳巨[1], ○杉山康雄（名大・遺伝子，[1]名大院・工）

a11～a15 発表者の接続時間③ 11:00～11:10

4C09a11　パパイヤ抽出液における微弱な L/D-ペプチドイソメラーゼ活性の検出

11:10 ○荒川健佑[1,2]，　Jennifer M. S. Koh[1]，　Ben Crossett[1]，Allan M. Torres[3]，Philip W. Kuchel[1,4]（[1]シドニー大，[2]岡山大院自科，[3]西シドニー大，[4]シンガポール科技研 SBIC）

4C09a12　放線菌由来 D-アミノペプチダーゼ：ペプチド結合形成反応におけるアシル受容体認識

11:21 ○下根可奈，森　信寛，永野真吾[1]，有馬二朗（鳥取大農・生資環，[1]鳥取大院・工）

4C09a13　放線菌由来 D-アミノペプチダーゼ：アシル供与体認識に関わる残基の同定と機能改変

11:32 ○有馬二朗，橋崎泰明，森　信寛（鳥取大農・生資環）

4C09a14　DL-配列を有するペプチド類の酵素合成と抗菌性ペプチド類の同定

11:43 ○磯田佳孝，森　信寛[1]，有馬二朗[1]（鳥取大院・農学，[1]鳥取大農・生資環）

4C09a15　好熱性細菌 *Thermus* sp. O-3-1 由来耐熱性アミダーゼの特性解析

11:54 ○小林史明，青峰弘起，大滝　証[1]，尾高雅文[1]，養王田正文[1]，水無　渉[2]，湯不二夫[2]，田村　隆，稲垣賢二（岡山大院･自然科学，[1]東京農工大院・工，[2]三菱レイヨン株式会社）

C10 会場　午前の部（9:00～12:05）

酵素—糖質代謝関連酵素—，—その他—

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4C10a01　ジャンボタニシ由来リゾチームの精製および構造解析

9:00 ○吉村愛美，中島智史，荒木朋洋（東海大・農）

4C10a02　ニワトリ型リゾチームの構造と機能に対する触媒基 Asp52 が形成する水素結合ネットワークに関与する Asp48 の役割

9:11 ○川口裕也，河村俊介，米田一成，鳥潟隆雄，荒木朋洋（東海大・農）

4C10a03　リゾチーム遷移状態アナログ阻害剤の設計と加水分解メカニズムの解明

9:22 ○鈴木亜日里，尾形　慎[1]，梅本尚之[2]，大沼貴之[2]，深溝　慶[2]，碓氷泰市[1]（静岡大農・応生化，[1]静岡大・創科技，[2]近畿大院農・バイオ）

4C10a04　固定化セロビオース 2-エピメラーゼによるエピラクトースの合成

9:33 佐藤央基，○佐分利亘，小島晃代[1]，田口秀典，森　春英，松井博和（北大院農・応生科，[1]日食化工）

4C10a05　Penicillium chrysogenum 由来 3 種の β-ガラクトシダーゼの反応特性解析

9:44 ○西村勇一，笠井尚哉，阪本龍司（大阪府立大院・生環科）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4C10a06　ヒト関連細菌由来グリコサミノグリカン分解遺伝子クラスターにおけるヘパラン硫酸リアーゼ

10:05 ○橋本　渉，丸山如江，中道優介，村田幸作（京大院･農）

4C10a07　グリコサミノグリカン分解に関わる細菌由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼの基質認識機構

10:16 ○中道優介，丸山如江，橋本　渉，村田幸作（京大院･農）

4C10a08　酸性多糖の代謝に関わる細菌由来 α-ケト酸還元酵素の X 線結晶構造解析

10:27 ○高瀬隆一, 三上文三，橋本　渉，村田幸作（京大院・農）

4C10a09　好酸好熱性古細菌 Sulfolobus tokodaii 由来のグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の機能解析

10:38 ○伊藤史晃，知識秀祐，中村周吾，清水謙多郎，伏信進矢，若木高善（東京大学大学院農学生 命科学研究科応用生命工学専攻）

4C10a10　超好熱始原菌(古細菌)由来 glycerol kinase の構造と機能

10:49 ○古賀雄一, 外尾竜太, 勝見亮太, 高野和文[1], 金谷茂則（阪大院・工，[1]京府大院・生命環境研）

a11～a15 発表者の接続時間③ 11:00～11:10

4C10a11　新規な 4-ケトアルドペントース及び 4-ケトペント酸の生成と新規な膜酵素

11:10 ○足立収生，Roque A. Hours[1]，品川恵美子[2]，赤壁善彦，薬師寿治，松下一信（山口大・農，[1]CINDEFI・UNLP，[2]宇部高専・物質工学）

4C10a12　古細菌 FBP アルドラーゼ/ホスファターゼの二機能性

11:21 伏信進矢, 西増弘志[1], 服部大紀, 宋　賢珍, ○若木高善（東京大学・院農生科，[1]東京大学・院理）

4C10a13　糖環開環機構の解明を目指した *Pseudomonas stutzeri* 由来 L-ラムノースイソメラーゼ変異酵素の構造解析

11:32 ○吉田裕美，寺岡美沙，何森　健[1]，神鳥成弘（香川大・総合生命研究セ，[1]香川大・希少糖研究セ）

4C10a14　Metal ion activation of inorganic pyrophosphatase from Antarctic psychrotrophatase *Shewanella sp* . AS-11

11:43 ○Ginting Elvy Like[1,2]，Chihiro Maeganeku[1]，Hiroyuki Motoshima[1]，Keiichi Watanabe[1,2]（[1]Saga Univ., [2]Kagoshima Univ.）

4C10a15　*Luteolibacter algae* H18 株によるオキナワモズク由来フコイダンの脱アセチル化を伴う酵素的分解

11:54 ○大城　隆，原田尚美[1]，小林泰明[1]，三木康成[2]，川本仁志[2]（鳥取大工・生応工，[1]鳥取大工・生応，[2]海産物のきむらや）

J11 会場　午前の部（9:00～11:32）

食品—生理機能 – その他—

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4J11a01　イメージングマススペクトロメトリーによる農作物の機能性食品成分の局在解析

9:00 ○財満信宏，吉村征浩，森山達哉，河村幸雄（近畿大・農）

4J11a02　IMS 解析が明らかにするアントシアニンの分子種による組織内局在の違い

9:11 ○吉村征浩，財満信宏，森山達哉，河村幸雄（近畿大・農）

4J11a03　IMS によるプエラリンの体内動態解析

9:22 ○山本彩実，財満信宏，吉村征浩，田中照佳，森山達哉，河村幸雄（近畿大・農）

4J11a04　経口摂取プエラリンのマウス骨吸収抑制作用と大腿骨への移行

9:33 ○田中照佳，吉村征浩，道原成和，山本彩実，財満信宏，森山達哉，河村幸雄（近大院農・応生化）

4J11a05　LC-MS/MS を用いた SIRT1 活性測定法の開発

9:44 ○富岡三貴，伴野　勧，三好規之，大島寛史（静岡県大・食品栄養）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4J11a06　四重極・飛行時間型質量分析計を用いたプロシアニジン類のラット尿中代謝物の解析

10:05 ○庄司俊彦，三浦富智[1]，石川(高野)祐子[2]，葛西宏介[1]，後藤真生[2]，神田智正[3]，中島翔平[3]，尾崎嘉彦（農研機構・果樹研，[1]弘前大院・保健，[2]農研機構・食総研，[3]アサヒビールHD）

4J11a07　低酸素下における共役リノール酸の抗ガン作用機構の解明

10:16 ○長友　琢，松山哲也，池保有理，加藤恵美子，西山　慧，山崎正夫，西山和夫（宮崎大・農）

4J11a08　ラット体内におけるフェニルプロパノイド単量体のマンマリアンリグナンへの変換

10:27 ○橋本　薫，八神祐絵，堀尾文彦，小林美里，松下泰幸，今井貴規，福島和彦（名大院生命農）

4J11a09　シクロデキストリンを用いたブラジル産プロポリスの生体利用率の改善

10:38 ○成田幸夫, 市原賢二（アピ(株)･長良川リサーチセンター）

4J11a10　ハマナス抽出液の抗糖化作用

10:49 ○中井大助，伊賀和宏（三省製薬）

a11～a12 発表者の接続時間③ 11:00～11:10

4J11a11　次世代シークエンサーを用いた SuperSAGE 法による食品機能解析

11:10 ○山田秀俊，菊地明香，大城恵利子，吉田健太郎，矢野　明（生工研）

4J11a12　トマトによる運動疲労軽減効果について

11:21 ○向田　恵，吉田和敬，佐藤英介[1]，稲熊隆博（カゴメ総研，[1]鈴鹿医大・薬）

J12 会場　午前の部（9:00～11:11）

食品―食品化学 – タンパク質，アミノ酸―，―生理機能 – 免疫，神経，内分泌―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4J12a01　大腸菌をモデル生物としたヒト腸内ポリアミン濃度を調節する手法の確立

9:00 ○坂井友美[1]，栗原　新[2,1]，松本光晴[3]，木邊量子[4]，辨野義己[4]，鈴木秀之[1]（[1]京工繊大院・応用生物，[2]京大院・生命科学，[3]協同乳業・研究所・技術開発，[4]理化学研究所・辨野研）

4J12a02　膵腺房細胞におけるロイシンとアルギニンが惹起する翻訳調節因子 4EBP1 と S6K1 リン酸化の上流を探る

9:11 ○河崎さほり，原　　博（北大院・農）

4J12a03　高リン食摂取ラット腎臓の遺伝子発現に対するホエイタンパク質の影響

9:22 ○林ちひろ[1]，石島智子[1]，阿部啓子[1,2]，中井雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]KAST）

4J12a04　特殊な組成のアミノ酸サプリメントを経口投与したマウスの肝臓遺伝子発現プロファイリング

9:33 ○篠崎文夏，亀井飛鳥，渡部由貴，荒井綜一[1]，熊谷弘太[2]，阿部　岳[3]，阿部啓子[4]（KAST，[1]東農大・総研，[2]協和発酵バイオ，[3]Hornet Research Center，[4]東大院農生科・応生化）

4J12a05　シナモンによる IGF-I シグナルの活性化を介した皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン産生促進作用

9:44 内藤健太郎，高棹直子[1]，石倉聖子，田村　梓，○赤川　貢[1]（(株)ディーエイチシー，[1]阪府大院・生命環境）

a06～a11 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4J12a06　セサミン，エピセサミン及びそれらのカテコール誘導体の Aβ アミロイド線維形成抑制効果

10:05 ○小川紘史，片山　茂，中村宗一郎（信州大農・応生科）

4J12a07　食品機能成分のリンパ管新生抑制作用

10:16 ○立石能子，庄屋雄二，安保千尋[1]，柴田紗知[1]，古澤修一，松原主典[1]，松田治男（広島大院・生物圏，[1]広島大院･教育）

4J12a08　木田チリメンシソから単離したガラクトグリセロ脂質は食細胞において O2－および NO の産生を阻害する

10:27 ○高橋正和，杉山友太，高橋　有，川畑球一，村上　明[1]，入江一浩[1]，久保義人[2]，小林恭一[2]，大東　肇（福井県大･生物資源，[1]京大院農・食生科，[2]福井県食品加工研）

4J12a09　トマト成分 lycopene による生体防御機構の活性化

10:38 ○大倉伸哉，大西康太，入江一浩，村上　明（京大院農・食生科）

4J12a10　歯周病原性菌由来バイオフィルムに対する鶏卵抗体の犬におけるオーラルケア効果

10:49 ○山下裕輔，石川卓哉，福山　登[1]，岡野顕子[2]，森　尚志[2]，金　武祚（(株)ファーマフーズ，[1](株)ダイワ，[2]ダクタリ動物病院京都病院）

4J12a11　S-アデノシルメチオニン(SAMe)含有清酒酵母の特性

11:00 ○関口喜則，坂部泰成，五十嵐庸[1]，長岡　功[1]（磐田化学工業(株)，[1]順大医　生化学・生体防御学）

J13 会場　午前の部（9:00～11:00）

食品―生理機能 – 消化，循環―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4J13a01　発酵発芽ソバの正常血圧ラットに対する降圧効果

9:00 湯澤瑤子，○橋口幸弥，小山正浩[1]，中村浩蔵（信州大院･農，[1]信州大院・総合工）

4J13a02　発酵発芽ソバが SHR の生体組織 ACE 活性に与える影響

9:11 ○小山正浩，服部成治[1]，加藤　舞[1]，中村浩蔵[1]（信州大院・総合工，[1]信州大院・農）

4J13a03　タイの発酵魚食品プラーラー中のレニン阻害活性物質

9:22 ○中原和彦，韮澤　悟，野田澤茜，ゲシニートラクーンティワコン[1]，ブルンチャイタンカナクン[1]，後藤　猛[2]，高橋砂織[3]（国際農研，[1]カセサート大学，[2]秋田大学・工学資源，[3]秋田県総食研セ）

4J13a04　クロマグロ皮たんぱく質経口摂取によるマウスの肝機能保護作用

9:33 ○高橋賢次，田中照佳，岩本直樹，阿川泰夫[1]，澤田好史[1]，吉村征浩，財満信宏，森山達哉，河村幸雄（近畿大院農･応生化，[1]近畿大学水産実験場）

4J13a05　新規の腹部大動脈瘤モデルラット作出と病理解析

9:44 ○毛利陽平，財満信宏，田中宏樹[1]，森山達哉，河村幸雄，海野直樹[1]，瀬藤光利[1]（近畿大・農，[1]浜松医大）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4J13a06　GABA 含有無塩味噌クッキーの調製とその血圧降下作用

10:05 ○八田　一，荘　咲子，上野義栄[1]（京女大・食物，[1]京都府中小企業技術セ）

4J13a07　高蛋白質そば粉抽出物の血糖上昇抑制作用

10:16 ○友竹浩之，柴本むつ美，新居佳孝[1]（飯田女子短大，[1]徳島県工技センター）

4J13a08　鶏コラーゲン加水分解物の摂取が食塩負荷 SHR の腎臓と血管細胞に与える影響

10:27 ○江草(雑賀)愛，國分由希，小熊敦之，西村敏英（日獣大応生）

4J13a09　血管内皮細胞における黒大豆ポリフェノールの NO 産生促進作用

10:38 ○難波文男，吉田　正，伊藤千秋，戸田登志也（フジッコ(株)）

4J13a10　海藻カロテノイドによる血管新生抑制作用の分子機構

10:49 Ganesan Ponesakki，松原主典[1]，○菅原達也，平田　孝（京大院農，[1]広島大院教育）

J14 会場　午前の部（9:00～10:49）

食品―食品化学 – 色素，香料―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4J14a01　バジル香気のトマトスープ風味への影響

9:00 ○田中唯菜，山本佳奈[1]，久保田紀久枝（お茶大院･ライフ，

[1]お茶大・食物）

4J14a02　苦味の少ないピーマン「こどもピーマン（品種名：ピー太郎）」とピーマンの苦味に関する研究

9:11　°恩田恵子[1]，中西　希[2]，森光康次郎[1,2]，久保田紀久枝[1,2]，六角啓一[3]（[1]お茶大・食物栄養，[2]お茶大院・ライフ，[3]タキイ種苗・研究農場）

4J14a03　ニンジン香気の苦味に与える影響

9:22　°松嶋みゆき，中野　優，久保田紀久枝（お茶大院ライフ）

4J14a04　クロモジ精油の抗炎症作用

9:33　°山崎真央, 片方陽太郎, 前多隼人（弘前大　農学生命科学）

4J14a05　小松菜に含まれるネオキサンチンによる脂肪細胞での脂質代謝調節作用

9:44　°前多隼人, 阿部美菜子, 工藤翔太, 片方陽太郎（弘前大学・農学生命科学）

a06～a09 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4J14a06　サツマイモ高カロテン品種「兼六」の干しいも加工品の成分と抗酸化性について

10:05　°岩崎由佳[1]，森光康次郎[1,2]，久保田紀久枝[1,2]，梅本英之[3]，渡部　舞[3]，池下洋一[3]（[1]お茶大・食物栄養，[2]お茶大院・ライフ，[3]石川農研セ）

4J14a07　ルテインに対するマウス肝臓の代謝活性

10:16　°長尾昭彦，眞岡孝至[1]，小竹英一，小野裕嗣，亀山眞由美（農研機構・食総研，[1]生産開発科学研）

4J14a08　デルフィニジンの廃用性筋萎縮抑制作用とその作用機序

10:27　°村田　希，高坂玲亜，栗原佳奈，山田耕路，立花宏文（九大院農院・生機科）

4J14a09　カテキンとアミノ酸の加熱反応により生成される黄色物質について

10:38　°野澤幸恵，神山紀子[1]，村田容常（お茶大院・ライフサイエンス，[1]農研機構・作物研）

J15 会場　午前の部（9:00～11:32）

食品―食品工学 – 保蔵，安全性―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4J15a01　味噌汁調理におけるフランの生成と濃度変化

9:00　°箭田浩士，亀山眞由美（農研機構・食総研）

4J15a02　Efficacy of Hydrogen on the Reduction of Met-myoglobin Formation in Tuna Flesh

9:11　°Pariya Thanatuksorn, Toru Suzuki[1], Shoichi Okouchi（Hoseidai, [1]Kaiyodai）

4J15a03　赤外および近赤外分光法による食用油脂の過酸化物価の測定

9:22　°山下まゆ美，岡本由希，飯渕貞明（和洋女大・生活科学）

4J15a04　凍結・融解を経たリモネン含有 O/W 型エマルションの安定性

9:33　°河野祐輔，日野原知行，渡邉義之，野村正人（近畿大院・システム工）

4J15a05　新規大豆アレルゲン PM30 のクローニングと変動解析

9:44　°末森祐輔，矢野えりか，吉村征宏，財満信宏，等々力節子[1]，森山達哉，河村幸雄（近畿大院・農，[1]食総研）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4J15a06　ウム試験を用いた食品化合物の変異原性評価

10:05　°森　大気，三木　悠[1]，松井悠紀[1]，室井康平[1]，後藤達志，今石浩正（神戸大・遺伝子セ，[1]神戸大・生機科）

4J15a07　SPR センサーによる食中毒細菌の一斉迅速検査法の開発

10:16　°張　暁光，北岡勇人，本城賢一[1]，宮本敬久[1]（九大院・生資環，[1]九大院・農院）

4J15a08　土壌および用水中に混入した大腸菌の生存性

10:27　°稲津康弘，大畑由紀子，川崎　晋（食総研）

4J15a09　微生物熱量計による食品の一般生菌数と大腸菌群数の推定

10:38　°宮地竜郎，細金玲那，鈴木大輔，村松良樹，藤村朱喜，中川純一（東京農大・生物産業）

4J15a10　抗菌ペプチドを用いたサルモネラ検出法の開発

10:49　°北條江里，大槻隆司，坂井ちひろ[1]，米北太郎，森下直樹，松本貴之，相沢智康[1]，森松文毅（日ハム・中研，[1]北大院生命・生命融合）

a11～a12 発表者の接続時間③ 11:00～11:10

4J15a11　抗菌ペプチドを利用したサルモネラ検出法における検出用プローブの検討

11:10　°坂井ちひろ，中住太一，北條江里[1]，菊川峰志，熊木康裕，神谷昌克，出村　誠，河野敬一，松本貴之[1]，相沢智康（北大院生命・生命融合，[1]日ハム・中研）

4J15a12　米抽出物によるボツリヌス菌の制御

11:21　°小長谷幸史，星野　純[1]，諸橋　克，関谷洋平，伊藤清尚，二瓶将太，浅田真一，頓所さやか，浦上　弘（新潟薬大，[1]越後製菓）

B18 会場　午前の部（9:00～12:05）

微生物―構造，オルガネラ，小胞，分泌―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4B18a01　The Role of the Unfolded Protein Response in Pancreatic β cells

9:00　°Yuichi Tsuchiya,　Michiko Saito,　Takao Iwawaki[1], Jun-ichi Miyazaki[2], Kazutoshi Mori[3], Kenji Kohno（Grad. Sch. of Biol. Sci., NAIST, [1]ASRLD Unit, Gunma Univ., [2]Grad. Sch. of Med. Osaka Univ., [3]Grad. Sci., Kyoto Univ.）

4B18a02　酵母における 2 通りの小胞体関連分解経路

9:11　興梠祐樹，　鶴永雄太，　°樋口健吾，　KAZI Mostafizur, 加藤昭夫，阿座上弘行（山口大・農）

4B18a03　出芽酵母のクロマチンリモデリング因子 RSC によるミトコンドリア制御機構の解明

9:22　°余　斐斐，今村優子，岡根　杏，湯川格史，土屋英子（広島大院先端物質）

4B18a04　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるミトコンドリアの新規プロリントランスポーターの探索

9:33　°西田郁久，戒能智宏，大津厳生，高木博史（奈良先端大・バイオ）

4B18a05　出芽酵母における分裂酵母液胞アミノ酸トランスポーター Fnx1 の機能発現

9:44　°真鍋邦男[1]，Soracom Chardwiriyapreecha[1]，河田美幸[2]，秋山浩一[2]，関藤孝之[1]，竹川　薫[3]，柿沼喜己[1,2]（[1]愛媛大・農，[2]愛媛大・INCS，[3]九大・農）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4B18a06　出芽酵母新規液胞アミノ酸トランスポーター遺伝子の同定

10:05　°森實大貴[1]，杉本直子[1]，本藤加奈[1]，河田美幸[2]，関藤孝之[1]，柿沼喜己[1,2]（[1]愛媛大・農，[2]愛媛大・INCS）

4B18a07　出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーター Avt1 は広い基質特異性を有する

10:16　°刀根潤一[1]，吉村鮎美[1]，河田美幸[2]，関藤孝之[1]，柿沼喜己[1,2]（[1]愛媛大・農，[2]愛媛大・INCS）

4B18a08　下面ビール酵母の培養中における細胞表層及び細胞内タンパク局在の観察

10:27　°朝田　圭，福田良一[1]，太田明徳[1]，佐藤雅英，執行達朗（サッポロビール・価値創造フロンティア研究所，[1]東京大学・大学院農学生命科学研究科）

4B18a09　出芽酵母の細胞壁多糖，β-1,6-グルカンの合成に必須の Kre6 が機能を発揮するには ER の複数のシャペロン様タンパク質の働きが必要である

10:38　°栗田朋和，野田陽一，依田幸司（東大院農生科・応生工）

4B18a10　糸状菌 *Aspergillus nidulans* における α-1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsB* 破壊株および *agsA, agsB* 二重破壊株を用いた *ags* 遺伝子群の機能解析

10:49　◦稲葉　梓，吉見　啓[1]，阿部敬悦（東北大院・生物産業創成，[1]東北大・未来研）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

4B18a11　麹菌のグルコース抑制遺伝子変異株におけるマルトースパーミアーゼのエンドサイトーシス

11:10　◦平本哲也，田中瑞己，新谷尚弘，五味勝也（東北大院農・生物産業創成）

4B18a12　麹菌 *A. oryzae* の微小管形成中心関連タンパク質 AoApsB の隔壁孔における機能

11:21　◦川畑絢平，矢萩大貴，丸山潤一，北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

4B18a13　麹菌の隔壁孔に局在する MAP キナーゼ AoFus3 と相互作用する新規タンパク質の機能解析

11:32　◦矢萩大貴，丸山潤一，Özgür Bayram[1]，Oliver Valerius[1]，Gerhard H. Braus[1]，北本勝ひこ（東大院農生科・応生工，[1]ゲッティンゲン大学）

4B18a14　麹菌 AoSO タンパク質のストレス応答性の凝集が隔壁孔に局在する機構の解析

11:43　◦佐伯　圭，ESCAÑO Cristopher Salazar[1]，丸山潤一，北本勝ひこ（東大院農生科・応生工，[1]BIOTECH-UPLB）

4B18a15　麹菌 *A. oryzae* の菌糸融合における菌核形成促進因子 SclR の過剰発現の効果

11:54　和田龍太，金　鋒傑[1]，小山泰二[1]，◦丸山潤一，北本勝ひこ（東大院農生科・応生工，[1]野田産研）

B19 会場　午前の部（9:00〜11:54）

微生物—遺伝子 – 構造，機能—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4B19a01　枯草菌 - 放線菌細胞融合による放線菌染色体への遺伝子の導入

9:00　◦松田卓也，板谷光泰[1]，片岡正和（信州大学大学院，[1]慶応義塾大学先端生命科学研究所）

4B19a02　枯草菌における納豆菌挿入配列の転移制御機構に関与する宿主因子の探索

9:11　◦明石基洋，茂木俊丞，大河内悠貴，高橋　究，千葉櫻拓，加田茂樹[1]，山上圭吾[1]，関根靖彦[2]，吉川博文（東京農大・バイオ，[1]ミツカン中研，[2]立教大学・理）

4B19a03　枯草菌の胞子形成過程に与える *rrn* オペロンコピー数の影響の解析

9:22　◦矢野晃一，和田哲也，鈴木祥太，川口康弘，七宮英晃[1]，関根靖彦，河村富士夫（立教大・理，[1]東大院農生科・応生工）

4B19a04　枯草菌べん毛モーター固定子におけるイオン流入経路に関与するアミノ酸残基の同定

9:33　◦古山琴美[1,2]，伊藤政博[1,2]（[1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・バイオナノ）

4B19a05　枯草菌べん毛モーターの固定子における荷電アミノ酸の役割

9:44　◦高橋優嘉[1,2]，伊藤政博[1,2]（[1]東洋大学院・生命科学，[2]東洋大・バイオナノ）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4B19a06　DNA 二重鎖切断部位の細胞核内での空間配置における SWR1 および INO80 クロマチンリモデリング複合体の役割

10:05　◦小西辰紀[1]，　尾間由佳子[2]，　若林一陽[2]，　中山景樹[2]，島田健士[3]，Susan Gasser[3]，原田昌彦[1,2]（[1]東北大・農，[2]東北大・院農，[3]Friedrich Miescher Institute）

4B19a07　遺伝子内でのドメイン配列移動（DoMo）：タンパク質の構造機能変換の新しい機構

10:16　古田芳一[1,2]，河合幹彦[1,2,3]，内山郁夫[3]，◦小林一三[1,2,4]（[1]東大・新領域，[2]東大・医科研，[3]基生研，[4]東大・理）

4B19a08　プロファージ SP β *nonA* 遺伝子による SP10 ファージ感染防御機構の解析

10:27　◦山本達也，Yee Lii Mien[1]，朝井　計[2]，中村幸治（筑波大院生命環境，[1]東大生物工学セ，[2]埼玉大院理工・分子生物）

4B19a09　乳酸菌由来ゲノム DNA の抗炎症作用機構に関する研究

10:38　◦平松征洋，佐藤朝光，入江圭一，椎村翔太，奥野隆啓，Tanjina Sharmin，福光由起，上田紗織，中島幸彦，見明史雄，鹿志毛信広（福岡大・薬）

4B19a10　有機塩素系殺虫剤 gamma-HCH 分解細菌 Sphingobium japonicum UT26 株の炭素源非添加無機寒天培地上で生育する突然変異株の遺伝学的解析

10:49　◦平野　丈，宇井博紀，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院・生命科）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

4B19a11　海洋性紅色非イオウ光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* の *ctrA* 遺伝子はフロック形成に関与する

11:10　◦山本絢也，小松浩之，鈴木宏道，梅影　創，田中照通，菊池　洋（豊橋技科大　環境・生命）

4B19a12　Pyrococcus horikoshi のメチルマロニル CoA ムターゼのサブユニット構造

11:21　◦薮田行哲，亀井由起子，米田一成[1]，櫻庭春彦[2]，大島敏久[3]，中野長久[4]，渡辺文雄（鳥取大・農・生資環，[1]東海大・農・バイオ，[2]香川大・農・応用生，[3]九州大院・農・遺資工，[4]阪府大・生資センター）

4B19a13　相同性組換えによる超好熱始原菌ランダム変異法の確立

11:32　◦足立恭子，折田和泉，中村　聡，今中忠行[1]，福居俊昭（東工大院生命理工・生物プロセス，[1]立命館大・生命科学・生物工学）

4B19a14　高度好塩性古細菌 Haloarcula japonica のゲノム上に見出されたフィトエンデヒドロゲナーゼ遺伝子ホモログの解析

11:43　◦安藤　藍，八波利恵，高市真一[1]，福居俊昭，仲宗根薫[2]，藤田信之[3]，関根光雄[3]，高品知典[4]，中村　聡（東工大院生命理工，[1]日本医大生物，[2]近畿大工，[3]NITE，[4]東洋大生命科）

C20 会場　午前の部（9:00〜11:54）

微生物—物質生産 – 醸造，発酵（一次代謝産物）—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4C20a01　外来Δ17 不飽和化酵素遺伝子導入による油糧微生物 *Mortierella alpina* での常温 EPA 生産

9:00　◦安藤晃規[1,2]，根来宏明[2]，奥田知生[2]，菊川寛史[2]，櫻谷英治[2]，島　　純[3]，清水　昌[4,2]，小川　順[2]（[1]京大・生理化学，[2]京大院農・応用生命，[3]京大・微生物科学，[4]京都学園大・バイオ環境）

4C20a02　コリネ型アミノ酸生産菌 GapN 発現株の生育を改善するサプレッサー変異の解析

9:11　◦竹野誠記，品川宗一郎，村田了祐，林　幹朗[1]，妹尾彰宏[1]，三橋　敏[1]，池田正人（信州大農・応生科，[1]協和発酵バイオ）

4C20a03　コリネ型アミノ酸生産菌の微好気生育に関わる核酸合成系遺伝子の機能解析

9:22　◦塚本修平，白倉大輔，馬場将弘，三橋　敏[1]，竹野誠記，池田正人（信州大農・応生科，[1]協和発酵バイオ）

4C20a04　コリネ型アミノ酸生産菌のグルコースバイパス輸送に関わる第 3 のグルコースリン酸化酵素

9:33　◦林　昌宏，栗根真一，三橋　敏[1]，竹野誠記，池田正人（信州大農・応生科，[1]協和発酵バイオ）

4C20a05　*Corynebacterium glutamicum* の *NCgl1221* 遺伝子産物を介したグルタミン酸排出に関する電気生理学的解析

9:44　◦橋本賢一，矢部　勇，中松　亘，川崎　寿（東電大工・環境化）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4C20a06　*Corynebacterium glutamicum* 由来 mechanosen-

sitive channel の *Esherichia coli* での発現とその影響
10:05 ○根本正祥，白井智史[1]，村田　潤[1]，中松　亘，川崎　寿（東電大院工・物質工，[1]東電大工・環境化）
4C20a07　Corynebacterium glutamicum の PDH/ODH 活性制御におけるタンパク質アセチル化の関与
10:16 ○齋藤　奏，久保翔世，川崎　寿，古園さおり[1]，吉田　稔[1]（東電大院・工，[1]理研・基幹研）
4C20a08　大腸菌を用いた L-アスパラギン直接発酵法の開発
10:27 ○三橋　敏，西野恒代（協和発酵バイオ）
4C20a09　酸性条件下におけるグルタミン酸発酵法の開発
10:38 ○原　吉彦，泉井　裕，守屋美加，平野聖子，伊藤久生，小野栄治，松井和彦（味の素）
4C20a10　イソプロピルアルコール高生産大腸菌の開発
10:49 ○天野　仰，白井智量，松本佳子，平野淳一郎，高橋　均，竹林のぞみ，　森重　敬，　舘野俊博，　古澤　力[1]，　平沢　敬[1]，清水　浩[1]，和田光史（三井化学(株)　触媒研，[1]阪大院情報・バイオ情報）

a11～a14 発表者の接続時間③ 11:00～11:10

4C20a11　高エタノール生産 Zymomonas mobilis 変異株の呼吸鎖の解析
11:10 ○林　　毅，加藤剛士，古川謙介（別府大・食栄科）
4C20a12　酵母 *S. cerevisiae* の環境中の窒素濃度に応答し，窒素取り込みを制御する遺伝子の検索
11:21 ○渡部貴志[1,2]，家藤治幸[3]，長村吉晃[4]，北本宏子[1]（[1]農環研，[2]JSPS-PD，[3]酒総研，[4]生物研）
4C20a13　*Rhizopus* 培養液の酵母アルコール耐性増強物質
11:32 ○鈴木　豪，門倉利守，蛭田淳史，中山俊一，中里厚実（東農大応生科・醸造）
4C20a14　エタノール発酵糸状菌の二形性制御とその特徴
11:43 ○高野真希，星野一宏（富山大院・理工）

C21 会場　午前の部（9:00～12:05）

微生物―遺伝子－発現制御，トランスクリプトーム―，―代謝－代謝調節，発酵生理，メタボローム―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4C21a01　*Aspergillus oryzae* におけるペントース代謝
9:00 渥美元規，○井上泰宏，金丸京子，小林哲夫（名大院生命農・生物機構）
4C21a02　糖新生制御因子 AcuM，AcuK の新機能に関する解析
9:11 ○浅井雄一郎，金丸京子，小林哲夫（名大院生命農・生物機構）
4C21a03　麹菌アミノ酸トランスポーターの解析
9:22 ○佐野元昭，尾関健二，大箸信一（金沢工大）
4C21a04　糸状菌 Trichoderma reesei のセルラーゼ生産に関与する推定トランスポーター遺伝子の機能解析
9:33 ○日下秀行，古川隆紀，深谷英嗣，志田洋介，小笠原渉（長岡技大・生物）
4C21a05　出芽酵母の有機酸生産関連遺伝子の解析
9:44 ○吉田　聡，横山亜紀，中嶋桂子，小林　統（キリンホールディングス・フロンティア技術研）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4C21a06　遺伝子スイッチを用いた出芽酵母の代謝変換制御
10:05 ○松山　崇，山西　守（豊田中研）
4C21a07　セレノメチオニン含有タンパク質生産のための硫黄代謝改変酵母株の創生
10:16 ○喜多島敏彦，地神芳文，千葉靖典（産総研･糖鎖医工学）
4C21a08　分裂酵母の ura4 遺伝子破壊株における細胞溶解現象の解析
10:27 ○西野耕平，松尾祐児，水野康平，戒能智宏，川向　誠（島根大・生物資源・生命工学）
4C21a09　豆乳乳酸発酵で生成されるジアセチル低減に関する基礎的検討
10:38 ○金子大輔，五十嵐俊教，青山顕司（キッコーマン）
4C21a10　ピペロナール代謝微生物の探索
10:49 ○土居志織，富田千晶，橋本義輝，小林達彦（筑波大院・生命環境）

a11～a15 発表者の接続時間③ 11:00～11:10

4C21a11　二機能性ホルムアルデヒド固定酵素遺伝子を導入したメタノール資化性細菌の生育と代謝物動態
11:10 ○梶原大輔，由里本博也，阪井康能（京大院農･応用生命）
4C21a12　メチロトローフ細菌 *Methylobacterium extorquens* のレアアース依存的メタノール代謝における *xoxF* の機能解析
11:21 ○田代晋也，三井亮司[1]，谷　明生[2]，佐々健太郎，岩間智徳，早川享志，中川智行，河合啓一[3]（岐大院･応生科，[1]岡山理大･理，[2]岡山大・植物研，[3]東海学院大）
4C21a13　メタン産生アーキア *Methanospirillum hungatei* における RuBisCO と PRK を利用した新規 CO_2 固定回路の解析
11:32 ○河野卓成，遠藤千夏子，Mehrotora Sandhya，横田明穂，蘆田弘樹（奈良先端大・バイオ）
4C21a14　海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株のテトラチオン酸ハイドロラーゼに関する研究
11:43 ○金尾忠芳，橋本由希[1]，峠　達也[1]，菊川寛史[1]，上村一雄（岡山大院自科，[1]岡山大農）
4C21a15　ギンネム土壌由来 Arthrobacter 属ミモシン資化性菌の持つミモシン分解酵素のクローニング及びその発現制御
11:54 ○安里将仁，小林広幸，大城拓人，福田雅一，多和田眞吉（琉球大・農）

C22 会場　午前の部（9:00～11:43）

微生物―細胞－分離，分類，生態―，―その他―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4C22a01　キシラン添加による *Lactobacillus brevis* の沈降作用について
9:00 ○齋藤勝一，舟根和美（農研機構・食総研）
4C22a02　沖縄ヤンバル林のセルロース分解微生物
9:11 ○藤井克彦，大杉紋可，関内詩織（山口大農）
4C22a03　衣類の黒斑汚れ解析
9:22 久保田浩美，千田昌子，○佐藤　惇，三谷あさこ，伊澤啓文[1]，田中　篤[2]，山口紀子[1]，矢口貴志[3]，人見　潤（花王 安全性研，[1]花王 HH 研，[2]花王 解析研，[3]千葉大　真菌医学研究センター）
4C22a04　せんだんご製造工程中におけるデンプン分解微生物の解析
9:33 ○熊谷浩一，岡　大貴，田中尚人[1]，佐藤英一，岡田早苗東農大応生科・化学，[1]東農大・菌株）
4C22a05　新規ポリ塩化ビフェニル分解細菌の単離
9:44 ○室月祥枝，田中俊也，髙塚由美子，神尾好是，原富次郎（山形大院・理工）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4C22a06　カルバゾールを分解する新規海洋性細菌の分布に関する研究
10:05 ○小和田真純，茂野俊也，岩田健一，大森俊雄（芝工大・シ工・生科）
4C22a07　便器表面より単離した *Rhizobium* 属細菌 R8 株のバイオフィルム形成に関与する生体分子
10:16 ○深野　透，高橋康徳，五味満裕[1]，大崎幸彦[1]，三輪京子，森川正章（北大院環・分子生物，[1]小林製薬・中研）
4C22a08　循環型モデル浄化槽における細菌叢遷移とタンパク質分解反応に関わる酵素活性の解析
10:27 ○菊池駿太郎，下村和之，冨岡顕治，中田　京[1]，甲木幸枝[1]，鈴木智順（東理大院理工・応生科，[1]東理大理工・応生科）

4C22a09　循環型モデル浄化槽内の細菌・バイオフィルム・真核微生物における代謝活性変動の rRNA を用いた比較解析
10:38　◦甲斐隆之，下村和之，冨岡顕治，高城茉那[1]，真辺春香[1]，鈴木智順（東理大院理工・応生科，[1]東理大理工・応生科）
4C22a10　蛍光菌 Pf0-1 株のバイオフィルム形成を促進するジグアニル酸シクラーゼの同定
10:49　◦吉岡資郎，ニューウェルピーター[1]，オツールジョージ[1]（分子研，[1]ダートマス医大）

a11〜a13 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

4C22a11　微生物由来タンパク質の二次元電気泳動法による分離
11:10　◦和田　潤，泊　直宏，高阪千尋，廣岡青央，山本佳宏（京都市産技研）
4C22a12　抗生物質多剤耐性菌の同定・定量法の改良
11:21　◦渡辺克二，坂田紘将，末永宜信（福工大・生命環境）
4C22a13　光触媒担持アルギン酸ゲルビーズの殺菌効果と種子殺菌への利用
11:32　◦伊勢田弘太郎，石野靖浩[1]，大中真莉子[1]，田部井陽介[1]，惠良真理子[1]，二宮純子[1]，森田　洋[1]（北九大院・国際環境工，[1]北九大・国際環境工）

C23 会場　午前の部（9:00〜11:54）

微生物―細胞 – 栄養，生育，増殖―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4C23a01　細胞性粘菌 D411-2p タンパク質の部分断片による F アクチンの束化
9:00　◦稲葉弘哲，馬渕一誠[1]，依田幸司，足立博之（東大院農生科・応生工，[1]学習院大・理・生命科学）
4C23a02　シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 における光依存的 DNA 複製制御機構の解析
9:11　◦大林龍胆，渡辺　智，兼崎　友[1]，千葉櫻拓，吉川博文（東京農大　応生科　バイオ，[1]東京農大　ゲノム解析セ）
4C23a03　ラッカセイ種皮ポリフェノールの抗菌作用の検証と関与する遺伝子発現の DNA マイクロアレイ解析
9:22　◦小澤恵実，田村倫子，田中尚人[1]，矢口行雄[2]，村　清司，荒井綜一[3]（東農大応生科・栄養，[1]東農大応生科・菌株，[2]東農大地環科・電顕，[3]東農大総研）
4C23a04　チュニジア環境試料からの好塩性細菌分離と 454GSJr によるドラフトゲノム解析
9:33　◦松井　徹，青山洋昭，斎藤星耕，新里尚也，松崎吾朗，磯田博子[1]，Hassen Abd-Ennasser[2]，Nilushi Nugara（琉大熱生研，[1]筑波大 ARENA，[2]チュニジア CBBC）
4C23a05　緑膿菌の細胞外多糖がもたらす静置環境特異的な適応優位性
9:44　◦山本京祐，新井博之，石井正治，五十嵐泰夫（東大院農生科・応生工）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4C23a06　緑膿菌における *cbb*$_3$-type cytochrome *c* oxidase のサブユニットシャッフリング
10:05　◦長村達也，川上卓郎，石井正治，五十嵐泰夫，新井博之（東大院・農生科・応生工）
4C23a07　ラン藻と大腸菌の鉄還元酵素（第 4 報）
10:16　◦佐藤純一，森　鉄也，田中英資，諸星拓己，湯川　諒，武田晃治，渡部俊弘[1]，安保　充[2]，吉村悦郎[2]，中川純一[1]，阿部　晃[3]，川崎信治，新村洋一（東農大応生科･バイオ，[1]東農大生物産業･食香，[2]東大院農生科・応生化，[3]札幌医大医・眼科）
4C23a08　大腸菌におけるチオ硫酸の選択的利用によるシステイン合成機構（チオ硫酸リプレッション）
10:27　◦仲谷　豪，大津厳生，山中　幸[1]，山本兼由[1]，高木博史（奈良先端大・バイオ，[1]法政大院・工）
4C23a09　ペニシリン結合タンパク質 PBP1B 欠損株において溶菌を引き起こす新規抗生物質の探索とその作用機構の解析
10:38　◦相良素行[1,2,3]，和地正明[1,2,3]（[1]東工大，[2]院生命理工，[3]生物プロセス）
4C23a10　輸液カテーテルは内腔に結晶を生じ，抗菌カテーテルであっても細菌増殖を助長する因子となる
10:49　◦西川可穂子，阪本敏久（防衛医科大 救急）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

4C23a11　Paenibacillus 属細菌の殺菌剤耐性とバイオフィルム形成
11:10　◦平井知子，坂元　仁[1]，土戸哲明[1]（関西大院・理工，[1]関西大・化学生命工）
4C23a12　大豆油-水混合系における GFP 変異体発現枯草菌胞子の熱死滅・損傷過程の解析
11:21　◦濱名勝大，髙田恵輔[1]，坂元　仁[1]，土戸哲明[1]（関西大院・理工，[1]関西大・化生工）
4C23a13　脂肪酸とそのグリセリンエステルによる酵母の死滅と液胞破壊
11:32　小川陽子，阿武あゆみ，◦坂元　仁，土戸哲明（関西大・化生工）
4C23a14　さまざまなプラスチック表面における細菌バイオフィルム形成量の比較
11:43　◦倉科光紀，三輪京子，森川正章（北大院環境･分子生物）

C24 会場　午前の部（9:00〜11:54）

微生物―細胞 – 情報伝達，細胞応答，ストレス―

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4C24a01　フォスフォイノシチドと TORC2 結合タンパク質 Slm1 と Slm2 の下流因子の探索
9:00　津田遼平，田中直孝，◦田淵光昭（香川大学　農学部）
4C24a02　分裂酵母における DNA 複製と細胞極性をつなぐ経路：癌細胞の異常な形を理解するヒント！
9:11　◦古家野孝行，久米一規，水沼正樹，平田　大（広島大・先端研）
4C24a03　DNA 複製チェックポイント経路による成長極性制御に関与する遺伝子の探索
9:22　◦橋本智代，久米一規[1]，水沼正樹[1]，平田　大[1]（広島大･工，[1]広島大・院先端研・分子生命）
4C24a04　分裂酵母の CoQ およびシステイン合成欠損による酸化ストレス応答
9:33　◦竹内佳奈，古田奈々，中川　強[1]，戒能智宏，川向　誠（島根大・生物資源・生命工，[1]島根大・総科技センター）
4C24a05　出芽酵母におけるカルシニューリン機能関連遺伝子の探索
9:44　◦畠山千央，久米一規[1]，高田純平[1]，福留美穂，水沼正樹[1]，平田　大[1]（広島大・工，[1]広島大・院先端研・分子生命）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4C24a06　緑膿菌が生産する細胞間情報伝達物質への鉄の影響
10:05　◦豊福雅典，大浦　啓，内山裕夫，野村暢彦（筑波大院生命環境）
4C24a07　緑膿菌の鉄代謝関連シグナル伝達系を標的とするスクリーニング系の構築
10:16　◦佐藤一樹，秋葉敬斉，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕（東北大・農）
4C24a08　Assessment of structural and physiological profiles of microbial biofilms using a multichannel device
10:27　Zoe Sanchez，　Akio Tani[1]，　Nobuhiro Suzuki[1]，◦Kazuhide Kimbara（Fac. Eng. Shizuoka Univ., [1]IPSR, Okayama Univ.）
4C24a09　脱窒が緑膿菌ムコイド株と非ムコイド株の複合バイオフィルム形成に与える影響
10:38　◦濱田将風，酒井亮祐，楊　佳約，豊福雅典，清川達則，

中島敏明，内山裕夫，野村暢彦（筑波大院生命環境）

4C24a10　*Aspergillus nidulans* における酸化ストレス応答機構の解析

10:49　°佐古知美，山崎ゆかり，金丸京子，加藤雅士[1]，小林哲夫（名大院・生命農，[1]名城大・農）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

4C24a11　*Aspergillus nidulans* におけるパキシリン様タンパク質 PxlA の機能解析

11:10　°二神泰基，　梶原康博[1]，　高下秀春[1]，　大森俊郎[1]，Michelle Momany[2]，後藤正利（九大院・農，[1]三和酒類，[2]ジョージア大）

4C24a12　*Aspergillus nidulans* における新規なニトロソ化ストレス耐性酵素 metallothionein の耐性機構の解析

11:21　°周しょう敏，鳴神寿昭，上村曜介，星野貴行，高谷直樹（筑波大院・生命環境）

4C24a13　ダイズ茎疫病菌 *Phytophthora sojae* 遊走子の感染時形態変化に関わる遺伝子の探索

11:32　木谷祐也，°崎浜靖子[1]，橋床泰之[1]（北大･農，[1]北大院･農）

4C24a14　*Aspergillus nidulans* リン酸基中間因子 *ypdA* 遺伝子発現制御株の解析および YpdA とレスポンスレギュレーターの相互作用解析

11:43　°緑川裕良，萩原大祐[1]，吉見　啓[2]，阿部敬悦（東北大院･生物産業創成，[1]千葉大・真菌センター，[2]東北大・未来研）

C25 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物—その他—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4C25a01　歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* はファージ感染により口腔内で高病原化する

9:00　山田和範，°倉重吉宏，加藤昭夫，恵比須繁之[1]，阿座上弘行（山口大・農，[1]阪大院・歯）

4C25a02　歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の溶血因子の精製と解析

9:11　山本美保子，加藤昭夫，恵比須繁之[1]，°阿座上弘行（山口大・農，[1]阪大院・歯）

4C25a03　歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサー 2 分解酵素の解析

9:22　°KARIM Minnatul，長尾章子，加藤昭夫，恵比須繁之[1]，阿座上弘行（山口大・農，[1]阪大院・歯）

4C25a04　黄色ブドウ球菌が産生する二成分性赤血球崩壊毒素 γ-hemolysin の Hlg2 成分の標的細胞膜結 合に関与する因子の探索

9:33　°高橋基史，毛利彰太，神尾好是[1]，金子　淳（東北大院･農･生物産業創成，[1]山形大院・理工）

4C25a05　Parasporin-4 のマウスに対する毒性

9:44　°奥村史朗，古賀慎太郎，黒田理恵子，古賀浩徳[1]，井上國世[2]，水城英一（福岡県工技セ，[1]久留米大医・内科学，[2]京大院農・食品生物）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4C25a06　糸状菌の C 末端脂質付加共通配列を欠く低分子量 G-タンパク質

10:05　°笠原　紳，高橋拓也，山内優輝（宮城大・食産業）

4C25a07　*Photorhabdus luminescens* の発光誘導における陽イオンおよび陰イオンの影響

10:16　°小川あかね，　恵良真理子[1]，　二宮純子[1]，　田部井陽介[1]，森田　洋[1]（北九大院　国際環境工，[1]北九大　国際環境工）

4C25a08　フィブロインを固定化担体とした *Vibrio fischeri* の発光性

10:27　°二宮純子，　恵良真理子，　小川あかね，　田部井陽介，森田　洋（北九大　国際環境工）

4C25a09　*Vibrio fischeri* を利用した毒性評価試験

10:38　°恵良真理子，　田部井陽介，　小川あかね[1]，　二宮純子，森田　洋（北九大・国際環境工，[1]北九大院・国際環境工）

4C25a10　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の運動性胞子におけるエネルギー代謝の解析

10:49　°乙供かな依，斎藤菜摘[1]，曽我朋義[1]，藤田信之[2]，早川正幸[3]，大西康夫（東大院農生科・応生工，[1]慶大・先端生命研，[2]NITE・NBRC，[3]山梨大・工）

a11〜a15 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

4C25a11　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の BldD ホモログの機能解析

11:10　°小西健司，藤田信之[1]，早川正幸[2]，大西康夫（東大院農生科・応生工，[1]NITE・NBRC，[2]山梨大・工）

4C25a12　ギンネム土壌由来 Erwinia 属ミモシン資化性菌がもつミモシン分解酵素の精製とクローニング

11:21　°上原小亜季，北村　真，福田雅一，多和田眞吉（琉球大農・生資科）

4C25a13　ユーグレナ由来パラミロン誘導体の保湿剤への応用

11:32　°藤田幸子，田中清隆，高山　悟，アルナシリイダマルゴダ（一丸ファルコス・開発部）

4C25a14　油脂(triacylglycerol)を分泌する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 変異株の解析

11:43　°秦野琢之，藤井清隆，池本ひとみ，松崎浩明（福山大生命工・生物工）

4C25a15　ゴエモンコシオリエビと外部共生する ε プロテオバクテリアの化学独立栄養生産性の細胞特異的検出

11:54　°和辻智郎，西澤　学，諸野祐樹，平山仙子，佐野有司[1]，高畑直人[1]，高井　研（海洋研，[1]東大・大気海洋研）

C26 会場　午前の部（9:00〜11:54）

動物—生理 – 栄養，ビタミン，ミネラル，その他食品成分—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4C26a01　トコトリエノールの組織への取り込みと消失に及ぼす α−トコフェロールの影響

9:00　野村　早，内田友乃，°池田彩子（名古屋学芸大･管理栄養）

4C26a02　米ぬか給与鶏の可食部におけるビタミン E の分布

9:11　°木村俊之，山岸賢治，大矢浩司[1]，泉田和子[1]（農研機構東北農研，[1]福島県農総セ 畜産研）

4C26a03　ビタミン K 欠乏食給餌が KK-Ay マウスの糖代謝に及ぼす影響

9:22　°平原啓甫，白川　仁[1]，齋藤正頼[1]，Puspo E Giriwono[1]，桂井朋子[1]，後藤知子[1]，駒井三千夫[1]（東北大・農，[1]東北大・院農）

4C26a04　マウス精巣由来細胞におけるゲラニルゲラニオールの男性ホルモン産生促進

9:33　吉田理紗，°白川　仁[1]，伊東あさぎ[1]，Giriwono Puspo Edi[1]，駒井三千夫[1]（東北大・農，[1]東北大・院農）

4C26a05　アスコルビン酸欠乏による肝シトクロム P-450 の減少とその機構解析

9:44　°星長夕貴子，三浦奈津子，徳田優希，小林美里，村井篤嗣，堀尾文彦（名大院生命農・応用分子生命科）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4C26a06　アスコルビン酸欠乏がラットの不安行動に及ぼす影響

10:05　°橋本理恵子，寺田裕紀，竹中麻子（明治大農・農化）

4C26a07　高リン食摂取がラット肝臓に及ぼす影響の DNA マイクロアレイによる解析

10:16　°千　善宇[1]，石島智子[1]，陶山達也[1]，阿部啓子[1,2]，中井雄治[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]KAST）

4C26a08　短期間のマグネシウム欠乏食摂取ラットにおける肝臓の遺伝子発現解析

10:27　°中村紀章[1]，石島智子[1]，阿部啓子[1,2]，中井雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]KAST）

4C26a09　分離大豆タンパク質がマグネシウム欠乏ラットに及ぼす生理効果の解析
10:38　○米光翔吾[1]，石島智子[1]，中村紀章[1]，阿部啓子[1,2]，中井雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]KAST）
4C26a10　亜鉛の欠乏により生じる味覚の変化についての解析
10:49　○川嶋朋子，辻谷知子，呉　性姫，林由佳子（京大院･農）

a11～a14 発表者の接続時間③ 11:00～11:10

4C26a11　亜鉛吸収に機能するトランスポーター ZIP4 の発現を促進する食品因子の探索
11:10　○橋本彩子，木津久美子[1]，宮前友策，増田誠司，永尾雅哉，成田宏史[1]，神戸大朋（京大生命･統合生命，[1]京女大･家政･食物栄養）
4C26a12　亜鉛トランスポーター ZIP4 の発現を促進する食素材成分の精製
11:21　○大倉克摩，高橋正和，橋本彩子[1]，永尾雅哉[1]，神戸大朋[1]，大東　肇（福井県大院・生物資源，[1]京大院・生命）
4C26a13　貧血ラット十二指腸におけるフェリチン非依存的抗酸化メカニズム
11:32　○山本真智子，篠田卓弥，団未那美，篠田粧子（首都大院　人間健康科学研究科　栄養生化学）
4C26a14　ニュートリゲノミクスによる鉄安全摂取基準アセスメント
11:43　○亀井飛鳥，渡部由貴，篠崎文夏，荒井綜一[1]，阿部啓子[2]（KAST，[1]東農大・総研，[2]東大院農生科・応生化）

C27 会場　午前の部（9:00～10:49）

動物―遺伝子・タンパク質 – 発現制御―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4C27a01　小腸様細胞株 Caco-2 細胞におけるスクラーゼ・イソマルターゼ遺伝子発現に対するメチル化ヒストン H3K4 結合タンパク質 CHD1 の役割
9:00　○稲用裕子, 望月和樹, 大崎愛弓, 合田敏尚（静岡県立大院･生活健康科学・栄養生理）
4C27a02　遺伝子ノックアウト細胞を用いたヒストンバリアント H2A.Z アイソフォームの機能解析
9:11　○日下部将之，松田　涼，北村大志，堀　哲也[1]，深川竜郎[1]，原田昌彦（東北大院・農・分子生物学，[1]国立遺伝研）
4C27a03　新生仔肝臓の脂肪合成遺伝子の DNA メチル化制御
9:22　○亀井康富[1,2]，　江原達弥[1,3]，　高橋真由美[1]，　袁　勲梅[1]，金井紗綾香[1]，　山崎聖美[4]，　江崎　治[4]，　菅波孝祥[1]，　岡野正樹[5]，小川佳宏[1,6]（[1]東京医歯大難治研　分子代謝，[2]臓器代謝，[3]森永乳業，[4]栄養研基礎栄養，[5]理研発生再生セ，[6]GCOE）
4C27a04　筋分化抑制因子 USP19 遺伝子のエストロゲンによる転写調節機構の解析
9:33　○小川真弘，　山地亮一，　原田直樹，　中野長久[1]，　乾　　博（大阪府大院・生命環境，[1]大阪女子短大）
4C27a05　エストロゲン依存性細胞増殖における新規 ERα 複合体の機能解析
9:44　○岡田麻衣子，朝妻知子，土屋　光，陳淑チン，大竹史明，加藤茂明（東大・分生研・核内情報）

a06～a09 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4C27a06　To clarify the function of S-phase specific Estrogen receptor alpha complex.
10:05　○Shuting Chen,　Maiko Okada,　Fumiaki Ohtake,　Shigeaki Kato（IMCB, University of Tokyo）
4C27a07　新規 Ub 修飾による Histone Ub 化制御機構の解明
10:16　○土屋　光，大竹史明，朝妻知子，吉村充騎，岡田麻衣子，加藤茂明（東大　分生研）
4C27a08　骨組織における局所的性ホルモン合成の生理機能解析
10:27　○星野麻衣子，奥野陽亮，井上和樹，金藤紫乃，辻　直也，井上絵里奈，今井祐記，加藤茂明（東大・分生研）
4C27a09　The function of androgen receptor in chondrocytogenesis
10:38　○Yuan Si,　Min-Young Youn,　Kazuki Inoue,　Yoko Yamamoto,　Yuuki Imai,　Shigeaki Kato（IMCB, The University of Tokyo）

C28 会場　午前の部（9:00～11:00）

動物―無脊椎動物 – 生理，細胞，遺伝子，タンパク質―，―その他―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4C28a01　ミズクラゲ幼生の変態を誘導する化合物のスクリーニング
9:00　○国吉久人，奥村衣澄，黒田理絵，小路　淳，荒川賢治[1]，斎藤臣雄[2]，長田裕之[2]（広島大院・生物圏，[1]広島大院・先端研，[2]理研基幹研・ケミカルバイオロジー）
4C28a02　ミズクラゲ幼生の変態を阻害する化合物のスクリーニング
9:11　○黒田理絵，奥村衣澄，小路　淳，荒川賢治[1]，斎藤臣雄[2]，長田裕之[2]，国吉久人（広島大院・生物圏，[1]広島大院・先端研，[2]理研基幹研・ケミカルバイオロジー）
4C28a03　ペプチドーム解析によるミズクラゲ幼生の変態関連ペプチドの探索
9:22　○吉岡沙弥香，辻田菜摘，奥村衣澄，小路　淳，荒川賢治[1]，国吉久人（広島大院・生物圏，[1]広島大院・先端研）
4C28a04　ミズクラゲ幼生の変態関連遺伝子の探索
9:33　○辻田菜摘，桑原宏行，矢中規之，小路　淳，荒川賢治[1]，国吉久人（広島大院・生物圏，[1]広島大院・先端研）
4C28a05　深海性ヨコエビが持つ多糖分解酵素の性質
9:44　○小林英城（海洋機構）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4C28a06　軟体動物組織再生へのレチノイン酸の関与
10:05　○高橋勇二，長澤香幸，雑賀　絢，渡邊弘明，水上　薫，金子浩子，伊東　翼，中野春男，梅村真理子，高橋　滋（東京薬科大学・生命科学）
4C28a07　尿に由来する揮発性肺がんマーカーの探索
10:16　○花井陽介，　下野　健[1]，　松村幸一[2]，　Anil Vachani[3]，Steven Albelda[3]，　山崎邦郎[2]，　Gary Beauchamp[2]，　岡　弘章[1]（名大・革新ナノバイオデバイス研究セ，[1]パナソニック(株)，[2]モネル，[3]ペンシルバニア大・医療セ）
4C28a08　ウシリポカリンの生体内分布
10:27　Tamar Japaridze,　○福田健二，片山翔太[1]，木田克弥，Rupert Bruckmaier[2]，浦島　匡（帯畜大院・畜産衛生，[1]帯畜大・畜産生命，[2]Bern Unv.・Vet. Physiol.）
4C28a09　Adiponectin が皮膚中 I 型コラーゲン合成に及ぼす影響
10:38　○山根拓実，佐藤ますみ，坂本真美，服部一夫，大石祐一（東農大応生科・栄養）
4C28a10　表皮角化細胞における TGF-β1 のセラミド合成への影響
10:49　○村松愛美，山根拓実，服部一夫，大石祐一（東農大応生科・栄養）

C29 会場　午前の部（9:00～11:54）

動物―細胞 – 情報伝達，細胞応答―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4C29a01　DNA メチル化レベル低下により DNA 損傷が誘導されるゲノム領域の同定
9:00　○吉村　健，杉村和人[1]，緒方正人[1]，奥村克純[2]（三重大院生資，[1]三重大院医，[2]三重大院生資，三重大院地域イノベコアラボ）
4C29a02　ケラチノサイトの EGF によるダイオキシンの毒性発現抑制メカニズム
9:11　○藤野貴広，　重川庸介，　佐藤寛之，　能丸幸治[1]，　岩田久人[1]（愛媛大・総科研，[1]愛媛大・沿岸）
4C29a03　高温ストレスによるがん特異的な細胞死誘導機構の解析
9:22　○藤本香子，小林由香利，吉川博文，千葉櫻拓（東京農大･

応生科・バイオ）

4C29a04　Regulation of mouse melanoma invasion by membrane GM3

9:33　°Yosuke Oikawa,　Kazumi Yagasaki,　Yutaka Miura（Tokyo Noko University）

4C29a05　Apigenin によるヒト白血病細胞 K562 の赤血球分化誘導作用の解析

9:44　°翁長彰子[1,2]，韓　畯奎[1,2]，礒田博子[1,2]（[1]筑波大生命環境，[2]北アフリカ研究センター）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4C29a06　前立腺がん細胞における断片化アンドロゲン受容体の産生について

10:05　°原田直樹，山地亮一，中野長久[1]，乾　　博（大阪府大・生命環境，[1]大阪女子短大）

4C29a07　低酸素条件下における癌細胞悪性化の機構解析

10:16　°佐藤直也，三村真吾，矢ヶ崎一三, 三浦　豊，石井一夫[1]，古崎利紀[1]，田中あかね[2]（東京農工大・院・応用生命化学，[1]東京農工大･院･農学系ゲノム科学人材育成プログラム，[2]東京農工大･農・獣医）

4C29a08　Chemical inhibition of Ser/Thr protein phosphatase type 1 reveals relationship between ATM and ribosomal protein S6

10:27　°YING LI，SHINYA MITSUHASHI，MAKOTO UBUKATA（Div. Appli. Biosci., Grad. Sch. Agric.,Hokkaido Univ.）

4C29a09　抗肝線維化物質テトランドリンによる肝星細胞でのマクロリポファジー制御

10:38　°宮前友策，仲井奈緒美，翁長彰子[1]，韓　畯奎[1]，礒田博子[1]，芦田　久，神戸大朋，入江一浩[2]，永尾雅哉（京大院・生命，[1]筑波大院・生命環境，[2]京大院・農）

4C29a10　ラミニンが脂肪細胞特性に与える影響解析

10:49　°木内里美, 森　　忍, 村瀬孝利, 大内　敦, 長谷　正（花王生科研）

a11〜a14 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

4C29a11　脂肪細胞における細胞内コリンの新規供給経路

11:10　°中村啓司，吉田　円，吉澤郁美，廣崎晴香[1]，加藤範久，矢中規之（広島大院・生物圏科学，[1]広島大・生物生産）

4C29a12　肥満において単球・マクロファージとの相互作用により脂肪細胞で応答する因子群の探索

11:21　°久本高央，真田洋平，米中久喜[1]，加藤範久，西村英紀[2]，矢中規之（広島大院･生物圏科学，[1]広島大･生物生産，[2]広島大院･医歯薬）

4C29a13　脂肪細胞における RASSF6 の発現はマクロファージとの相互作用によって減少する

11:32　真田洋平，久本高央，米中久喜[1]，西村英紀[2]，畑　　裕[3]，°矢中規之（広島大院・生物圏科学，[1]広島大・生物生産，[2]広島大院・医歯薬，[3]東京医歯大・難治研）

4C29a14　骨格筋の細胞内代謝における脂肪酸結合タンパク質 3 の役割の検討

11:43　°楠堂達也，片岡直也，山下　均（中部大・生命医科）

A30 会場　午前の部（9:00〜11:43）

植物—植物栄養，光合成，オルガネラ，膜輸送—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4A30a01　ホウ素要求性が低下したシロイヌナズナ変異株の単離

9:00　°三輪京子[1,2]，藤原　徹[3]（[1]北大・創成，[2]さきがけ・JST，[3]東大・農）

4A30a02　シロイヌナズナ低ホウ素馴化細胞の解析

9:11　°千葉美恵，平井優美[1]，三輪京子（北大・創成，[1]理研・植物センター）

4A30a03　シデロフォアによるトマトの 3 価鉄吸収への影響

9:22　°長田　武，大保卓郎，三神達也（摂南大・理工）

4A30a04　植物オルガネラ膜輸送体蛋白質の完全インビトロ合成・再構成系による機能解析

9:33　°野澤　彰，是枝　晋[1]，隆　一輝[2]，岡田有右，藤本竜治，坪井敬文，戸澤　譲（愛媛大・無細胞セ，[1]埼玉大・分析セ，[2]埼玉大・理工研）

4A30a05　イオンチャネル蛋白質の完全インビトロ再構成系による機能解析

9:44　°戸澤　譲，竹田弘法，白井　理[1]，日ビ隆雄[2]，野澤　彰（愛媛大・無細胞セ，[1]京大院・農，[2]福井県大・生物資源）

a06〜a10 発表者の接続時間② 9:55〜10:05

4A30a06　植物膜電位依存性 K チャネルのリン酸化制御

10:05　°松本尚樹（東北大院工・バイオ工）

4A30a07　インベルターゼはプラスチドシグナリングを介した炭素・窒素代謝バランス制御に関与する

10:16　宮崎　望[1]，Daniel Padilla-Chacon[2]，北條真之[2]，大鳥久美[2]，丸田隆典[2,3]，°田茂井政宏[1,2]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]島根大・生資科・生命工）

4A30a08　光合成機能強化植物を用いた炭素・窒素バランス制御機構の解明

10:27　°丸山俊樹[1]，　大鳥久美[2]，　Daniel Padilla-Chacon[2]，作山治美[2]，田茂井政宏[1,2]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ）

4A30a09　強光ストレス耐性に関わる PsbP-like protein 1 の分子機能解析

10:38　松井信太郎[1]，　石原靖子[1]，　井戸邦夫[1]，　佐藤文彦[1]，°伊福健太郎[1,2]（[1]京大院・生命，[2]JST さきがけ）

4A30a10　イネヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼのプラスチド局在に関する研究

10:49　°梅澤幸歩, 金古堅太郎, 甲州　努, 石本卓也[1], 伊藤紀美子, 林八寿子[2]，豊岡公徳[3]，三ツ井敏明[1]（新潟大院・自然科学，[1]新潟大農・応生化，[2]新潟大理・自然環境，[3]理研・植物センター）

a11〜a13 発表者の接続時間③ 11:00〜11:10

4A30a11　シロイヌナズナ由来大腸菌 TyrP 相同蛋白質の機能解析

11:10　Sattasuk Kwanchanok, 清水綾子, °秋田　充（愛媛大農・生資科）

4A30a12　BiFC 法によるシロイヌナズナクラスリンサブユニット間の相互作用の解析

11:21　°石川翔太，山内淳司[1]，松波絵理香，地阪光生，長屋　敦，横田一成，中川　強[2]，西村浩二[2]（島根大・生資，[1]国立生育医療セ研・薬剤治療，[2]島根大・総科研センター）

4A30a13　シロイヌナズナキチン受容体の細胞内分子挙動の解析

11:32　安川大喜，的場由佳，松波絵理香，石川翔太，地阪光生，長屋　敦，横田一成，中川　強[1]，°西村浩二[1]（島根大・生資，[1]島根大・総科研センター）

A31 会場　午前の部（9:00〜11:54）

植物—遺伝子 – 機能，発現制御—

a01〜a05 発表者の接続時間① 8:50〜9:00

4A31a01　シロイヌナズナ GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼ遺伝子の発現解析

9:00　増澤拓也，小口能里枝，丸田隆典，澤　嘉弘，重岡　成[1]，°石川孝博（島根大・生資科・生命工，[1]近畿大・農・バイオ）

4A31a02　シロイヌナズナにおける新奇アスコルビン酸欠乏変異体の機能解析

9:11　°原井健司, 丸田隆典, 澤　嘉弘[1], 重岡　成[2], 石川孝博[1]（島根大・生資科・生命工，[1]島根大生・資科・生命工，[2]近畿大・農・バイオ）

4A31a03　シロイヌナズナ HsfA4c を介した HsfA2 の発現制御機構の解明

9:22　°林　秀樹[1]，　押川美穂[2]，　野坂亮太[1]，　西澤(横井)彩子[2]，

藪田行哲[3]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]鳥取大・農・生資環）

4A31a04　シロイヌナズナ Guanosine 3'-5'-bispyrophosphate（ppGpp）pyrophosphohydrolase（AtNUDX26）の機能解析

9:33　◦加藤貴大[1]，　伊藤大輔[1]，　石川和也[2]，　田茂井政宏[1,2]，吉村和也[3]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]中部大・応生・食栄）

4A31a05　イネ細胞壁成分の蓄積を担う BC1 の局在および炭水化物結合モジュールの解析

9:44　◦今井一貴，佐藤かんな，伊藤幸子，鈴木　瑠，武内佐知，峯岸和明，梶田真也，片山義博[1]（農工大・BASE，[1]日本大・生資）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4A31a06　植物特異的 ERF 転写抑制因子のプロテアソームによる制御とその機能の解析

10:05　◦小山知嗣，新居　遙，北島佐紀人[1]，高木　優[2]，佐藤文彦（京大院・生命科学，[1]京工繊大院・応用生物，[2]産総研・生物プロセス）

4A31a07　花成を制御する bZIP 転写因子 FD のリン酸化による機能制御機構

10:16　◦川本　望，遠藤　求，笹部美知子[1]，町田泰則[1]，荒木　崇（京大・院・生命，[1]名大・院・理）

4A31a08　植物形質転換用リサイクルベクターシステムの開発

10:27　◦芝原健太，加藤　晃[1]，立木賢輔[1]，木村哲哉[2]，中川　強（島根大・総科センター・遺伝子，[1]奈良先端・バイオサイエンス，[2]三重大院・生物資源）

4A31a09　フェオフィチナーゼ変異イネの老化とトコフェロール含量の解析

10:38　◦木村映一，村田和優[1]，木村俊之，仲川清隆[2]，宮澤陽夫[2]（東北農研，[1]富山農総技セ，[2]東北大）

4A31a10　トマト成熟制御因子 RIN 標的遺伝子の DNA マイクロアレイを用いた大規模同定

10:49　◦藤澤雅樹，嶋　羊子，中野年継，伊藤康博（農研機構食総研）

a11～a14 発表者の接続時間③ 11:00～11:10

4A31a11　イチゴ花托におけるアントシアニン合成関連遺伝子の機能解析

11:10　◦宮脇克行，角村寧子[1]，浜岡宏和，三戸太郎，大内淑代，野地澄晴（徳島大工・生物工，[1]徳島大栄養・人間）

4A31a12　チューリップの花弁特異的 *TgMYB1* プロモーター領域の解析

11:21　◦荘司和明（富山県農総技セ・農研）

4A31a13　液胞型鉄イオントランスポーター遺伝子の導入によるユリ花弁細胞の青色化

11:32　◦丸山温子，山本将之，山田恭司，中島範行[1]，荘司和明[2]（富山大院・理工，[1]富山県大院・工，[2]富山農総技セ・農研）

4A31a14　カンキツ類果樹の葉と果実の表面構造の解析

11:43　◦井上剛史，小川一紀[1]，坂本正弘，東　順一（京大院農・地域環境，[1]農研機構・果樹研）

4A31a15　「発表取消」

A32 会場　午前の部（9:00～11:00）

糖鎖―機能・その他―

a01～a05 発表者の接続時間① 8:50～9:00

4A32a01　統合失調症患者に見出された一塩基多型（SNP-7）由来のポリシアル酸転移酵素が産生するポリシアル酸構造と神経作用因子との相互作用解析

9:00　◦羽根正弥[1,2]，磯村　遼[1,2]，北島　健[1,2]，佐藤ちひろ[1,2]（[1]名大・生物機能セ，[2]名大院・生命農学）

4A32a02　ブタ精子におけるマイクロドメイン局在性糖タンパク質 WGA-gp の生理機能

9:11　◦金澤　尊[1,2,3]，Estelle Garenaux[2]，Waraporn Kasekarn[2]，堀　和紀[1]，安江　博[4]，佐藤ちひろ[1,2]，北島　健[1,2,3]（[1]名大院・生命農学，[2]名大・生物機能セ，[3]名大・GCOE，[4]農業生物資源研・家畜ゲノム）

4A32a03　担子菌 *Flammulina velutipes* 由来エンド-*β*-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ FV 遺伝子の酵母での発現と X 線結晶構造解析

9:22　◦浜口　祐，海住宜広，篠原かな子，宮原郁子，田中里佳，Kuakarn Kursong[1]，Jarnee Kaurpiboon[2]，Tipaporn Limpaseni[1]，Piamsook Pongsawasdi[1]，伊藤和央（阪市大院・理，[1]チュラロンコン大・理，[2]タマサート大・医）

4A32a04　担子菌 *Flammulina velutipes* 由来エンド -*β*-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ FV のプロセシング酵素の精製とその同定

9:33　◦海住宜広，浜口　祐，後藤眞璃子，Kuakarun Krusong[1]，Jarunee Kaulpiboon[2]，Tipaporn Limpaseni[1]，Piamsook Pongsawasdi[1]，伊藤和央（阪市大院・理，[1]チュラロンコン大・理，[2]タマサート大・医）

4A32a05　担子菌 *Agaricus bisporus* 由来エンド-*β*-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ AB の遺伝子クローニングに関する研究

9:44　◦高橋剛生，　谷脇　聡，　浜口　祐，　岡　夕貴，Kuakarun Krusong[1]，Jarunee Kaulpiboon[2]，Tipaporn Limpaseni[1]，Piamsook Pongsawasdi[1]，伊藤和央（阪市大院・理，[1]チュラロンコン大・理，[2]タマサート大・医）

a06～a10 発表者の接続時間② 9:55～10:05

4A32a06　糖タンパク質 *N*-結合型糖鎖の付加状況の改善

10:05　◦高島　晶，天野純子（野口研・糖鎖生物）

4A32a07　アドレナリンに誘導される細胞表面ヘパラン硫酸糖鎖構造の変化

10:16　◦西田光貴，永見圭太郎[1]，金丸義敬[2]，矢部富雄[2]（岐阜大院・連農・生物資源，[1]岐阜大院・応生科・資源生命，[2]岐阜大・応生科・応用生命）

4A32a08　糖基質との相互作用に伴う“フォールディングセンサー” UDP-Glc:Glycoprotein Glucosyltransferase（UGGT）の構造変化に関する検討

10:27　◦迫野昌文[1]，武田陽一[1]，八須匡和[1]，瀬古　玲[1]，伊藤幸成[1,2]（[1]ERATO JST，[2]理研　基幹研）

4A32a09　*Aspergillus fumigatus* における lectin の認識糖鎖の特異性解析

10:38　◦三浦あゆみ，酒井香奈江，五ノ井透（千葉大学真菌医学研究センター）

4A32a10　レクチンプロファイリングによるブドウ球菌属表面糖鎖の識別と食品衛生試験への応用

10:49　◦今村幸治，竹内英明[1]，平山　真[2]，堀　貫治[2]（株式会社医学生物学研究所，[1]株式会社グライエンス，[2]広島大・生物圏科学）

講演番号：2C01p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ C校舎01会場

Pseudomonas putida 由来(*R*)-ヒドラターゼの基質認識アミノ酸の同定と基質特異性改変

Alteration of substrate specificity and identification of substrate recognition amino acid of (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase from *Pseudomonas putida*

○石塚　洸也[1]、佐藤 俊[2]、柘植　丈治[1]([1]東工大院・総理工、[2]産総研)
○Koya Ishizuka[1], Shun Sato[2], Takeharu Tsuge[1] ([1]Tokyo Institute of Technology, [2] AIST)

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、微生物が炭素源及び栄養源として体内に貯蔵するポリエステルであり、環境調和型のプラスチック材料として注目されている。PHAの微生物合成において、(*R*)-エノイルCoAヒドラターゼ(PhaJ)がモノマー供給酵素としてはたらいている場合がある。脂肪酸のβ酸化経路で生じるエノイルCoAがPhaJで水和され*R*体の3-ヒドロキシアシルCoAになり、これが重合されてPHAとなる。PhaJの基質特異性により、PHAのモノマー組成が変化する。*Pseudomonas putida* 由来のPhaJ1$_{Pp}$は、短鎖特異的な*Pseudomonas aeruginosa* 由来のPhaJ1$_{Pa}$と一次配列の相同性が高いにも関わらず、中鎖の基質に対しても活性を示すことが報告されている。本研究では、PhaJ1$_{Pp}$の基質認識に関わるアミノ酸を特定し、アミノ酸置換が基質特異性に及ぼす影響を調べた。

【方法】*Aeromonas caviae*由来のPhaJ$_{Ac}$において、Leu^{65}が基質特異性に関与していると報告されている。アミノ酸相同性解析の結果から、PhaJ$_{Ac}$のLeu^{65}に相当するPhaJ1$_{Pp}$のVal^{72}を変異のターゲットとした。*E. coli* JM109を利用し、野生型PhaJ1$_{Pp}$WTと、Val^{72}をLeu又はAlaに置換したPhaJ1$_{Pp}$V72L、PhaJ1$_{Pp}$V72Aを発現させた。アンピシリンを加えたLB培地で37℃に保ち培養し、菌がある程度増殖した時点でIPTGを添加して酵素の発現を誘導した。回収した菌体を超音波破砕後遠心し、上清を粗酵素サンプルとしてヒドラターゼ活性を測定した。また、野生型と改変体のPhaJ1$_{Pp}$をPhaC1$_{Ps}$と共に*E. coli* LS5218(*fadR*601, *atoC2*(Con))で発現させ、ドデカン酸を炭素源としてM9培地で培養し、PHA組成を分析した。培地には抗生物質のアンピシリンとカナマイシン、そしてドデカン酸の溶解度を上げるために界面活性剤Briji-35を添加した。

【結果】野生型PhaJ1$_{Pp}$粗酵素は、クロトニルCoA(C_4)にもオクテノイルCoA(C_8)に対してもヒドラターゼ活性を示した。一方、基質ポケット底面に位置し、基質特異性に関与されていると考えられるVal^{72}を側鎖が大きいLeuに置換した改変体粗酵素は、野生型と同等のC_4活性を示す一方で、C_8活性が著しく低下した。Val^{72}を側鎖が小さいAlaに置換した改変体は、ヒドラターゼ活性をほとんど示さなかった。*E. coli* LS5218の培養では、Leu置換体は野生型に比べて短鎖に対する基質特異性が強くなり、PHA蓄積量が向上した。Ala置換体を導入した菌体は、PHAの蓄積が低く、野生型酵素よりモノマー供給能が落ちたことが示された。以上のことから、PhaJ1$_{Pp}$においてVal^{72}は基質ポケットの底面に位置し、このアミノ酸残基側鎖の大きさにより基質特異性が決定されていることが示唆された。また、PhaJ1$_{Pp}$V72Aは発現が低かったにもかかわらず、宿主の生育に対して阻害的に働いた。

Polyhydroxyalkanoates, (*R*)-Specific enoyl-CoA hydratase, *Pseudomonas putida*

講演番号：2C01p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ C校舎01会場

グリセロール濃度がポリヒドロキシアルカン酸生合成に与える影響

Effect of glycerol concentration on bacterially biosynthesized polyhydroxyalkanoate

○神　貴志、柘植　丈治（東工大院・総理工）
○Takashi Kou, Takeharu Tsuge (Tokyo Institute of Technology)

【目的】バイオマス資源を原料として菌体内に蓄積されるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、熱可塑性や生分解性等の優れた性質を有することから、既存のプラスチックに代わる新たな材料として注目されている。PHA の物性改善を行う手段としては共重合化や高分子量化が挙げられ、一般的な PHA 合成細菌として知られる *Ralstonia eutropha* は植物油から共重合体 PHA を高収率で生産することができる。この共重合体 PHA の機械的強度は汎用ポリマーに近い値を示す一方で、植物油を炭素源として PHA を合成した場合、糖や脂肪酸を用いた場合と比較して低分子量になることが報告されている。これは、植物油の構成物質であるグリセロールが菌体内での PHA 合成を阻害したことが原因であると考えられるが、その効果について詳しい検討は行われていない。そこで本研究では、PHA の更なる物性改善を目指すべく、植物油に含まれるグリセロールが PHA の分子量に与える影響について調査した。
【方法】*Ralstonia eutropha* は植物油を資化する際、まず、リパーゼにより脂肪酸とグリセロールに分解する。*R. eutropha* のグリセロール資化能は低く、主に脂肪酸を代謝して PHA の生合成に利用する。遊離したグリセロールはそのまま系中に残存し、連鎖移動剤として機能することで PHA の分子量低下に関与していると推測される。そこで本研究ではグリセロールの分子量低下への影響を検証すべく、脂肪酸単一炭素源及び脂肪酸・グリセロール混合炭素源を用いて *R. eutropha* を培養し、生成ポリマーの分子量を比較した。また、混合炭素源ではグリセロール濃度を変化させ、生成ポリマーの分子量のグリセロール濃度依存性について検討した。
【結果】脂肪酸単一炭素源で培養した *R. eutropha* により合成された PHA の分子量に比べ、脂肪酸・グリセロール混合炭素源での培養で得られた PHA の分子量は著しく低下することが、本研究においても確認された。また、培地中のグリセロール濃度の増加にともない、生成ポリマーの分子量が低下することも確認された。これは、培地中のグリセロール濃度の増加に伴い、菌体内のグリセロール濃度も増加し、PHA 合成阻害が促進されたことが原因であると推測された。以上の結果から、植物油を炭素源とした PHA の生合成において、グリセロールは分子量低下に関与している可能性が示唆されたといえる。

Polyhydroxyalkanoate, glycerol, molecular weight

講演番号:2C01p04
講演日時、会場:3月23日14:22～ C校舎01会場

タイトル　ロイシンを前駆体とした側鎖分岐型ポリエステルの生合成

Title Enhanced Incorporation of 3-Hydroxy-4-Methylvalerate Unit into Biosynthetic Polyhydroxyalkanoate Using Leucine as a Precursor

○雑賀　あずさ、渡辺　世利子、阿部　英喜[1]、柘植　丈治（東工大院・総理工、[1]理研）

○Azusa Saika, Yoriko Watanabe, Hideki Abe[1], Takeharu Tsuge(Tokyo Tech, [1]RIKEN)

【目的】

P(3HB-*co*-3H4MV)は最も一般的なPHAであるP(3HB)の欠点を改善し得る材料であり，これまでのPHA共重合体と異なり糖単一炭素源から合成できる可能性を有している。しかし，実際にフルクトースのみを炭素源とした際の3H4MV分率は非常に低く，分率増加のためには3H4MVに構造の類似した脂肪酸の添加が必要であるのが現状である。本研究では，将来的な糖単一炭素源からのP(3HB-*co*-3H4MV)合成の前段階として，菌体が糖から合成可能な3H4MV前駆体を探索することを目的とした。

【方法】

本研究では,脂肪酸に代わる新たな前駆体として,菌体が糖から合成可能なアミノ酸に着目し，数種のアミノ酸による3H4MV分率増加効果を検証した。次いで，分率増加効果を示したアミノ酸を過剰合成できる変異株をゲノムへのランダム変異導入によって作成し，この株の宿主への利用が3H4MV分率増加につながるかを検証した。

【結果】

5種類のアミノ酸10 g/Lを，*Pseudomonas* sp. 61-3由来PHA重合酵素遺伝子*pha*C1$_{Ps}$を導入した*R. eutropha*にフルクトースと合わせて与え，培養したところ，L-ロイシンを添加した際に3H4MV分率が約2倍となり，L-ロイシンが3H4MV分率増加効果を有していることが明らかとなった。過剰にロイシンを添加した際に3H4MV分率が増加したことから，3H4MVはロイシンの分解産物を前駆体として合成されていることが示唆された。この結果に基づき，ロイシン過剰合成可能なロイシンアナログ耐性株の宿主への利用を検討した。従来の宿主である*R. eutropha*と作成した耐性株をフルクトースのみを炭素源として培養した結果，耐性株で有意な3H4MV分率の増加が見られ，ロイシンの過剰合成が3H4MV分率の増加につながることが示唆された。これらの耐性株の中でも特に高い3H4MV分率を示した株を選抜し，フルクトースを与えて培養した結果，従来の*R. eutropha*の約2倍の分率が実現された。しかし，この際の3H4MV分率は約1 mol%であり，さらなる分率増加のためには，ロイシン供給量増加以外のアプローチが必要であることが明らかとなった。これまでの結果を総合し，糖単一条件でも比較的高い3H4MV分率を示す耐性株に，3H4MV分率増加効果のあるロイシンをフルクトースと合わせて与えて培養した。その結果，3H4MV分率は約3 mol%に達し，これまでの最高分率を達成することができた。

Polyhydroxyalkanoate copolymer, 3H4MV precursor, leucine analog resistant mutant

講演番号：2C01p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ C校舎01会場

Corynebacterium glutamicum の細胞表層提示技術を用いたデンプンからのポリヒドロキシブタン酸(PHB)の直接生産

Direct production of polyhydroxybutyrate (PHB) from starch by cell surface engineering of *Corynebacterium glutamicum*

○津田 春奈、宋 育陽、松本 謙一郎、大井 俊彦、近藤 昭彦[1]、田口 精一（北大院・工・生機高、[1]神戸大院・工・応化）

○Haruna Tsuda, Yuyang Song, Ken'ichiro Matsumoto, Toshihiko Ooi, Akihiko Kondo[1], Seiichi Taguchi (Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [1]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

【目的】ポリヒドロキシブタン酸(PHB)は微生物が体内に合成・蓄積するポリエステルであり、生分解性を有するプラスチック材料として利用できる。PHBは、主に*Ralstonia eutropha*や大腸菌などのグラム陰性菌を宿主とした生産研究がされている。我々は、医療材料や食品用材料への適用を考慮したプラスチックを生産するために、過去の研究において内毒素を含まず安全性の確立されているグラム陽性菌であるコリネ菌（*Corynebacterium glutamicum*）を宿主とし、グルコースからPHBを生産する系を構築した。一方、コリネ菌の細胞表層にα-アミラーゼが提示されるように染色体上に遺伝子導入した組換え株(細胞表層提示株)は、優れたデンプン資化能力を示すことが分かっている。そこで本研究では、グルコースに代わって安価なバイオマスであるデンプンを炭素源として用いて、PHBを直接コリネ菌で生産することを目的とした。

【方法および結果】α-アミラーゼを細胞表層に提示したコリネ菌の変異株に、PHBの生合成に必要な酵素β-ketothiolase (PhaA)、NADPH-dependent acetoacetyl-CoA (PhaB)、PHB synthase (PhaC)をコードする遺伝子群を導入した。組換え株を栄養培地で増殖させた後、デンプンを唯一の炭素源とした無機塩培地に植菌し振とう培養した。培養後の菌体に含まれるPHBを濃硫酸中で加熱する事によりクロトン酸に変換し、このクロトン酸をHPLCで定量する事によりPHB蓄積量を調べた。その結果、α-アミラーゼ―遺伝子を持たないコリネ菌（親株）のPHB生合成系遺伝子導入株は、PHBを合成しなかったのに対し、α-アミラーゼを発現する株ではPHBの蓄積が見られた。このことから、α-アミラーゼを表層提示したコリネ菌は、デンプンを炭素源としてPHBを直接生産できることが分かった。

PHB, *Corynebacterium glutamicum*, Starch

講演番号:2C01p06
講演日時、会場:3月23日14:44～ C校舎01会場

アセトアセチルCoAレダクターゼ高活性変異体の解析とそれを用いた*Corynebacterium glutamicum* によるPHB生産の増強

Improvement of PHB production by highly active mutant of acetoacetyl-CoA reductase in *Corynebacterium glutamicum*

○ 渡辺 剛志、宋　育陽、松本 謙一郎、大井 俊彦、田口 精一（北大院・工・生機工）
○ Tsuyoshi Watanabe, Yuyang Song, Ken'ichiro Matsumoto, Toshihiko Ooi, Seiichi Taguchi (Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

【目的】コリネ菌（*Corynebacterium glutamicum* ）は、有害な内毒素を含まず安全性が高いことから、アミノ酸生産菌として工業的に広く利用されている。我々はこれまでに、コリネ菌に*Ralstonia eutropha* 由来のポリヒドロキシブタン酸(PHB)生合成系遺伝子群（*phaA, phaB, phaC*）を導入する事により、グルコースを炭素源としてPHB、及び関連する共重合体の生産系を確立している。*phaB*遺伝子がコードするアセトアセチルCoA(AcAcCoA)レダクターゼ(PhaB)は、PHBのモノマー供給酵素であり、NADPHを補酵素としてAcAcCoAを3-ヒドロキシブチリルCoA（3 HB-CoA)へと還元する酵素である。PhaBの反応が、PHB生合成の律速段階であると考えられていたことから、PHB生産性向上を目的としてPhaBの進化工学的改変を行い、高活性優良変異体を取得した。本研究では、PhaB高活性変異酵素のNADPHとAcAc-CoAの両基質に対する酵素動力学的解析を行うと共に、PhaB変異体遺伝子を*C. glutamicum* に導入し、PHBの生産性に与える影響を調べた。

【方法】PhaBの変異型および野生型酵素のHis-tag融合タンパク質を組換え大腸菌を用いて発現し、アフィニティーカラムにより精製した。各基質濃度におけるPhaB活性を、反応により消費されるNADPHの減少速度を340 nmで測定することで求め、速度論パラメーターを算出した。PHB生産を行うために、*phaCAB*遺伝子群をエレクトロポレーション法により*C. glutamicum* に導入した。本菌を栄養培地（CM2G）に接種し30℃で12時間前培養後、無機塩培地（MMTG）へと接種して、さらに72時間培養を行った。得られた菌体を凍結乾燥後、濃硫酸を加えた加熱処理により菌体内に蓄積されたPHBをクロトン酸に変換し、HPLC分析によりPHB蓄積率を算出した。

【結果】酵素反応解析から、PhaB変異酵素および野生型酵素のAcAc-CoAに対するk_{cat}/K_m は、それぞれ、2.65×10^7 $M^{-1}s^{-1}$と1.80×10^7 $M^{-1}s^{-1}$であり、変異酵素が野生型よりも1.5倍高いことがわかった。一方、NADPHに対するk_{cat}/K_m は、それぞれ、5.85×10^5 $M^{-1}s^{-1}$と6.85×10^5 $M^{-1}s^{-1}$であり、変異酵素の方が15%低かった。しかし、微生物細胞内のNADPH濃度はPhaBのK_mよりも高いと考えられることから、NADPHに対するk_{cat}/K_m の低下がPHBの生産性に与える影響は小さいと推定された。実際に、変異酵素遺伝子を導入した*C. glutamicum* の組換え株は、野生型酵素遺伝子導入株に比べて2倍のPHB蓄積率を示した。このことから、PhaBの高活性変異体を用いてPHB生産を向上させることができることが分かった。

Acetoacetyl-CoA reductase, Polyhydroxybutyrate, *Corynebacterium glutamicum*

講演番号：2C01p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ C校舎01会場

組換え大腸菌による(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸の生産

Production of (*R*)-3-hydroxybutyrate by recombinant *Escherichia coli*

○大井 俊彦、松本 謙一郎、大慶 岳洋、本間 以祝、渡辺 剛志、田口 精一（北大院・工・生機高）

○Toshihiko Ooi, Ken'ichiro Matsumoto, Takehiro Ohkei, Inori Honma, Tsuyoshi Watanabe, Seiichi Taguchi (Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

【目的】微生物が菌体内に合成蓄積するポリ(3-ヒドロキシブタン酸)[P(3HB)]は、(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸(3HB)が重合したポリエステルであり、再生可能なバイオマス資源を原料として生物合成可能な、生分解性プラスチック素材として注目されている。一方、P(3HB)のモノマー成分である(*R*)-3HBは、光学活性を持つヒドロキシ酸であることから、光学活性を持つ抗生物質やその他化合物のキラル合成のビルディングブロックとして有用である。微生物発酵法による3HBの生産は、選択性の高い酵素反応によって合成されるため、光学純度の高い3HBを得られることが利点である。既存の3HB生産法としては、P(3HB)生産菌にP(3HB)を蓄積させた後にP(3HB)分解酵素を発現させ、P(3HB)をモノマー単位である3HBに加水分解して細胞外に分泌させる方法により、7.3 g/Lの生産が達成されている。しかし、本方法は二段培養が必要で煩雑であり、また多くの菌体量を確保する必要があることから、P(3HB)を経由せずに3HBを合成する方法が検討されている。例えば、P(3HB)の生合成中間体である3HB-CoAからチオエステラーゼによりCoAを遊離させることで、3HBを分泌生産する方法が報告されている。しかしながら、この方法ではP(3HB)の分解による方法よりも3HBの生産性が低かった(2.4 g/L)。そこで本研究では、3HBのより効率的な生産のため、P(3HB)を経由せずに3HBを直接合成可能な新たな代謝経路を設計し、組換え大腸菌を用いて3HBの生産条件を検討した。

【方法】　P(3HB)生合成遺伝子群を導入した組換え大腸菌を、1%グルコースを含むLB培地を用いて30℃で振盪培養した。培養上清に含まれる3HBは、AminexHPX-87Hカラム(Bio rad)を用いたHPLCにより分析した。検出にはRI検出器を用い、3HB濃度は標準3HB試料から作成した標準曲線より算出した。

【結果】　組換え大腸菌を48時間培養し、得られた培養上清中のグルコース、3HB濃度の経時変化を測定した。その結果、24時間後にはグルコースが完全に消費され、3HBの蓄積が確認された。次いで、グルコースの逐次添加培養を行ったところ、3HBの生産性は向上した。さらに生産性を向上させるため培養条件を検討している。

(*R*)-3-hydroxybutyric acid, (*R*)-hydroxycarboxylic acid, Chiral compound

講演番号：2C01p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎01会場

進化工学による新規乳酸重合酵素の探索
Screening of novel lactate polymerizing enzyme by evolutionary engineering

○越智　杏奈、大場　貴史、坂井　浩平、松本　謙一郎、柘植　丈治[1]、田口　精一
（北大院・工・生機高, [1]東工大・総理工）
○Anna Ochi, Takashi Ooba, Kohei Sakai, Ken'ichiro Matsumoto, Takeharu Tsuge[1], Seiichi Taguchi (Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [1]Dept. Innov. Eng. Mat., Tokyo Inst. Technol.)

【目的・背景】

ポリ乳酸（PLA)は、石油由来樹脂の代替材料として最も実用化が進んでいるバイオプラスチックであり、高い生体適合性を有することから医療分野でも利用されている。現在 PLA は、微生物発酵により生産された乳酸を原料として、主に重金属触媒を用いた化学重合により生産されている。医療や食品などの用途に利用するためには、有害な重金属触媒の残留の可能性のない合成方法が望ましい。最近、我々の研究グループでは、乳酸の CoA 体であるラクチル CoA を重合可能なポリエステル重合酵素（乳酸重合酵素）を世界で初めて発見し、この酵素を用いて乳酸ポリマーの完全生合成系を構築した。本研究では、生合成乳酸ポリマーの効率的な生産のため、より優れたポリマー生産能力を有する乳酸重合酵素を取得することを目的とした。最初に発見された乳酸重合酵素は、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来のポリヒドロキシアルカン酸（PHA)重合酵素の高活性変異体であり、野生型酵素は乳酸重合活性を持たない。また、天然で乳酸ポリマーの合成菌はこれまで見つかっていないことから、乳酸重合酵素は天然に広く分布している可能性は低いと推定された。そこで、既知の PHA 重合酵素に変異を導入し、新たな乳酸重合酵素を創製することを検討した。

【方法・結果】

Pseudomonas sp. 61-3 由来 PHA 重合酵素（$PhaC1_{Ps}$)と相同性を有する PHA 重合酵素遺伝子をターゲットとし、$PhaC1_{Ps}$ の変異部位に該当する部位に総アミノ酸置換を施した。この変異型 PHA 重合酵素遺伝子を、モノマー供給系酵素遺伝子とともに大腸菌に導入し、ポリマー蓄積条件で培養を行った。得られた菌体からポリマーをクロロホルムを用いて抽出し、エチルエステル化したサンプルを GC/MS で分析する事により、ポリマー蓄積率とモノマー組成を算出した。その結果、いくつかの変異体遺伝子導入株において、乳酸ポリマーの蓄積が確認され、新規の乳酸重合酵素の創出に成功した事が分かった。

Lactic acid, polyhydroxyalkanoate, PHA synthase,

講演番号:2C01p09
講演日時、会場:3月23日15:27～ C校舎01会場

組換え大腸菌における不飽和モノマーを導入した乳酸ベースポリマーの生合成

Biosynthesis of novel lactate (LA)-based polyester incorporating unsaturated monomer unit by using recombinant *Escherichia coli*.

○孫　健、正瑞　文、松本　謙一郎、田口　精一（北大院・工・生機高）
○Jian Sun, Fumi Shozui, Ken'ichiro Matsumoto, Seiichi Taguchi (Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

【目的】Recently, we established a lactate(LA)-based polyesters biosynthesizing system in recombinant bacteria expressing a LA-polymerizing enzyme (LPE) which is an engineered derivative of polyhydroxyalkanoates (PHA) synthase. By applying this platform, we were able to synthesize new LA-based polyesters having favorable properties by combining LA and other PHA monomer units. For example, one of the synthesized copolymers, P(LA-*co*-3-hydroxybutyrate(3HB)-*co*-3-hydroxyvalerate(3HV)) exhibits transparency like polylactate (PLA), and 30-fold higher stretch than PLA, which is expected to be used in wider range of applications. For further value addition, in this study, we attempted to biosynthesize LA-based polyester combining unsaturated PHA monomer unit which has the reactive site for potential chemical modification to attach with some functional side chains such as hydroxy and amino groups.

【方法】Plasmid containing (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase (PhaJ4, for 3-hydroxyacyl-CoA supply) gene from *Pseudomonas aeruginosa*, propionate CoA-transferase (PCT, for LA-CoA supply) gene from *Megasphaera elsdenii* and LPE gene from *Pseudomonas* sp. 61-3 was introduced into *Escherichia coli* LS5218. The recombinant cells were cultivated aerobically at 30 ℃ on LB medium containing glucose and 4-pentenoic acid. Polymers were extracted from the lyophilized cells with chloroform at room temperature for 48 hours. Monomer composition and molecular weight of extracted polymer were estimated by NMR and GPC analysis respectively.

【結果】The cells grown under the presence of 4-pentenoic acid accumulated 0.98 wt% polymer. Proton NMR analysis indicated this polymer contained 3.1 mol% of 3-hydroxy-4-pentenoate (HPE) together with LA, 3HV and 3HB monomers. The success in biosynthesis of P(LA-*co*-3HB-*co*-3HV-*co*-HPE) copolymer suggests that further chemical modification to LA-based polyester is possible.

Bio-based plastic , Polyhydroxyalkanoates, Biosynthesis

講演番号：2C01p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎01会場

組換え大腸菌による乳酸およびグリコール酸ベース新奇バイオプラスチックの生合成と物性解析

Biosynthesis of lactate- and glycolate-based polyesters in recombinant *Escherichia coli* and their property analysis.

○斯波　哲史，石山　絢子，松本　謙一郎，田口　精一（北大院・工・生機高）
○Tetsufumi Shiba, Ayako Ishiyama, Ken’ichiro Matsumoto, Seiichi Taguchi (Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

【目的】ポリ乳酸(PLA)は、乳酸(LA)から合成されるバイオプラスチックであり、優れた透明性を有することから、現在最も実用化が進んでいる。しかし、PLAは硬質性の材料であり、柔軟性が低いのが欠点であった。一方、天然の微生物により合成される3-hydroxyalkanoate(3HA)のポリマーは軟質な素材である。我々は、組換え大腸菌に新奇な乳酸重合酵素を導入することにより微生物細胞内で乳酸を含むポリマーの生合成にはじめて成功した。本研究では、この合成系を利用してLAと中鎖の 3HAモノマーの共重合体P(LA-*co*-3HA)の合成を試みた。LAモノマーと3HAモノマーの共重合化により、軟質性の向上が期待できる。一方、グリコール酸ポリマーは高い生分解性と生体適合性を有することから、主に医療材料として用いられている。我々は、本系を利用してP(LA-*co*-3HA)およびP(glycolate-*co*-3HA)の生合成を試みた。
【方法と結果】大腸菌においては、3HAモノマー(3HA-CoA)は脂肪酸のβ酸化系から供給され、LAモノマー(LA-CoA)は糖から解糖系により供給されるのが一般的である。しかし、糖が存在すると脂肪酸の代謝が抑制されるため、解糖系による乳酸供給とβ酸化系を組み合わせても、P(LA-*co*-3HA)を合成することはできなかった。そこで、乳酸を前駆体として直接利用した培養を試みた。LA-CoAを合成するCoA転移酵素、エノイルCoAを水和し3HA-CoAを供給するエノイルCoA-ヒドラターゼ(PhaJ4)、乳酸重合酵素をコードする遺伝子を導入した組換え大腸菌を、乳酸およびドデカン酸を含む培地で培養した結果、乳酸ユニットを17mol%含む新奇コポリマーP(LA-*co*-3HA)を合成することができた。さらに本手法を用いて、外部添加するモノマー基質を乳酸と類似の構造を有するグリコール酸に置き換えて同様の実験を行った。その結果、グリコール酸ユニットを17mol%含む新奇コポリマーP(glycolate-*co*-3HA)の生合成に初めて成功した。
　次に、乳酸およびグリコール酸分率の高いコポリマーを生合成するため、LA-CoAを合成するCoA転移酵素と乳酸重合酵素遺伝子のみを導入した組換え大腸菌で上記と同様の実験を試みた。その結果、乳酸およびグリコール酸分率の高いP(LA-*co*-3HA)，P(glycolate-*co*-3HA)の生合成に成功した。また、導入遺伝子の上流に存在する*lac*プロモーターを利用し、IPTGを添加することにより酵素の発現量を増加させることを検討した。その結果、ポリマー蓄積率を最大で約3倍に向上させることができた。さらにスケールアップ培養を行い、新奇コポリマーの物性測定を行った。

Lactate, Glycolate, 3-hydroxyalkanoate

講演番号:2C01p11
講演日時、会場:3月23日15:49～ C校舎01会場

*Gluconobacter frateurii*によるグリセリン酸生産におけるメタノールの影響

Effect of methanol addition on glyceric acid production by *Gluconobacter frateurii*

○佐藤　俊、羽部　浩、北本　大、榊　啓二（産総研）
○Shun Sato, Hiroshi Habe, Dai Kitamoto, Keiji Sakaki (AIST)

【目的】近年、生産量が急増しているバイオディーゼル燃料は、植物油等の油脂のアルカリ条件における加メタノール分解により生産されている。この反応では、過剰量のメタノールが用いられるため、副生するグリセリンはメタノールを含むアルカリ溶液となり、この副生グリセリンの有効利用法の開発が望まれている。我々はこれまでに、酢酸菌*Gluconobacter frateurii*が、グリセリンの片末端水酸基を効率よく酸化し、100 g/L以上のグリセリン酸（GA）を生産することを見出した。しかしながら、この微生物によるGA生産において副生グリセリンを原料に用いた場合、メタノール等の不純物により生産性が低下することが分かった。そこで本研究では、GA生産におけるメタノールの影響について、副生グリセリンのモデル溶液を用いたジャーファーメンターでの実験を行い、生産物の解析および細胞内遺伝子の発現解析を行ったので報告する。
【方法】*G. frateurii* NBRC103465株によるグリセリン酸生産は、５ L容のジャーファーメンター中2.5 Lのグリセリン培地（グリセリン, 170 g/L; ポリペプトン, 10 g/L; 酵母エキス, 1 g/L; KH_2PO_4, 0.9 g/L; K_2HPO_4, 0.1 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L）で行い、30 ℃、500 rpm、0.5 vvmの条件で培養した。GA生産に伴うpH低下の調製剤として、副生グリセリンのモデル溶液（66 wt% グリセリン、30 wt% メタノール、1 M NaOH）を用い、pH 6に制御した。培養液の分析はHPLCで行い、細胞の増殖は600 nmのOD測定により評価した。細胞内遺伝子発現の解析は、独自に解読した*G. frateurii* NBRC103465株のドラフトゲノムの配列情報をもとにDNAマイクロアレイを作製し、培養開始後12時間および24時間経過した細胞から抽出したRNAを用いて行った。
【結果】pH調製剤に副生グリセリンのモデル溶液（メタノール含有）を用いた場合、メタノールを含まない場合と比較して、培養84時間でGAの生産量が73.3 g/Lから9.5 g/Lに低下、GA生産における副産物であるジヒドロキシアセトン（DHA）の生産量は18.8 g/Lから53.3 g/Lに増加した。また、副生グリセリンのモデル溶液を用いた系の培養液中のメタノール濃度は培養終了時に約3%であり、メタノールの存在に関わらず細胞の増殖に変化は見られなかった。これらの結果から、*G. frateurii*は、メタノールが存在する場合にGA生産が阻害され、その結果DHAの生産量が増加することが示唆された。次に、作製したDNAマイクロアレイを用いて、上記条件で12時間および24時間培養した*G. frateurii*細胞内の遺伝子発現状態を、メタノールの有無で比較解析を行った。その結果、遺伝子発現量が増加した遺伝子の中で、メタノール解毒に関わる遺伝子が複数存在することが分かった。しかしながら、GA生産に関与すると推定される酵素遺伝子は見出されず、メタノールによるGA生産性の変化は、グリセリンからGAへの変換を触媒する酵素に対して、メタノールが直接作用することでGAへの触媒反応が阻害されるためではないかと推定された。

glyceric acid, *Gluconobacter frateurii*, glycerol use

講演番号:2C01p12
講演日時、会場:3月23日16:10～ C校舎01会場

Halomonas sp. KM-1による微好気条件における3-ヒドロキシ酪酸の分泌生産

Production and secretion of (R)-3-hydroxybutyric acid under microaerobic conditions by *Halomonas* sp. KM-1

○河田 悦和、石 蓮花、川崎 一則、茂里 康(産技総研健康工学)
○Yoshikazu Kawata, Lian Hua Shi, Kazunori Kawasaki, Yasushi Shigeri (Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST))

【目的】国内外で、非可食の木材・草本、農業残渣や、食用に不適な油脂等を原料として、バイオエタノールやバイオディーゼルの生産、研究が進んでいるが、大量に副生するC5糖やバイオディーゼル廃グリセロールの利活用が課題となっている。我々のハロモナスKM-1株は、グルコースのみならず、利用が難しいキシロース、アラビノースを同速度で利用し、廃グリセロールも直接利用が可能である。さらに、高アルカリ中程度高塩濃度環境で生育するため、雑菌の混入を認めず、培地を殺菌する必要がない。利用が難しい余剰バイオマスの利活用を目指し、まずは、菌体内に蓄積するバイオプラスチックPHBを分解して、培地に3-ヒドロキシ酪酸を分泌させることを目的に検討を行った。
【方法】グリセロールを炭素源に、*Halomonas* sp.KM-1を好気条件で培養し、バイオプラスチックPHBを蓄積した。その後、供気条件を、好気、微好気、静置それぞれの条件に変更し、培養を継続した。菌体内のPHB量、培地中の3-ヒドロキシ酪酸の量をそれぞれGC等で分析した。同時に、微好気条件での菌体の状況を確認するために、培地へのゲノムDNAの溶出量、電子顕微鏡による観察を行った。
【結果】10%グリセロールを含む培地を用い、好気条件で48時間培養し、16.4 g/LのPHBを菌体内に蓄積した。これを微好気条件に移し、18時間後に15.2 g/Lの3-ヒドロキシ酪酸を培地に分泌した。この値は報告された中で最高レベルであった。また、培地中のゲノムDNAの濃度は、好気、微好気条件でほぼ等しく、嫌気条件の場合と比べ1/100以下であったため、ほとんど溶菌はないものと推定された。さらに、好気条件、微好気条件の菌体を、電子顕微鏡にて観察した結果、双方とも菌体の溶菌は見られず、好気条件の際に蓄積されたPHB顆粒が、微好気条件では、サイズ、数ともに減少していることを確認した。今後、本菌が、木材糖化液や廃グリセロール等をそのまま炭素源を利用し生育すること、培地の滅菌を要せず省エネルギー培養が可能なこと、光学活性のある3-ヒドロキシ酪酸などができること等の優位性を生かし、バイオリファイナリー生産に向けた基礎技術の確立を目指す。

Halomonas, (R)-3-hydroxybutyric acid, microaerobic condition

講演番号：2C01p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ C校舎01会場

遺伝子組換えメチロトローフによるアルコールからのポリヒドロキシアルカン酸生合成

Polyhydroxyalkanoate biosynthesis from alcohols by recombinant methylotrophs

○折田　和泉、Nurbudianto、中村　聡、福居　俊昭（東工大院生命理工・生物プロセス）
○Izumi Orita, Nurbudianto, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. & Biotechnol., Tokyo Tech.)

【目的】自然界の多くの微生物がエネルギー貯蔵物質として体内に蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、生分解性・生体適合性を有するポリエステルとして注目されている。PHAはモノマー組成を変化させることで物性を制御できることから、高物性の PHA を効率よく生産するための微生物育種が盛んに行われている。本研究では、次世代資源として有用なメタノールやエタノールを単一炭素源とし、様々なモノマー組成の PHA を効率的に生産する菌株の取得を目的として、メタノール資化性細菌（メチロトローフ）の代謝改変を行った。

【方法】メチロトローフが有する特徴的な代謝を最大限に利用するために、異なるC1化合物資化経路を有する*Methylobacterium extorquens*と*Methylobacillus flagellatus* を育種の宿主とした。前者はセリン経路を有する通性メチロトローフであり、炭素数４のモノマーのみから成るポリ（3-ヒドロキシブタン酸）[P(3HB)]を生合成することが知られている。一方、後者はリブロースモノリン酸経路でホルムアルデヒドを固定する偏性メチロトローフであり、PHA生合成能を有さない。*M. extorquens*において野生型のPHA重合酵素を広基質特異性のPHA重合酵素と置換した株（AM1CAc株）内で、クロトニル-CoA レダクターゼ/カルボキシラーゼなどのモノマー供給酵素遺伝子を発現した。また、*M. flagellatus*の代謝改変として、PHA合成酵素遺伝子群 (*phaA*, *phaB*, および*phaC*) を本菌のメタノールデヒドロゲナーゼのプロモーターを配した広宿主域ベクター上で発現し、メタノールを単一炭素源にして培養した。培養後の菌体を凍結乾燥し、ガスクロクロマトグラフィーに供することで、PHA蓄積率とその組成を調べた。

【結果】AM1CAc株はメタノールを単一炭素源として炭素数４と炭素数６のモノマーとの共重合PHAであるポリ（3-ヒドロキシブタン酸-*co*-3-ヒドロキシヘキサン酸）を蓄積する。モノマー供給酵素遺伝子を発現させた結果、PHA蓄積量および炭素数６の第二モノマー分率の向上を認めた。また、*M. flagellatus*の*phaABC*発現株はメタノールを原料としてP(3HB)を合成した。現在、*phaABC*発現株を宿主としてPHAの前駆体であるアセチル-CoAの供給量を強化するための代謝改変を行っている。

Methylotroph, Methanol, Polyhydroxyalkanoate

講演番号：2C01p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎01会場

RNAシーケンシングによるポリエステル生産菌*Ralstonia eutropha*のトランスクリプトーム解析

Transcriptome analysis by RNA-sequencing in polyhydroxyalkanoate-producing bacterium *Ralstonia eutropha*

○清水　理恵、折田　和泉、鈴木　穣[1]、中村　聡、福居　俊昭（東工大院生命理工・生物プロセス、[1]東大院新領域・先端生命科）

○Rie Shimizu, Izumi Orita, Yutaka Suzuki[1], Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui（Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. & Biotecnol., Tokyo Tech., [1]Dept. Med. Genome Sci., Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. of Tokyo）

【目的】グラム陰性通性無機独立栄養微生物である水素細菌*Ralstonia eutropha*は、糖や脂肪酸などを炭素源として生分解性バイオマスプラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）を効率よく生合成することで知られている。これまでに各種のPHA生合成菌に対して様々な研究がなされてきたが、PHA生合成時の代謝の全体像や制御機構についてはいまだ多くのことが不明である。そこで本研究では*R. eutropha*を対象として、転写産物の網羅的測定（トランスクリプトーム解析）を行い、PHA生合成とその制御を含めた代謝経路について知見を得ることを目的とした。

【方法】本研究では高速シークエンサーを用いたRNAシーケンシングによるトランスクリプトーム解析を行った。*R. eutropha* H16株（野生株）をフルクトースを単一炭素源として培養し、増殖期、PHA蓄積期、静止期の3つのフェーズで菌体を回収した。菌体から抽出したtotal RNAについて細菌rRNA特異的なプローブを用いたrRNA除去を2回行うことでmRNAを濃縮した。得られたRNAを断片化した後にランダムプライマーによる逆転写を行うことで二本鎖cDNAを合成し、その両端へのアダプター連結とPCR増幅を行った。調整したサンプルについてIllumina Genetic Analyzer IIを用いて決定した36 bpタグ配列を解析した。

【結果】各サンプルの配列決定の結果、*R. eutropha* H16ゲノムに完全一致する配列を約3700万ー4500万個得たが、このうち約75ー94%はrRNAの配列であった。rRNAの除去が完全ではなかったものの、rRNA以外の領域にマッピングされた配列は約300万ー1000万個と、転写解析に十分な数が得られた。フルクトース培養での各フェーズについての転写挙動を比較したところ、アセチル-CoAからのPHA生合成経路を構成する*phaC1-A-B1*オペロン（A1437-A1438-A1439）の転写はどのフェーズでも構成的に強く転写されていた一方で、PHA顆粒結合タンパク質をコードする*phaP1*はPHA蓄積期で強く誘導されていた。ピルビン酸代謝の主要酵素であるピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体遺伝子群はどのフェーズでも共通して転写が活発であった。またPHA蓄積期にCO_2固定を担うカルビンサイクルに関連する酵素遺伝子の転写が強く誘導されていることが示された。増殖期にはTCAサイクルに関与する遺伝子の転写が活発なのに対し、イソクエン酸リアーゼやリンゴ酸シンターゼはPHA蓄積期・静止期に強く転写誘導されていたため、増殖期後のグリオキシル酸サイクルへのフラックス迂回が示唆された。

transcriptome, RNA sequencing, high-throughput sequencer, *Ralstonia eutropha*, polyhydroxyalcanoates

講演番号：2C01p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ C校舎01会場

代謝工学のための大腸菌染色体DNAへの遺伝子多重導入法

Multiple insertions of desired genes into *E. coli* chromosome for metabolic engineering

○駒 大輔、山中 勇人、森芳 邦彦、大本 貴士、酒井 清文（阪市工研）
○Daisuke Koma, Hayato Yamanaka, Kunihiko Moriyoshi, Takashi Ohmoto, Kiyofumi Sakai (OMTRI)

【目的】有用化合物を微生物生産するための代謝系を構築するには、多数の遺伝子を染色体DNAへ導入する技術が重要である。λファージのRed相同組換えを用いた染色体遺伝子置換法は、染色体DNA上での置換部位をPCRプライマーの設計によって選択することが可能であり、非常に便利な手法である。この手法は、おもに染色体上の遺伝子の欠失や、プロモーターなどの遺伝子発現調節領域の改良に用いられている。一部では、新たな遺伝子を染色体DNAへ導入する際に用いられているが、導入可能な遺伝子数は限定的である。この理由として、多数の遺伝子を導入する場合には、先に導入したフラグメントと新たに挿入するフラグメントの間で相同組換えを起こすためであると考えられる。本研究では、この問題を解決するために、Red相同組換え法にフリパーゼ（FLP）/フリパーゼ認識（FRT）部位特異的組換えとP1ファージによる普遍形質導入を組み合わせ、染色体DNAへの遺伝子多重導入法を確立することを目指した。
【方法】プラスミドpET21a-FRTの*Nde*I-*Xho*Iサイトに*lacZ*遺伝子を導入し、組換えプラスミドpARO157を作製した。この組換えプラスミドをテンプレートDNAとして、PCRによりFRT-Km-FRT-*lacZ*フラグメントを増幅した。なお、PCRプライマーには、染色体DNAと相同性を示す50ヌクレオチドの配列を付加した。このフラグメントをλRed組換え酵素発現株BW25113(DE3)/pKD46に導入し、Red相同組換えを誘発して染色体DNAの6か所の位置へと別々に挿入した。さらにこれらの染色体上の*lacZ*遺伝子を、FLP/FRT部位特異的組換えとP1普遍形質導入を用いることで段階的にアセンブリングした。なお、*lacZ*遺伝子の染色体DNAへの導入は、各導入段階においてPCR法により確認した。
【結果】モデル遺伝子として、発現量の定量が容易な*lacZ*遺伝子を用いた。Red相同組換えにより、*lacZ* 遺伝子を染色体DNA上の異なる部位に1コピー導入した株を6種類作製した。これらを用いて、FLP/FRT部位特異的組換えによる薬剤耐性マーカーのリサイクリングと、P1ファージによる普遍形質導入を交互に行い、染色体上に2～6コピーの*lacZ*遺伝子を持つ多重導入株を段階的に作製した。

作製した*lacZ*遺伝子の多重導入株を、SDS-PAGE解析とβ-ガラクトシダーゼ活性の測定により評価した。SDS-PAGE解析の結果、導入コピー数に応じて、β-ガラクトシダーゼの発現量の増加が認められた。また活性測定の結果、3～4コピーの遺伝子を導入した場合、プラスミドベクターを用いて発現させた場合と同等の比活性（U/mg）を示し、それ以上のコピー数の遺伝子を導入した場合ではより高い比活性を示した。

Escherichia coli, chromosomal engineering, gene insertion

講演番号：2C01p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ C校舎01会場

シキミ酸経路の拡張による芳香族化合物の生産

Production of aromatic compounds by expanded shikimate pathway

○酒井 清文、駒 大輔、山中 勇人、森芳 邦彦、大本 貴士（阪市工研）
○Kiyofumi Sakai, Daisuke Koma, Hayato Yamanaka, Kunihiko Moriyoshi, Takashi Ohmoto (OMTRI)

【目的】持続可能な物質生産システムを構築するために、バイオマスの有効活用について種々検討がなされている。我々は、バイオマス原料から工業原料としての芳香族化合物を生産するために、その基盤技術の確立を目指して研究を行っている。芳香族アミノ酸であるチロシンやフェニルアラニンを出発物質として、種々の遺伝子を大腸菌の染色体ＤＮＡに導入し、芳香族系ポリマーの原料をはじめとする有用な芳香族化合物の生産について検討している。
【方法】T7p-*aroF*^{fbr}-*tyrA*^{fbr}またはT7p-*aroF*^{fbr}-*pheA*^{fbr}遺伝子を染色体DNAに導入した大腸菌株AR-G2（チロシン高生産菌）とAR-G91（フェニルアラニン高生産菌）を基本菌株として用いた。この菌株に染色体多重遺伝子導入法を用いて、大腸菌および外来生物種の遺伝子を染色体DNA上に導入し、11種類の芳香族化合物をグルコースより生産するための菌株を作製した。
【結果】①AR-G2株の染色体DNAに、*Cupriavidus necator*由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を導入し、グルコースから4-ヒドロキシフェニル乳酸を生産する菌株を作製し、また、AR-G91株に同酵素遺伝子を導入してフェニル乳酸生産菌を作製した。　②AR-G2株の染色体DNAに*Pseudomonas fluorescens*由来のチロシンーアンモニアリアーゼ遺伝子を、さらに*Bacillus subtilis*由来のフェノール酸デカルボキシラーゼ遺伝子を導入することで、クマル酸生産菌と4-ヒドロキシスチレン生産菌を作製した。一方、AR-G91株の染色体DNAに*Aspergillus oryzae*由来のフェニルアラニンーアンモニアリアーゼ遺伝子を導入することで、桂皮酸生産菌を作製した。　③AR-G2株またはAR-G91株の染色体DNAに、*Azospirillum brasilense*由来のフェニルピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を導入した場合、グルコースを原料として4-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドまたはフェニルアセトアルデヒドが生成することが予測された。しかしながら、実際には、前者では4-ヒドロキシフェニル酢酸（4HPA）と4-ヒドロキシフェニルエタノール（4HPE）が、後者ではフェニルエタノール(PE)とフェニル酢酸（PA）の生成が認められた。4HPAおよびPAの生成に関しては、大腸菌に内在するフェニルアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ（FeaB）が関与すると考えられた。一方、4HPEおよびPEの生成に関しては大腸菌では該当する酵素の報告はなく、ある種のデヒドロゲナーゼが関与すると考えられた。11種類のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子について検討した結果、3種類の遺伝子が関与する可能性が示唆された。これらのうちの1種類については、高発現させることで、4HPEとPEの生産量の増加と4HPAやPAの生産量の大幅な減少が観察され、新規な酵素であると推察された。

Escherichia coli, aromatic compound, metabolic engineering

講演番号:2C01p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ C校舎01会場

遺伝子組換えコリネ型細菌によるフェノール生産 Ⅰ:フェノール生合成経路の代謝設計

Phenol production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* I. Metabolic design of phenol biosynthesis pathway.

○須田雅子、山本省吾、郡司 渉、茂木康浩、平賀和三、乾 将行、湯川英明（GP技術研究組合、RITE）

○Masako Suda, Shogo Yamamoto, Wataru Gunji, Yasuhiro Moteki, Kazumi Hiraga, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa (Green Phenol Technology Research Association, RITE)

【目的】地球温暖化及び化石資源枯渇問題を背景に、再生可能資源を原料とした化学品の製造は、バイオ燃料製造と並び大きく注目されている。フェノールを原料として合成されるフェノール樹脂は、優れた耐熱性、耐久性等の特長から、自動車用金属代替材料、半導体封止材料、回路基板など様々な用途に用いられている。しかし、再生可能資源を原料としたバイオフェノール生産は、原料となる糖類から代謝反応段数が大変多いこと、生産物であるフェノールによる菌体増殖や代謝活性への阻害等の理由により、その生産性は極めて低い。本研究では、工業微生物であるコリネ型細菌（*Corynebacterium glutamicum*）におけるフェノール生産株の構築を目指し、フェノール高機能生合成経路の代謝設計を行った。

【方法と結果】コリネ型細菌を用いてフェノール存在下における好気増殖試験及び増殖非依存型バイオプロセスにおける糖代謝試験を行った。好気条件下において、コリネ型細菌はフェノール生成に用いられている*Pseudomonas*属細菌と比較してフェノールに対し高い耐性を有し、フェノール生産の宿主として適性を有することが示された。また、増殖非依存条件下ではさらに高い耐性を示した。糖類からフェノールへの代謝経路を設計後、DNAデータベース情報から広く探索し、異種細菌より高機能酵素遺伝子をスクリーニングした。コリネ型細菌のゲノム情報からフェノール及び代謝中間体の分解経路をゲノム情報から推定し、遺伝子破壊により該分解経路を同定した。これらの技術統合により、フェノール生産株創製の為の基盤技術開発を行った。

本研究の一部はNEDOの委託研究の一環として行われたものである。

Corynebacterium glutamicum, phenol, metabolic design

講演番号:2C01p18
講演日時、会場:3月23日17:26～ C校舎01会場

遺伝子組換えコリネ型細菌によるフェノール生産 Ⅱ:還元条件下におけるフェノール生成試験

Phenol production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* Ⅱ. Phenol production under oxygen deprivation.

○山本省吾、須田雅子、渡辺恵郎、茂木康浩、平賀和三、乾 将行、湯川英明 (GP技術研究組合、RITE)

○Shogo Yamamoto, Masako Suda, Keiro Watanabe, Yasuhiro Moteki, Kazumi Hiraga, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa (Green Phenol Technology Research Association, RITE)

【目的】地球温暖化及び化石資源枯渇問題を背景に、再生可能資源を原料とした化学品の製造は、バイオ燃料製造と並び大きく注目されている。フェノールを原料として合成されるフェノール樹脂は、優れた耐熱性、耐久性等の特長から、自動車用金属代替材料、半導体封止材料、回路基板など様々な用途に用いられている。しかし、現在のフェノール生産法は、石油由来のベンゼンとプロピレンを原料とする典型的な化学工業の高エネルギー消費型プロセスであり、地球環境保全や温室効果ガス削減の観点から、非可食バイオマスを原料としたフェノール生産への転換が求められている。

微生物において、フェノールは芳香族アミノ酸であるチロシンからチロシン-フェノール リアーゼにより生成することが報告されているが、フェノールによる細胞毒性によりその生産性は極めて低かった。一方、我々はこれまでにコリネ型細菌(*Corynebacterium glutamicum*)が還元条件下、増殖非依存的に糖から乳酸、コハク酸、エタノール等を高効率で生産することを報告してきた。本研究では遺伝子組換えコリネ型細菌を用いて、還元条件下にてフェノール生産試験を行った。

【方法と結果】コリネ型細菌にフェノール生成能を付与するために、代謝設計に基づき鍵となる高機能代謝遺伝子を導入した。得られた遺伝子組換えコリネ型細菌を還元条件下にて反応を行った結果、反応液中にフェノールの生成を確認した。さらに、フェノール生成経路におけるボトルネック代謝ステップの高発現、フェノールおよび代謝中間体の分解経路等の代謝改変により、段階的にフェノール生産性が向上した。

本研究の一部はNEDOの委託研究の一環として行われたものである。

Corynebacterium glutamicum, Metabolic engineering, Phenol

講演番号:2C01p19
講演日時、会場:3月23日17:37～ C校舎01会場

*Saccharomyces cerevisiae*におけるイソブタノール生産性向上のためのEhrlich経路強化と炭素フラックス改変戦略

Genetic engineering to enhance Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production by *Saccharomyces cerevisiae*

○手塚 裕紀、近藤 貴志[1]、石井 純[1]、松田 史生[1]、近藤 昭彦（神戸大院・工、[1]神戸大・研究環）
○Hironori Tezuka, Takashi Kondo[1], Jun Ishii[1], Fumio Matsuda[1], Akihiko Kondo (Kobe University, [1]Kobe University)

【目的】近年、エタノールに代わる次世代バイオ燃料として、低吸湿性で高エネルギー密度をもつイソブタノールなどの高級アルコール類の微生物生産が注目を集めている。これまで大腸菌やクロストリジウム属細菌を宿主とした発酵生産が報告されているが、工業生産にむけては、低pHに対する強い耐性をもつ酵母の利用が求められている。そこで、本研究ではもともと低いレベルにある酵母のイソブタノール生産能を遺伝子工学的アプローチにより向上させることを目的とした。そのための戦略として、Ehrlich経路を強化することでバリン生合成経路における中間体（2-ケトイソ吉草酸）をイソブタノールへと変換する反応を促進することにした。さらに、遺伝子欠損変異により、酵母の主要代謝産物であるエタノールへの炭素フラックスをイソブタノール生合成へと改変することを試みた。
【方法】酵母株の宿主として、*Saccharomyces cerevisiae* YPH499を用いた。形質転換は酢酸リチウム法に従った。*Lactococcus lactis*由来の2-ケト酸脱炭酸酵素をコードする*kivd* 遺伝子、および*S. cerevisiae*由来のアルコール脱水素酵素およびアセト乳酸合成酵素をコードする遺伝子*ADH6* および*ILV2* をそれぞれ発現するためのプラスミドを構築した。また、YPH499を親株として、ピルビン酸脱炭酸酵素をコードする*PDC1* 遺伝子の破壊を行った。作成したプラスミドを野生型YPH499および変異型*pdc1*Δ株に導入し、得られた形質転換体を20 g/Lグルコースを含む最少培地（SD選択培地）で30℃にて最大120時間まで培養した。発酵液中のイソブタノール濃度はGC-MSを用いて測定した。
【結果】Ehrlich経路を強化するために*kivd* および*ADH6* 遺伝子を過剰発現したYPH499株は、mock vectorで形質転換したコントロール株に比べ、イソブタノール生産量が11 mg/Lから28 mg/Lに向上した。また、ピルビン酸からバリン生合成に向かう最初のステップを触媒する*ILV2* 遺伝子をさらに過剰発現することで生産量は41 mg/Lまで増加した。さらに、エタノールへの炭素フラックスを抑制するために、*PDC1* 遺伝子を欠損させたところ、生産量が75 mg/Lにまで向上した。また、発酵条件に改良を加えることで143 mg/Lのイソブタノール生産量(野生株の13倍)を達成した。収率は6.6 mg/g glucoseであり、酵母によるイソブタノール生産において最も高い生産性を示した。

Isobutanol, *Saccharomyces cerevisiae*, Genetic engineering

講演番号：2C01p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ C校舎01会場

シリングアルデヒドから水溶性の黒色色素を生産する微生物*Pseudomonas* sp. ITH-SA-1

Pseudomonas sp. ITH-SA-1 producing the water-soluble-black pigment from syringaldehyde.

○滝口　肇、濱口 峻、松藤　寛[1]、岩淵 範之、砂入 道夫
(日大・生資科・応生科、 [1]日大・生資科・食生)
○Hajime Takiguchi, Takashi Hamaguchi, Hiroshi Matsufuji[1], Noriyuki Iwabuchi, Michio Sunairi
(Dept. Appl. Bio. Sci., Nihon Univ., [1]Dept. Food. BioSci. Biotechnol., Nihon Univ.)

【目的】

リグニンは、植物細胞壁の15-30%を占める主要な成分であり、主要な未利用バイオマスのひとつである。微生物機能を用いて複雑な化学構造を持つリグニンを有用物質に変換する取り組みは、未利用バイオマスの有効利用という観点から非常に重要である。本研究では、リグニンやその前駆体および関連化合物を使用して、これらの基質の分解、変換、重合活性などを指標に各種スクリーニングを行った。

【方法と結果】

生海水を微生物源として、無機塩培地および完全培地にリグニン、バニリン、 *p*-ヒドロキシベンズアルデヒド、シリングアルデヒドなどを濃度や組み合わせを変えて添加し、培養した。培地中での脱色や新たな色素生産等の培地に変化の見られた菌株を30株ほど取得した。この中で、固体のシリングアルデヒドを出発物質として、水溶性の黒色色素を生産する菌株ITH-SA-1株に注目し、以下の解析を行った。

まず初めに16S rDNA解析により、同菌を*Pseudomonas* 属と推定した。現在、分類の詳細な解析を行っている。

本黒色物質の精製を目指し分画し、得られた黒色画分をHPLC、MS、NMR解析などにより解析した。現在までに、黒色画分からは既知の代謝系で知られているシリンガ酸や3-メチルガリック酸(3MGA)、ガリック酸が同定された。しかし、これら物質と鉄イオン等とのバーベンダム反応の可能性は非常に低く、一連の代謝系で重合されて出来たものと考えられた。現在、更なる精製と解析を行っている。

syringaldehyde, fluorescence, water-soluble-black pigment

講演番号：2C02p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ C校舎02会場

海藻多糖ウルバンからの新規ソフトマテリアル

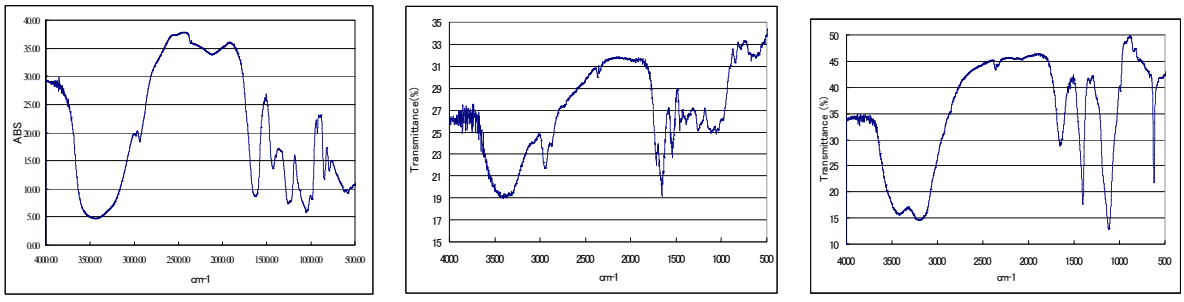
Nobel Soft Material from Ulvan

○菅野 憲一、渡部 祐介、幸村 慎太郎（近大・産業理工）
○Kenichi Kanno, Yusuke Watabe, Shintaro Yukimura (Kinki Univ., H.O.T.)

【目的】本研究では、汚染と栄養塩循環によって大量発生する生物の有効利用を行うことを目的としている。アオサは全世界的に大繁殖している海藻である。そもそもアオサは沖縄ではアーサーと呼ばれて、汁物に入れるほか、全国的にも冷凍たこ焼きほか、さまざまなものに添加されている。アオサは様々な有効利用方法が調べられており、博多湾人工島の埋め立てに利用したり、健康食品へ利用したり、燃料、堆肥への利用が進められている。一方、アオサに含まれる多糖である「ウルバン」に関する生理活性も広く研究されており、抗凝血活性、抗高脂血症、抗ウイルス活性などが報告されている。本研究では、ウルバンからこれまでにないソフトマテリアルを開発することを目的としている。特に、ウルバンはセルロースのような剛直な分子であり、高い含水率のゲルが形成困難であった。しかし、ｐＨ依存的にヘリックス構造からランダムコイル構造へと可逆的に変化できることが報告されているので（１１）、外部刺激に応答可能な材料といえる。そこで、ウルバンゲルの開発は、ただ単に廃棄物のリサイクル、生物資源の有効活用というだけではなく、新規生体適合性材料、新規除放性材料、新規生分解性材料の開発へとつながる可能性を秘めている。

【方法】従来法によって、ウルバンを熱水抽出し、プロテアーゼ処理、イオン交換カラムで精製し、ウルバンを得た。ウルバンは種々の方法によって架橋し、生成物の評価を行った。ウルバンから得られたヒドロゲルによる銅、コバルトなどの重金属イオン吸着を調べた。

【結果】吸着後の上清の吸収スペクトルより、ウルバンゲルは水溶液中の銅およびコバルトを吸着除去していることが示された。



架橋後のIRスペクトル

ulvan, soft material, polysaccharide

講演番号:2C02p03
講演日時、会場:3月23日14:11～ C校舎02会場

レモン果皮を用いたエタノール製造のための酵素糖化に及ぼす反応条件の影響

Effect of reaction conditions on enzymatic saccharification for ethanol production from lemon peel

○高橋　紀博，渡邉　義之，山本　泰平[1]，野村　正人（近畿大院・システム工、[1]中国醸造（株））
○Norihiro Takahashi, Yoshiyuki Watanabe, Taihei Yamamoto[1], Masato Nomura (Kinkidai, Chugokujozo)

【目的】 世界のレモン生産量は，2007 年には約 1,300 万トンに達し，この 40 年間に生産量が 3～4 倍に増加している．生産されたレモンの果肉部は食用として使用されているが，果皮については一部利用されているものの，多くは廃棄処分されている．そこで本研究では，生物機能を用いた糖化および発酵により，未利用なレモン果皮からエタノールを製造すべく，効率的な酵素糖化のための反応条件について検討した．

【方法】 レモン果皮に含まれる水分，セルロース，ヘミセルロース，リグニン，ペクチン量を測定した．冷凍保存された果皮試料をワーリングブレンダーにて破砕した湿潤試料と，その後事前乾燥させた乾燥試料を調製した．果皮試料に含まれる水分量を算出して所定の乾物量となるよう量り採り，所定量の蒸留水を加えた．セルラーゼなどの酵素を加え，pH を調整後反応液とした．反応容器を 55℃の恒温水槽に浸漬し，振盪またはプロペラ撹拌を行った．経時的に反応液を採取し，遠心分離後，フェイルターろ過を行い，グルコースを主とした発酵基質となる糖量を HPLC にて測定した．HPLC 分析では，YMC-Pack NH_2(150×4.6 mmI.D.)を 2 本直列連結させたカラムを用い，溶離液には 75%(v/v)アセトニトリル水溶液，検出器には示差屈折計を利用し，流量は 0.80mL/min とした．複数種の酵素を同時に添加した場合と，逐次的に酵素を利用した場合について比較検討した．また，100MPa および 50℃にて 24 時間加圧を行い，酵素反応中の加圧と前工程としての加圧処理が糖化に及ぼす影響について検討した．

【結果】 複合的に酵素を利用した場合のグルコース生成過程をFig. 1に示す．セルラーゼのみの場合，24時間後に1.7%(w/v)のグルコース量が確認され，一方，セルラーゼ，ペクチナーゼおよびアミラーゼを同時に添加した場合では2.3%(w/v)であった．また，ペクチナーゼおよびアミラーゼにて24時間の反応を実施した後，セルラーゼによる反応を実施した結果，反応液中のグルコース濃度は2.9%(w/v)であった．また，使用した酵素量に対して，より低い初期果皮濃度にて反応を行ったところ高い糖化効率が得られたが，発酵基質濃度は低かった．加圧下での酵素糖化によりグルコース濃度は3.2%(w/v)と増大したが，加圧後に24時間の複合酵素による糖化を行った結果，4.6%(w/v)のグルコース濃度が得られた．

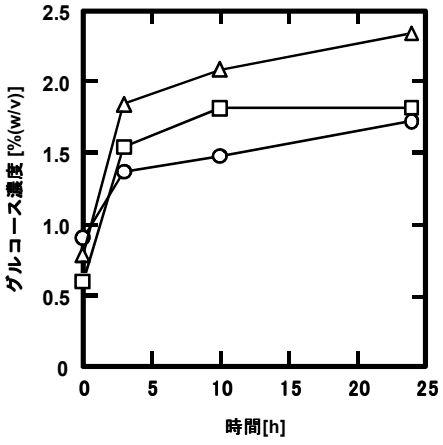


Fig. 1 グルコース濃度の経時変化に及ぼす複合酵素の影響
○ セルラーゼのみ　□ セルラーゼ，ペクチナーゼ
△ セルラーゼ，ペクチナーゼ，アミラーゼ

本研究は，（公財）ちゅうごく産業創造センター平成23年度新産業創出研究会の支援により実施された．

enzymatic saccharification, ethanol production, lemon peel

講演番号:2C02p04
講演日時、会場:3月23日14:22～ C校舎02会場

タイトル　組換え*Ralstonia eutropha*を用いた、独立栄養条件下でのD-乳酸生産

Title　D-lactate production by recombinant *Ralstonia eutropha* under chemoautotrophic conditions.

○丸山 高廣、半澤 敏、佐藤 由也[1]、石井 正治[1]、五十嵐 泰夫[1]（東ソー株式会社、[1]東京大・農）

○Takahiro Maruyama, Satoshi Hanzawa, Yuya Sato[1], Masaharu Ishii[1], Yasuo Igarashi[1] (Tosoh Corp., [1]Tokyo-Univ.)

【目的】独立栄養細菌はCO_2を直接原料としての化学品生産に有用なものと期待される。我々は水素酸化細菌の一種*Ralstonia eutropha*の高い増殖能と遺伝子組換えが可能な点に着目し、ナフサ改質等の化学プロセスからの副生水素ガスをCO_2固定のエネルギー源とした生産法の開発を試みている。今回、耐熱性ポリ乳酸の原料として有用なD-乳酸の合成に成功したので報告する。

【方法】宿主菌株として*R. eutropha* H16株及びPHB_4株を用いた。遺伝子組換えは広域宿主ベクターpBBR1MCS2を用い、接合伝達法により行った。D-乳酸の生産量はグルコン酸を含む無機塩培地、又はCO_2を含む混合ガス雰囲気下の無機塩培地で培養したのちの培養上清を生化学法で分析した。

【結果】第一に大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼ（ldhA）を両宿主菌株へ導入し、従属栄養条件でのD-乳酸生産能を調べた。4%グルコン酸を含む無機塩培地で培養したところ、PHB_4株のみ2～4g/LのD-乳酸生成が確認された。次いで混合ガス（80% 水素、10% 酸素、10% 二酸化炭素）雰囲気下、完全無機塩培地を用いた独立栄養条件での生産性を確認した。ガス原料のみではD-乳酸の生産は認められなかったが、120mM重炭酸ナトリウム添加条件下において0.7g/LのD-乳酸生産が確認された。本結果より細胞へのCO_2の取込が律速と推定し、Rubiscoの過剰発現による取込の昂進を試みた。その結果、混合ガス原料のみから0.1g/LのD-乳酸生産を確認することが出来た。本法は化学合成独立栄養生物を用いて、CO_2ガスからD-乳酸を生産した初めての例である。

D-lactate, CO_2, *Ralstonia eutropha*

講演番号:2C02p05
講演日時、会場:3月23日14:33～ C校舎02会場

セルロースアセテートのバイオリサイクルを目指した好熱菌由来エステラーゼの探索

Screening of esterase involved in cellulose acetate degradation from thermophile for recycling.

○森芳邦彦、駒大輔、山中勇人、大本貴士、酒井清文（阪市工研）
○Kunihiko Moriyoshi, Daisuke Koma, Hayato Yamanaka, Takashi Ohmoto, Kiyofumi Sakai (OMTRI)

【目的】バイオマスプラスチックのひとつであるセルロースアセテート（ＣＡ）は、最も豊富なバイオマスであるセルロースをアセチルエステル化して合成される半合成ポリマーである。我々はこれまでＣＡ分解菌 *Neisseria sicca* SB によるＣＡの分解が、ＣＡエステラーゼとエンドグルカナーゼの協同作用によって進行し、主な生成物はセロビオースと酢酸であることをすでに報告した。また、これらの酵素遺伝子についてクローニングし発現を確認した[1)]。これらの知見を利用し、セルロース系廃棄物を微生物酵素で分解し、その生成物であるセロビオース類を資源として有効利用（バイオリサイクル）する目的で本研究を行っている。例えば、セロビオースを酵素で誘導体に変換して工業材料に利用したり、エタノールや乳酸の生産といった発酵原料として利用することが可能である。今回、ＣＡ廃棄物の分解効率を上げ、また熱安定性のある酵素を得るため、好熱菌由来の耐熱性ＣＡエステラーゼの探索を行った。

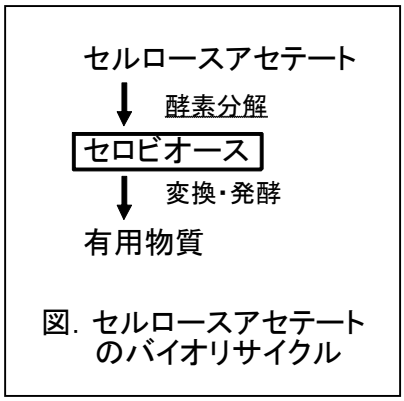


図. セルロースアセテートのバイオリサイクル

【方法・結果】好熱菌からＣＡエステラーゼと相同性のある遺伝子をクローニングし、大腸菌に形質転換し、耐熱性ＣＡエステラーゼを発現させ、その性質について調べた。まず、好熱性の細菌およびアーキア　８種類の中から約１００種類のエステラーゼ遺伝子をピックアップした。そのうち、ＣＡエステラーゼと相同性のあるもの７種類について選び出した。これらについてそれぞれプライマーを作製し、ＰＣＲで遺伝子を増幅したところ、目的遺伝子と同じ大きさのＰＣＲ産物が得られた。これらのＰＣＲ産物について精製し、発現用のベクターpET-22b(+)にクローニングした。得られたクローンについてそれぞれ大腸菌に形質転換し、エステラーゼを発現させた。酵素活性測定は、ＣＡを基質として用い、反応後遊離する酢酸を定量した。得られたエステラーゼの酵素活性を調べたところ、好熱性の細菌である *Thermotoga maritime* および *Thermoanaerobacter tengcongensis* 由来のもので活性が認められた。これらの酵素タンパク質については新規なものである。これらの酵素について反応の最適温度を調べたところ６０℃付近であった。ＣＡ分解菌 *N. sicca* SB 由来のＣＡエステラーゼの最適温度が４５℃であったことから、より高い温度でのＣＡ酵素分解への利用が可能であると考えられた。

[1)] Moriyoshi,K. et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **74**, 1940-1942 (2010).

biodegradation, cellulose acetate, esterase

講演番号：2C02p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ C校舎02会場

耐熱性酵母*Kluyveromyces marxianus* Y2株を用いたキャッサバパルプからのエタノール発酵阻害

Inhibition of Ethanol Fermentation from Cassava Pulp by a Thermotolerant Yeast, *Kluyveromyces marxianus* Y2 strain

○プラパソン ラグサワーン[1,2]、村田善則[1]、ワラポン アピワタナピワット[2]、ピラニー ヴァイサノムサット[2]、小杉昭彦[1]、荒井隆益[1]、廣岡明子[1]、森隆[1]（[1]JIRCAS, [2]カセサート大学）

○Prapassorn Rugthaworn[1,2], Yoshinori Murata[1], Waraporn Apiwatanapiwat[2], Pilanee Vaithanomsat[2], Akihiko Kosugi[1], Takamitsu Arai[1], Akiko Hirooka[1] and Yutaka Mori[1] ([1]JIRCAS, [2]Kasetsart University)

Cassava is one of the most major cops in Southeast Asia, and the amount of solid waste (cassava pulp) from starch manufacturing has reached at least one million tons in Thailand. We isolated a thermotolerant yeast, *K. marxianus,* Y2 strain that can grow at temperatures up to 45 °C from a fruit market in Thailand. In this study, we investigated the growth inhibition of *K. marxianus,* Y2 strain, and identified the inhibitors contained in cassava pulp.

The Y2 strain shows great performance to produce ethanol at high temperature compared to common industrial yeast strains. For characterization of this strain, the effect of inhibitors on the yeast growth was examined with various concentrations. 5-HMF completely inhibited yeast growth with 50 mM at 30°C and 42°C. On the other hand, furfural completely inhibited yeast growth with 70 mM at both 30°C and 42°C. In the fermentation of cassava pulp, hydrolysates, ethanol production by Y2 strain sometimes decreased because of the inhibition caused by substances contained in raw cassava pulp. We collected samples of cassava pulp from 14 starch factories in Thailand and investigated the effects of raw cassava pulp hydrolysates on growth of Y2 strain. Pulp hydrolysates from some starch factories showed strong inhibition on growth of Y2 strain. The inhibitors in hydrolysates of raw cassava pulp were determined by HPLC. The hydrolysates of cassava pulp from these starch factories contained a high level of lactic acid and acetic acid, suggesting these organic acids are the growth inhibitors of Y2 strain.

Keywords : cassava pulp , *Kluyveromyces marxianus,* ethanol fermentation, growth inhibition

講演番号：2C02p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ C校舎02会場

タイトル ： 幌延地域における深部地下環境由来の微生物集積培養物によるフミン酸の分解
Title ： Humic acid degradation by an enrichment culture originated from deep subsurface environment in Horonobe, Hokkaido, Japan.

○上野　晃生[1]、清水　了[1]、玉村　修司[1]、遠藤　亮[1]、高田　迪彦[1]、大味　泰[1]、長沼　毅[2]
([1]幌延地圏環境研究所、[2]広島大院・生物圏科学)
○Akio Ueno[1], Satoru Shimizu[1], Shuji Tamamura[1], Ryo Endo[1], Michihiko Takada[1], Yasushi Oomi[1], Takeshi Naganuma[2] ([1]H-RISE, [2]Hiroshima Univ.)

【目的】腐植物質は陸域・水域環境に普遍的に存在する有機物質であり、土壌有機物の主要分画を成している。腐植物質は種々の官能基(-COOH、-OH、$-NH_2$ など)を有する分子量 10^2～10^6 の不均一な混合物から成る難分解性高分子物質であり、微生物の炭素源としての利用性は非常に低いと考えられる。しかしながら、白色腐朽菌や放線菌において腐植物質分解能を有する菌の報告があることから [1,2]、土壌中での腐植物質の代謝回転に重要な役割を果たしていることが示唆される。本研究では腐植物質の主要分画であるフミン酸(HA)をモデル物質として用い、幌延深部地下環境水を接種源とした集積培養物により HA 分解が生じるかどうかの検証を行った。
【方法】日本原子力研究開発機構(JAEA) 幌延深地層研究施設(以下幌延 URL)換気立坑 250m から地下水(微生物密度 $4.0\times10^5 \pm 3.5\times10^4$cell/ml)を採取し、Sigma-Aldrich 社製 HA(以下 SA-HA)を唯一の炭素源とする数種の合成培地を用い、好気および嫌気条件にて 2～3 ヶ月間集積培養を行った。微生物の増殖が確認された培地より全 DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子クローンライブラリーの作成と塩基配列に基づく系統解析により微生物群集構造を調べた。SA-HA および幌延 URL 珪藻質泥岩より抽出した HA(以下 K-HA)を用い集積培養物添加による HA 分解実験を行った。培地中の HA 分解は 450nm による褪色の定量および高速液体サイズ排除クロマトグラフィー(以下 HPSEC)にて調べた。
【結果】好気条件での集積培養物中の微生物群集構造を調べたところ、Methanogenium培地において*Pseudomonas stutzeri*に近縁な細菌が優占して成長していることが分かった。嫌気条件での集積培養では微生物の成長が認められず、さらなる培養期間が必要と考えられた。好気条件での集積培養物添加によるHA分解実験を行ったところ、培養1週間目にHAの褪色が観察された。450nmによる褪色の定量を行ったところ、SA-HAおよびK-HAのどちらを用いた場合も、微生物を加えない対照群に比べ実験群では有意な減少が観察された。さらにHPSEC分析によるHAの分子量分布を調べたところ、対照群と比較し実験群のHA主ピークの保持時間の遅延が認められ、集積培養物添加によりHAが低分子化していることが分かった。
　現在、地下環境由来の微生物集積培養物でのHAの低分子化現象をさらに詳細に解析するため、HAを利用する可能性のある細菌の単離を試みている。
【参考文献】[1]Grinhut *et al.*, (2011) Environ. Sci. Technol. 45, 2748-2754.; [2]Dari *et al.*, (1995) FEMS Microbiol. Ecol. 16, 115-122.

Humic acids, subsurface environment, enrichment culture

講演番号：2C02p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎02会場

α-キチンのメカノケミカル粉砕と酵素分解による *N*-アセチルグルコサミンの製造

Production of *N*-acetylglucosamine by mechanochemical milling and enzymatic degradation of α-chitin

○戸谷 一英、中川 裕子、長田 光正、貝原 巳樹雄、二階堂 満、粉川 潤[1]、猪股 尚治[1]、増井 彩乃[2]、山村 昭博[2]、川口 光朗[2]、又平 芳春[2]（一関高専・物化工、[1]アーステクニカ、[2]焼津水産化学工業）

○Kazuhide Totani, Yuko S. Nakagawa, Mitsumasa Osada, Mikio Kaihara, Mitsuru Nikaido, Jun Kogawa[1], Shoji Inomata[1], Ayano Masui[2], Akihiro Yamamura[2], Mitsuaki Kawaguchi[2], Yoshiharu Matahira[2] (Chem. Eng., Ichinoseki Natl. Col. Tech., [1]Earth Technica Co., Ltd., [2]YaizuSuisankagaku Industry. Co., Ltd.)

【目的】*N*-アセチルグルコサミン（単糖）は、変形性関節症痛の軽減や美肌効果などが注目され、機能性食品だけにとどまらず、一般食品や化粧品にも展開されている。本単糖はカニ殻から抽出したα-キチンから製造されるが、工程数が多く大量の強酸や強アルカリを使用し環境負荷が著しい。我々は“コンバージミル”のメカノケミカル効果を利用してα-キチンの酵素分解率（糖化率）を向上させてきた。本発表では、キチンの前処理法を比較し、メカノケミカル粉砕により酵素分解率が上昇するメカニズムを考察するとともに、単糖およびキチン二糖の量産化検討を行った。
【方法】カニ殻由来のα-キチンを内容積100 Lの半連続式コンバージミルにより粉砕処理し、諸条件を検討した。また、酵素分解の前処理として、各種ミルによる粉砕処理、濃塩酸処理（コロイダルキチン）、水熱処理（超臨界水・亜臨界水）、ナノファイバー化処理（アルカリ・解繊）を、キチンの物性変化および、*Streptomyces* 属キチナーゼ酵素製剤による酵素分解率の点から比較した。以上を踏まえて、コンバージミル粉砕キチン10 kgから単糖、二糖の製造試験を実施した。
【結果】α-キチンはメカノケミカル粉砕により結晶化度が40%以下に低下し、酵素分解率は60%へ上昇した（未処理では10%）。ジェットミルや転動ミルでは結晶化度が低下せず酵素分解率は20%以下にとどまった。濃塩酸処理によりキチンは著しく低分子化し（平均分子量6,000）、高結晶性にもかかわらず酵素分解率は100%となった。ナノファイバーキチンは高結晶性で酵素分解率はメカノケミカル処理より低かった。水熱処理ではキチンが高結晶性を保っていたにもかかわらず酵素分解率は40%となり、さらに、短時間の粉砕処理を組み合わせると酵素分解率は90%以上となった。α-キチンはメカノケミカル粉砕により含水率が向上、粉砕とともにキチン繊維構造が消失し、分子量は1/10程度に低下していた。固体NMRの緩和時間も低下し、酵素接近性の増大を示唆した。一方、カニ殻についてもメカノケミカル粉砕は有効であった。フレーク状のカニ殻はプロテアーゼ処理によりキチナーゼ感受性が高まったが、メカノケミカル粉砕したカニ殻ではプロテアーゼ処理の効果は見られなかった。単糖の量産化検討では、反応液をろ過分離後、活性炭やイオン交換樹脂を用いて精製後、減圧濃縮して結晶化することで純度ほぼ100%の結晶粉末を収率約40%で得た。キチン二糖も同様に得られ大幅な製造コストの削減が可能となった。
*本研究は生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業により実施された。

α-chitin, *N*-acetylglucosamine, chitinase

講演番号：2C02p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎02会場

イカ軟骨の直接酵素分解による *N*-アセチルグルコサミンの製造

Production of *N*-acetylglucosamine by direct enzymatic degradation of squid cartilage

○樋口 雄大、三石 秋愛、古関 健一、中川 裕子、長田 光正、二階堂 満、石村 惣一[1]、田代 勝男[1]、戸谷 一英（一関高専・物化工、[1]丸辰カマスイ）

○Yudai Higuchi, Akie Mitsuishi, Kenichi Koseki, Yuko S. Nakagawa, Mitsumasa Osada, Mitsuru Nikaido, Soichi Ishimura[1], Masao Tashiro[1], Kazuhide Totani (Chem. Eng., Ichinoseki Natl. Coll. Tech., [1]Marutatsu Kamasui Co., Ltd.)

【目的】カニ殻などの α-キチンから製造される *N*-アセチルグルコサミン(単糖)は、変形性関節症痛の軽減や美肌効果などを有する機能性食品として注目されている。一方、三陸の地域資源であるスルメイカの軟骨(腱あるいは中骨)には β-キチンが豊富に含まれているが、年間百トン規模で廃棄されている。我々は三陸復興支援の一環として「イカ軟骨の直接酵素分解による単糖の製造と商品化」を目指している。すなわち、環境負荷の少ない簡便な工程、例えば、①イカ軟骨の前処理(粉砕、水熱処理等)、②プロテーゼ処理(除タンパク)、③残渣のキチナーゼ・キトビアーゼ処理、④不純物の除去(脱塩等)、⑤濃縮(結晶化)、によりクロマト分離なしで単糖を製造する。本研究では、イカ軟骨から単糖を製造するための、諸技術を開発することを目的とした。
【方法】キチン原料としてスルメイカ(三陸産)などの軟骨とイカ精製 β-キチンを使用した。これらの粉砕にはカッターミル(一次粉砕、1 分)とコンバージミル(二次粉砕、2～60 分)を使用した。粉砕物の物性は、結晶化度(XRD)、SEM、平均粒子径、平均分子量(HPLC)等で評価した。粉砕したキチン質は、プロテアーゼ酵素製剤(天野エンザイム)で 24 h 処理後、固液分離し、残渣をキチナーゼ・キトビアーゼ混合酵素製剤(*Streptomyces avermitilis* 由来のキチナーゼ含有、長瀬産業)と酵素反応(48 h)させた。酵素分解率(糖化率)は、キチナーゼ・キトビアーゼ処理後に生成する単糖・二糖を HPLC で定量し計算した。メカノケミカル粉砕したイカ軟骨 20 g から、プロテーゼ処理、残渣のキチナーゼ・キトビアーゼ処理、不純物の除去と結晶化により、単糖の調製を試みた。
【結果】カニ殻とイカ軟骨のキチン含有量は同レベル(約 25%)であった。キチナーゼ・キトビアーゼ処理によるキチン分解生成物は、ほぼ全て単糖であった。現在、主要酵素の同定を行っている。イカ軟骨はカッターミル粉砕だけではほとんど糖化されないが、コンバージミル粉砕(メカノケミカル粉砕)により結晶化度が低下するにつれて糖化率が著しく上昇し、含有するキチンは全て分解された(α-キチンやカニ殻と同様の現象)。一方、精製 β-キチンは 10 分間のコンバージミル粉砕で速やかに非晶質化し糖化率 90%に到達したが、カッターミル粉砕(非メカノケミカル粉砕)だけでも糖化率は同様に高いことが特徴であった。プロテアーゼ処理は、カッターミル粉砕したイカ軟骨の糖化率を 3 倍向上させたが、コンバージミル粉砕したイカ軟骨には効果がなかった。また、基質濃度を高めても、酵素反応時間を長くすることで分解率の維持が期待できた。イカ軟骨 20 g から、酸・アルカリ、クロマト分離を一切使用することなく、原料の前処理と酵素反応、簡便な分離工程のみで *N*-アセチルグルコサミン 3.1 g (RI と 210 nm で純度 99%以上)を得た。

β-chitin, *N*-acetylglucosamine, chitinase

講演番号：2C02p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎02会場

高温高圧水を利用した *N*-アセチルグルコサミン誘導体の合成

Synthesis of *N*-acetylglucosamine derivatives by high-temperature and high-pressure water treatment

○長田 光正、吉田 康平、戸谷 一英、尾形 慎[1]、碓氷 泰市[1]（一関高専・物化工、[1]静岡大農・応生化）

○Mitsumasa Osada, Kohei Yoshida, Kazuhide Totani, Makoto Ogata[1], Taichi Usui[1] (Chem. Eng., Ichinoseki Natl. Coll. Tech., [1]Shizuoka Univ.)

【目的】再生可能資源であるバイオマスから環境負荷の小さい方法で有用化合物を得ることが求められている。*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)は、カニ殻などに含まれるキチンを構成する単糖であり、既往の研究において GlcNAc をホウ酸塩水溶液中(pH7.0)で 100℃、2 時間処理することにより、付加価値が高く医薬品原料として有用な GlcNAc 誘導体を合成できることがわかっている．しかし、既往の研究例は 100℃以下の条件に限られており、高温高圧水中での GlcNAc の反応の検討は行われていない。そこで本研究では、酸触媒を用いずに高温高圧水中で GlcNAc の反応を行い、その反応挙動を調べた。

【方法】実験装置として、送液ポンプ、予熱部、反応部、冷却管、および背圧弁で構成されている流通式反応装置を用いた。実験は、試料の 3% GlcNAc 水溶液をポンプで流し、圧力 25MPa、反応温度 120～200℃で行った。反応は、試料と予熱部で加熱された高温高圧水を混合させることで行った。また水の流量を変えることにより、反応管内の滞在時間(反応時間)を 5~50 秒の範囲で調整した。生成物は活性炭-セライトカラムで分離精製した後、LC-MS で分子量を調べ、NMR により構造を決定した。

【結果】本実験で得られた生成物は GlcNAc から水 1 分子が脱水した Chromogen Ⅰ とその構造異性体である 2-acetamido-3,6anhydro-2-deoxy-D-glucofuranose と 2-acetamido-3,6anhydro-2-deoxy-D-mannoofuranose、およびさらに水 1 分子が脱水した ChromogenⅢであった。生成物収率に及ぼす反応温度の影響を調べたところ、反応温度 150℃以下では GlcNAc はほとんど反応せず、安定に存在した。160℃以上で GlcNAc の脱水反応が進行し、180℃で Chromogen Ⅰ 収率は極大を示した。170℃以上で ChromogenⅢの生成が見られ、その収率は温度とともに増大した。別途行った温度一定条件下における経時変化を調べた結果より、高温高圧水中での主な反応経路は GlcNAc→Chromogen Ⅰ →ChromogenⅢであることもわかった。

以上より、高温高圧水を反応場とすることで酸・アルカリ触媒を使わずに各種 GlcNAc 誘導体を極めて短時間に合成できることがわかった。

*本研究は生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業により実施された。

N-acetylglucosamine, subcritical water, bicyclic 3,6-anhydroaminosugar

講演番号：2C02p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ C校舎02会場

有機質肥料活用型養液栽培における根部病害抑止効果の保持条件の解明

Analysis for suppressive effect on root disease in organic hydroponics

○藤原 和樹、青山 ちひろ[1]、小川 順[2]、加藤 康夫[3]、宮本憲二[4]、高野 雅夫[1]、寺見 文宏、篠原 信（農研機構、[1]名大院・環境、[2]京大院農・応用生命、[3]富山県大・生物工、[4]慶大・理工）

○Kazuki Fujiwara, Chihiro Aoyama[1], Jun Ogawa[2], Yasuo Kato[3], Kenji Miyamoto[4], Masao Takano[1], Fumihiro Terami, Makoto Shinohara (NARO, [1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Toyama Pref. Univ., [4]Keio Univ.)

【目的】有機質肥料活用型養液栽培は従来の無機養液栽培に比べ環境負荷を低減でき、有機物を分解する微生物生態系を水中に構築することで有機廃棄物を栽培に直接利用できる新技術として注目を集めている。さらに無機養液栽培では培養液を無菌的に維持するため、病原菌が培養液中に侵入すると容易に蔓延し深刻な被害を受けるが、有機質肥料活用型養液栽培は病原菌を接種しても根部病害が発生しない抑止効果が認められている。本研究では本栽培技術の根部病原菌に対する反応を解析した。

【方法】並行複式無機化法により微生物を培養し、この培養液に根部病原菌を接種し、消長を継時的に検定した。また、並行複式無機化法により作成した培養液を利用して野菜（サラダナ）を栽培し、根部病原菌（レタス根腐病菌*Fusarium oxysporum*）を培養液中に潅注接種し、経過を観察した。栽培終了時の培養液および根部表面の根部病原菌の菌密度を調べた。

【結果】培養液中の根部病原菌の消長は、無機培養液中は菌密度の上昇が確認されたが、有機培養液中では菌密度の上昇はなく、根部病原菌が静菌化している可能性が示唆された。無機養液栽培では病害により多数のサラダナが枯死し、培養液および根部表面から高菌密度で病原菌が検出された。一方、有機質肥料活用型養液栽培では培養液および根部表面から低菌密度の根部病原菌が検出されたが、病害発生は認められなかった。これらの結果から、有機質肥料活用型養液栽培の根部病害抑止効果は、病原菌の静菌化による可能性が示唆された。

Organic hydroponics, Root disease, Biofilm

講演番号：2C02p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎02会場

タイトル　有機質肥料活用型養液栽培（有機養液栽培）によるトマトの実用規模栽培とその解析
Title　Analysis for Practical Organic Hydroponics of Tomato

○青山 ちひろ、藤原 和樹[1]、高野 雅夫、篠原 信[1]（名大院・環境、[1]農研機構）
○Chihiro Aoyama, Kazuki Takano, Masao Takano, Makoto Shinohara (Nagoya Univ., [1]NARO)

【目的】有機質肥料活用型養液栽培は従来の無機養液栽培に比べ、環境負荷を低減でき、有機質資源を肥料として直接利用できることから注目されている[1)]。しかし実用規模の栽培は試験研究が始まったばかりである。本研究では、規模を拡大した場合の課題を検証するために、実用規模でのトマトの有機養液栽培を試みた。

【方法・結果】栽培前に 200lの容器で並行複式無機化反応（有機態窒素を硝酸態窒素に変換する反応）を行ったところ、問題なく硝酸態窒素を得ることができた。その養液を用いて、1.4aのハウスでトマトの栽培を行った。養液中のアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素をモニターすることで、添加した有機物の速やかな無機化を確認し、トマトを順調に栽培することができた。このことから実用的な規模での有機養液栽培が可能ということが確かめられた。また施肥量が過剰である場合は養液中からアンモニア態窒素が検出された。このことからアンモニア態窒素のモニターが適切な施肥管理につながると期待される。

1)篠原信 2008「化学と生物」,vol.46. No.4, p.230-232.

organic hydroponics, practical cultivation, nitrification

講演番号：2C02p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ C校舎02会場

硝化特性を指標とした有機養液栽培に有用な微生物群の探索

Screening of useful microbial community based on nitrification characteristics for organichydroponics

○小川　順[1]、安藤晃規[1,2]、犬飼龍矢[1]、池本成美[3]、島　純[3]、宮本憲二[4]、加藤康夫[5]、篠原信[6]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]京大・微生物科学、[4]慶大・理工、[5]富山県大・生物工、[6]農研機構）

○Jun Ogawa[1] Akinori Ando[1,2], Ryuya Inukai[1], Narumi Ikemoto[3], Jun Shima[3],Kenji Miyamoto[4], Yasuo Kato[5], Makoto Shinohara[6] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.[2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ. [3]Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ. [4]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ. [5]Dep. Biotech., Toyama Pref. Univ. [6]NARO.)

【目的】

有機養液栽培（有機質肥料活用型養液栽培）は養液循環型の栽培が可能であり、また、有機廃棄物を栽培に直接利用できることから、無機養液栽培に比べ競争力、環境負荷の点で優れた栽培法である[1)]。本技術は曝気下にて有機物を無機化する耕水工程と、植物定植後、有機物の無機化と栽培を同時に行う工程とに分けられる。現在、耕水工程では有機物の無機化に関わる微生物源として土壌を使用しているが、硝化には２週間～1ヶ月要し、再現性及び栽培制御において問題を有している。本研究では、有機養液栽培に有用な汎用的な微生物剤を開発すべく、硝化特性を指標とした微生物群の選抜と諸性質の解析を試みたので報告する。

【方法・結果】

有機質肥料とした、焼津産カツオの煮汁を0.5 g/Lの濃度にて添加した水溶液800 mlに、微生物源として約50種類の市販の培養土、肥料、バーク堆肥や、畑土壌などを添加し、アンモニア、亜硝酸、硝酸の濃度を経時的にモニターすることで、良好な硝化特性の示す微生物群を集積し、選抜した。結果、選抜した土壌では、従来1ヶ月必要であった耕水期間が約1～2週間に短縮でき、培養後の複合微生物を種菌として用いることで、再現性よく耕水工程を行えること、また、種々の有機物に対しても効率的に無機化を行える柔軟性を備えた微生物群であることを明らかにした。

1)篠原信 2008「化学と生物」, vol. 46. No. 4, p. 230-232

organichydroponics, microbial community, nitrification

講演番号：2C02p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎02会場

有機養液栽培に有用な高い硝化活性を示す微生物群の解析

Analysis of useful microbial community for organichydroponics with high nitrification activity

安藤晃規[1,2]、○犬飼龍矢[1]、池本成美[3]、島純[3]、宮本憲二[4]、加藤康夫[5]、篠原信[6]、小川順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]京大・微生物科学、[4]慶大・理工、[5]富山県大・生物工、[6]農研機構）

Akinori Ando[1,2], ○Ryuya Inukai[1], Narumi Ikemoto[3], Jun Shima[3],Kenji Miyamoto[4], Yasuo Kato[5], Makoto Shinohara[6] , Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.[2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ. [3]Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ. [4]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ. [5]Dep. Biotech., Toyama Pref. Univ. [6]NARO.)

【目的】

有機養液栽培は養液循環型の栽培が可能であり、また、有機廃棄物を栽培に直接利用できることから、無機養液栽培に比べ競争力、環境負荷の点で優れた栽培法である[1)]。本技術は曝気下にて有機物を無機化する耕水工程と、植物定植後、有機物の無機化と栽培を同時に行う工程とに分けられる。従来、耕水工程の微生物源として土壌を利用してきたが、我々は硝化特性の良い土壌を選抜し、硝化後の微生物群を用いることで、再現性よく速やかな硝化が可能であることを報告した。本発表では、選抜土壌から調整した微生物群を硝化工程に用いた際の、菌相の再現性、ならびに、硝化工程における経時的な菌相遷移を解析したので報告する。

【方法】

焼津産カツオの煮汁を0.5 g/Lの濃度にて添加した水溶液800 mlに硝化特性の優れた選抜土壌を5 g/Lの濃度で添加し、曝気下に硝化を行った。硝化後の菌体を回収後、再度硝化反応を行う操作を４回繰り返した。各回の硝化後の菌体よりゲノムを抽出し、16S rRNAを対象としたPCR-DGGE解析を行い、特徴的なバンドの塩基配列を決定し、細菌群集構造の解析を行った。また、硝化工程において経時的にサンプリングした菌体を、同様の解析手法にて行い、菌相遷移のプロファイルを明らかにした。一方で、カツオ煮汁で調整した菌体は種々の有機物に対して、硝化能を有していることが明らかになっている、種々の有機物の硝化後の菌体を同様に解析した。

【結果】

硝化後の菌体は、土壌細菌とは異なる細菌群集構造を示し土壌の細菌群集に比べ、単純化されていたが、繰り返し利用しても、菌相が維持されていることが明らかになった。個々のバンドに対応する菌種は現在解析中である。

1)篠原信 2008「化学と生物」, vol. 46. No. 4, p. 230-232

organichydroponics, microbial community, nitrification

講演番号：2C02p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ C校舎02会場

ウキクサから単離した微生物の同定と機能解析

Identification and functional analysis of microorganisms isolated from duckweed

○中尾　英二[1]、安藤　晃規[1, 2]、島　純[3]、藤田　朋宏[4]、小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]京大・微生物科学、[4]ネオ・モルガン研究所）

Eiji Nakao[1], Akinori Ando[1, 2], Jun Shima[3], Tomohiro Fujita[4], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ. [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ. [3]Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ. [4]Neo-Morgan Laboratory)

【目的】植物の生育に微生物は密接に関与していると考えられている。我々は、淡水性のウキクサが極めて低栄養な条件下においても生育可能であることに着目した。ウキクサは光照射条件において、窒素を含まない栽培溶液中でも有意な生育が観察される。そこで、ウキクサと相互作用する微生物が有用機能を発揮し、ウキクサの生育を促進している可能性を想定した。これまでに根圏微生物による植物の生育促進に関する研究事例は数多く報告されているが、本研究で用いたウキクサは根を有しておらず、根圏とは異なる様式で微生物機能によるウキクサの生育促進がなされている可能性が考えられる。そこで、本研究では、ウキクサに関連する微生物の機能を明らかにすることを目的に、ウキクサから微生物の単離及び同定を行い、単離した微生物の機能解明を試みた。

【方法】ウキクサの懸濁液及び破砕液を分離源として、様々な栄養条件の培地を用いて微生物の単離を行った。形態観察及び 16S rDNA または 18S rDNA の塩基配列を決定することにより、単離した微生物の同定を行った。さらに、単離・同定した微生物のウキクサに対する生育促進機能を評価することを試みた。ウキクサの栽培溶液に単離した微生物を添加した場合のウキクサの生育変化を促進能の指標とした。ウキクサの生育は、光照射条件における乾燥重量として測定した。

【結果】ウキクサの懸濁液及び破砕液を微生物の分離源として、ウキクサに関連する微生物の単離を行ったところ、低栄養条件の培地を用いた場合、*Massilia* sp.などの細菌や緑藻に分類される *Chlorococcum ellipoideum* が単離された。一方、富栄養条件の培地を用いた場合には、*Agrobacterium tumefaciens* などの細菌が主に単離された。現在までに、24 種の微生物を単離・同定することに成功し、それらの微生物には、窒素固定能や光合成能を有する事が報告されている微生物が含まれていた。さらに、これらの微生物をウキクサの栽培溶液に添加してウキクサの生育促進効果を検討した結果、ウキクサの生育促進能を有する微生物の存在が示唆された。現在、ウキクサの生育促進能に基づく微生物機能の詳細な解析を行っている。

Duckweed, Growth promotion, Interaction of microorganisms with duckweed

講演番号：2C02p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ C校舎02会場

安定同位体標識技術を用いた複合微生物系による植物バイオマスの分解・代謝過程の比較解析
Comparative analysis in metabolic processes for biomass degradation by soil microbiota using isotope labeling techniques

○小倉　立己[1]，伊達　康博[1,2]，坪井　裕理[3]，菊地　淳[1,2,4,5]（[1]横市大院生命，[2]理研 PSC，[3]理研 ASI，[4]名大院生命農，[5]理研 BMEP）
○Tatsuki Ogura[1], Yasuhiro Date[1,2], Yuuri Tsuboi[3], Jun Kikuchi[1,2,4,5]（[1]Grad. Sch. NanoBio., Yokohama City Univ., [2]RIKEN PSC, [3]RIKEN ASI, [4]Grad. Sch. Bioagri., Nagoya Univ., [5]RIKEN BMEP）

【背景および目的】植物バイオマスは難分解性物質であるリグノセルロースを主成分とし、バイオマス種ごとに構成成分や立体構造が異なっている。しかし、植物バイオマスの超分子構造については不明な点が多く、また自然界で分解微生物などが植物バイオマスをどのように緩和・分解・代謝しているのかについては未解明な部分が多いのが現状である。そこで我々はこういった植物バイオマスの分解・代謝過程を明らかにするため、稲藁超分子構造と水田土壌微生物叢による分解特性の関係性を評価し、同一組成においてもバイオマス高次構造の違いにより分解・代謝過程が大きく異なることを明らかにした。本研究では更に詳細なバイオマス分解特性の解明を目指し、安定同位体標識した植物バイオマスを数種類作成し、安定同位体標識技術を駆使することで、組成や超分子構造の違いによる土壌微生物叢のバイオマス分解・代謝過程を解析した。
【方法】組成の異なる植物バイオマスとしてダイズ、トマト、コマツナを用意し、$^{13}CO_2$環境下で育成することにより^{13}C標識バイオマスを作成した。バイオマス超分子構造の評価方法としては、凍結乾燥したサンプルをフードカッターで破砕後、オートミルによる粉砕処理を施し、固体NMRを用いて解析を行った。また、低分子物質を除去したサンプルをボールミルによって微粉砕処理し、リグニンやヘミセルロース等のバイオマス成分をDMSO/pyridineにより抽出し、^{1}H-^{13}C HSQC等の溶液NMRによる計測を行い、バイオマス構成成分の評価を行った。バイオマス構成成分のアノテーションについては、本研究室で開発したバイオマス解析ツールであるBm-Char（URL; https://database.riken.jp/ecomics/biomass）を用いた。
【結果】固体NMR、溶液NMRを用いて作成した安定同位体標識バイオマス植物の超分子構造を評価したところ、各バイオマス種で構成成分が異なっており、特にコマツナではダイズ、トマトと比べて、バイオマス構成成分が大きく異なることを明らかにした。次に、これらのバイオマス植物を土壌微生物叢の基質として投入し、土壌微生物叢によって分解・代謝されたバイオマスサンプルの経時的な変化を評価した。バイオマス分解・代謝過程の評価では、前述したバイオマス超分子構造評価法を用いて分解過程をモニタリングするとともに、DGGE等の微生物叢解析およびNMRメタボロミクスによる微生物の代謝動態解析技術を統計学的に組み合わることにより、微生物叢によるバイオマス分解・代謝反応場を総合的に評価することを可能にし、各土壌微生物叢反応場におけるバイオマス分解・代謝過程を特徴づけることが可能であった。あわせて、微生物叢によるバイオマス分解・代謝過程の詳細な比較解析結果についても本会で議論したい。

NMR, Supramolecular structure, Lignocellulose

講演番号：2C02p17
講演日時、会場：3月23日17:15～ C校舎02会場

琵琶湖深湖底からのセレンオキサニオン還元性微生物の探索

Screening and isolation of selenium-oxyanion reducing microorganisms from deep sediment in Lake Biwa

○阪口 利文、平岡 達也、田邊 伸康、有馬 寿英、宮下 英明[1]
（県立広島大・環境、[1]京大院・地球環境学堂）
○Toshifumi Sakaguchi, Tatsuya Hiraoka, Nobuyasu Tanabe, Toshihide Arima, Hideaki Miyashita[1]
(Dept. of Environ. Sci., Pref. Univ. of Hiroshima, Dept. of Technol. & Ecol., Hall of Global Environ. Studies, Kyoto Univ.)

【目的】これまで演者らは日本海溝三陸沖の水深 6500～7000 m 級の深海底をはじめ、様々な環境より採取された泥質試料からセレンオキサニオンの回収、及び単体セレン元素への変換が可能な新規セレンオキサニオン還元性微生物の分離・培養に関する研究を行ってきた。泥質はその深度や状況によって構成される微生物種が異なるだけではなく、垂直方向に対して異なる微生物群が重層的に生息し、元素・物質循環に関与したり、生態学的なニッチを構成している。また、泥質は種々の物質・元素・イオン種が吸着・沈着することから生物による物質変換や無機化の場としても生態系で重要な位置を占め、環境修復や物質変換に貢献できうる微生物種が期待できるソースである。そこで、本研究では、現在、その回収・変換が望まれるセレンオキサニオンに対して還元・変換が期待できる微生物を琵琶湖深湖底などから採取された泥質から探索・分離した。さらに得られた分離株の性状などについて調査した。

【方法、及び結果】琵琶湖の最深部周辺から採取された泥質を接種源にしてセレンオキサニオン（亜セレン酸、セレン酸）還元性微生物の探索と分離について検討した。また、琵琶湖周辺部に点在する池・沼からも泥質を採取し、深部試料と同様に本実験に用いた。次に、セレンオキサニオンである亜セレン酸、またはセレン酸（各10mM）を電子受容体として生育できる微生物の探索・分離を行うために、これらの物質を嫌気状態での電子受容体となるような分離培地を作製し、電子供与体となる炭素源として1mMの乳酸を添加した。これらの培地に採取された琵琶湖深部や周辺部湖沼の泥質など接種して集積培養体の醸成を実施した。その結果、複数の集積培養体に赤色の沈殿物の形成が観察された。また、幾つかの集積培養体に醸成された試料を新しい培地に接種して継代培養を行ったところ、少なくとも3代以上にわたって初代同様の変化が見られた。そこでプレート法を用いて集積培養体から微生物株の獲得について検討したところ、最深部の泥質（N4試料）を接種した集積培養体を含む複数の集積培養試料からセレンオキサニオンを還元し、元素体のセレンに変換できる微生物株の獲得に成功した。分離株はセレン酸よりも亜セレン酸をよく還元した。主に桿菌で構成されており、嫌気的にも通気を伴う好気的な条件においても元素体セレンと考えられる赤色の沈殿を形成しながら生育できた。また、セレンのみならず（亜テルル酸などの）テルルオキサニオンに対しても還元性があり、元素体テルルまで還元できる分離株が見出され、最深部を含む琵琶湖底質において、酸素属（セレン・テルル）有用元素の回収に有効な微生物の存在が明らかになった。

Bioremediation, Selenium oxyanions, Sediment

講演番号：2C02p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ C校舎02会場

セレン酸還元細菌*Pseudomonas stutzeri* NT-Iを用いたセレン酸および亜セレン酸還元の最適化
Optimization of selenate- and selenite- reduction with a selenate reducing bacterium, *Pseudomonas stutzeri* NT-I

○成田 尚宣、鏡 つばさ[1]、黒田 真史[1]、惣田 訓[1]、池 道彦[1]、山下 光雄（芝工大・SIT総研、[1]阪大院・工）
○Takanobu Narita, Tsubasa Kagami[1], Masashi Kuroda[1], Satoshi Soda[1], Michihiko Ike[1], Mitsuo Yamashita(Shibaura Institute of Technology, [1]Osaka University)

【目的】我々はこれまでに高濃度のセレン酸還元に対応した好気的セレン酸還元細菌*Pseudomonas stutzeri* NT-I株を単離している。本研究では、NT-I株を用いたセレン酸および亜セレン酸からのセレン回収の実用化を目指し、バイオリアクターを用いて還元条件の最適化を検討した。

【方法】培養には、0.5 mmol/Lのセレン酸もしくは亜セレン酸を含むTSB培地3 Lを分注した5 L容ジャーファーメンターを用いた。培養液の温度、攪拌速度、pHはそれぞれ任意の値に保たれた。培養液は経時的に採取され、セレン酸、亜セレン酸はイオンクロマトグラフィーを用いて、元素態セレン（固体セレン）および全水溶性セレンはICP-AESを用いて定量された。また気体セレンは、ジャーファーメンターの排気を濃硝酸に通過させ、ICP-AESにより濃硝酸中に含まれるセレンを経時的に測定することで定量された。培養菌体の細胞増殖は、分光光度計を用いて600 nmにおける光学密度（OD_{600}）から計算された。

【結果】初期条件（初期pH7.0 （pH制御なし）、38℃、120rpm、通気量1 L/min）におけるセレン酸および亜セレン酸の還元速度は、各々3.1×10^{-16} mol/hr/cell、8.8×10^{-18} mol/hr/cellであった。次にセレン酸還元についてpH、温度、攪拌速度の検討を行った結果、セレン酸還元の最適条件はpH7.5-8.0、38℃、120rpmであり、このときの還元速度は4.7×10^{-16} mol/hr/cellであった。亜セレン酸還元について同様の検討を行った結果、亜セレン酸還元の最適条件はpH9.0、38℃、250rpmであり、このときの還元速度は7.6×10^{-17} mol/hr/cellであった。初期条件下での還元速度と比べ、最適条件下でのセレン酸の還元速度は1.5倍、亜セレン酸の還元速度は10倍であった。また攪拌速度による還元速度への顕著な影響が観察されたことから、セレン酸および亜セレン酸還元と溶存酸素（DO）との関係を調べた。この結果、セレン酸はDOがほぼ0%の嫌気的条件下で還元が進行しているのに対し、亜セレン酸はDOが高い好気的条件下でも還元が進行することがわかった。

Keyword1 *Pseudomonas stutzeri*, Keyword2 Selen, Keyword3 Rare metal

講演番号：2C02p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ C校舎02会場

Rhodococcus erythropolis PR4 株のアルカン相への転移における *groES-EL1* 遺伝子の影響

Effects of *groES-EL1* genes on the cell-localization of *Rhodococcus erythropolis* PR4 in medium/alkane two-phase cultures.

○瀧原 速仁、松浦 千明、荻原 淳[1]、岩淵 範之、砂入 道夫
(日大・生資科・応生科)、(日大・生資科・生化科)[1]
○Hayato Takihara, Chiaki Matsuura, Jun Ogihara[1], Noriyuki Iwabuchi, Michio Sunairi
(Dept. Appl. Bio. Sci., Nihon Univ.) (Dept. Chem. Life Sci., Nihon Univ.)[1]

【目的】

近年、生きている微生物や酵素を用いた物質生産の研究が行われており、その中でも化学合成法が主流であるファインケミカルにおける応用が期待されている。その理由として、化学合成法では目的物質以外の廃棄物が多いため、コスト面で課題を抱えている。そこで、環境負荷が少なく、高収率が望めるファインケミカルの生産が求められている。

生きている微生物を用いた物質生産の技術開発における重要な要因として、宿主菌と基質の親和性をより高くする必要性があり、基質への親和性を理解・調節することは、反応の効率化という観点から非常に重要である。親和性の向上を研究する点で、我々はこれまでに培地に有機溶媒であるアルカンを重層した二相培養系において、*R. erythropolis* PR4 株がアルカンに対して高い親和性を持っていることを見出した。それは、PR4 株が添加するアルカンの炭素数によって、細胞の局在性を変化させるユニークな性質を有しており、炭素数 13 以上のアルカンを添加した場合、アルカン相に転移し、増殖できることを明らかになっている。また、アルカン相に転移した細胞では、分子シャペロンである GroEL2 の高発現が示され、GroEL2 の発現量を上昇させることによってより短鎖のアルカン存在下でも生育できることを明らかにした。

Rhodococcus 属細菌はグラム陽性の高 G+C 含量のバクテリアで、これらの細菌は複数の *groEL* 遺伝子を有していることが知られている。複数の遺伝子の使い分けや活性の差異に興味が集まっていることから、本研究では *groEL1* 遺伝子に注目し、その機能を検討した。

【結果と考察】

PR4 株から *groES-EL1* オペロンを形成している遺伝子について、単独の遺伝子、*groES-EL1* を含む領域、およびこれらを部分的にデリーションした遺伝子断片を作製し、PR4 株に導入した。得られた各種形質転換体ついて、親株がアルカンに吸着して生育をする *n*-ドデカンを用いた条件において細胞の局在性を検討した。

その結果、*groES-EL1* 遺伝子を導入した形質転換体では細胞の局在性が吸着から転移へと変化が確認されたが、その他の形質転換体では、局在性の変化は確認できなかった。さらに、他の *Rhodococcus* 属細菌の *groES-EL1* を導入した場合にも細胞の局在性が変化したことから、アルカン相への転移には *groEL2* に加え、*groES-EL1* 遺伝子も関与していることが示唆された。

Rhodococcus, organic solvent tolerance, *groES-EL1*

講演番号：2C02p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ C校舎02会場

*Rhodococcus rhodochrous*の培地/アルカン二相培養系における細胞の局在性への*groEL2*遺伝子の影響

Effects of *groEL2* on the cell localization of *Rhodococcus rhodochrous* in medium/alkane two phase cultures

○松浦 千明、瀧原 速仁、岩淵 範之、砂入 道夫（日大・生資科）
○Chiaki Matsuura, Hayato Takihara, Noriyuki Iwabuchi, Michio Sunairi (Dept.Appl.Bio.Sci, Nihon Univ.)

【目的】*Rhodococcus*属細菌は石油・塩素系有機溶媒といった難分解性化合物に対する資化能力をもつと共に有用酵素群や有用物質などの生産菌であることが知られている。それゆえ、産業的に重要な菌群として位置づけられており、低エネルギー化や環境負荷を削減できるバイオプロセスによる環境浄化・物質生産への応用が期待されている。これまでの微生物細胞と有機溶媒との相互作用の研究において、われわれは、*R. erythropolis* PR4株由来の*groEL2*遺伝子の導入が、各種アルカンを添加した二相培養環境下での生育の促進や親株が生育できない短鎖の*n*-アルカン存在下でも生育を可能とさせることなど、有機溶媒耐性能の上昇をもたらすことを明らかにした。本研究では、この*groEL2*遺伝子の機能が*Rhodococcus*属細菌に一般なものか否かを検討した。

【方法と結果】まず初めに、PR4株由来の*groEL2*遺伝子の他の株に対する影響を検討した。*R. erythropolis* PR4株の*groEL2*遺伝子をPCRにより増幅し、クローニングした。これらを*R. rhodochrous* R-1株、S-1株、S-2株、ATCC12674株などに導入し、得られた各種形質転換体を親株がアルカン相の表面に吸着して生育する吸着型を示すアルカンを添加した二相培養系に供し、細胞の局在性を検討した。その結果、*R. rhodochrous* ATCC12674株、R-1株などの株において、親株が吸着型を示すアルカン相内に転移して生育する様子が確認された。また、生育できるアルカンの炭素鎖数の範囲を検討したところ、親株が生育できなかった短鎖のアルカンでも生育できるようになった。ここから、PR4株の*groEL2*遺伝子は自身だけでなく、他の株にも溶媒耐性の上昇をもたらすことが示唆された。

続いて他の株の*groEL2*遺伝子について検討した。*R. rhodochrous* R-1株、R-2株、S-1株、S-2株、ATCC12674株などの*groEL2*遺伝子をPCRで増幅してクローニングし、親株およびその他の菌株に対して導入し、得られた各種形質転換体の細胞の局在性、生育できるアルカンの炭素数の範囲などについて検討を行った。その結果、供試した多くの遺伝子と菌株の組み合わせにおいて、PR4株の*groEL2*遺伝子と同様の効果が確認された。興味深いことに、*R. rhodochrous* S-2株においては、PR4株由来の遺伝子とは違う効果が見出された。S-2株は、C12以上のアルカンに対し吸着型を示すが、PR4株由来の*groEL2*遺伝子をS-2株に導入しても細胞の局在性の変化や有機溶媒耐性の上昇は確認できなかった。両者のアミノ酸配列はほぼ共通していることから、本事象には別の要因が関与しているものと推測された。現在その詳細を検討している。

Rhodococcus, organic solvent tolerance, *groEL2*

講演番号：2B03a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ B校舎03会場

白色腐朽菌*Trametes versicolor*によるC5・C6糖の発酵

Fermentation of hexose and pentose sugars into ethanol by the white rot fungus *Trametes versicolor*

○内井 敦史、綱島 彩子、簗瀬 英司、岡本 賢治（鳥取大工・生応工）
○Atsushi Uchii, Ayako Tsunashima, Hideshi Yanase, Kenji Okamoto (Tottori Univ.)

【目的】森の分解者である担子菌は、自然界において木質資源の循環に重要な働きをしている微生物である。我々は、未利用バイオマスを効率的に利活用するバイオマスリファイナリーの展開を目的とし、リグノセルロースなど様々な多糖類に対する分解性と発酵性を併せ持つ担子菌の新たな機能の探索を行っている。これまでに顕著な発酵能を見出してきた*Trametes* 属担子菌類[1,2]の中で、今回は*Trametes versicolor*に着目し、その特性を調べた。
【方法】炭素源、酵母エキス、KH_2PO_4、$(NH_4)_2SO_4$、$MgSO_4$・$7H_2O$を含む培地（pH 5）に菌を接種し、28℃で培養した。経時的に採取した試料は、高速液体クロマトグラフで糖およびエタノールの分析を行った。
【結果】キシロースを唯一の炭素源とする培地に、*T. versicolor*を接種したところ、キシロースの消費とそれに伴うエタノールの生産が認められた。まず、pHが及ぼす発酵への影響について調べたところ、酸性条件下でもコントロール区分と同様のエタノール変換を示した。また、窒素源を酵母エキスの代わりにペプトンやコーンスティープリカーとした培養でも、特に変化は認められなかった。一方、グルコース、マンノース、セロビオースならびにマルトースを炭素源とする培地において、エタノールへ効率的に変換した。さらに、多糖類であるキシランや結晶性セルロース、バイオマス原料である小麦フスマや稲ワラからも、比較的良好な収率で直接エタノールを生産可能であった。以上の結果より、当該担子菌は*Saccharomyces cerevisiae*や*Pichia stipitis*等の酵母とは異なる興味深い発酵能を有することが明らかになった。

[1] K. Okamoto *et al.*, Biotechnol. Lett., **32**(7), 909-913 (2010)
[2] K. Okamoto *et al.*, Enzyme Microb. Technol., **48**(3), 273-277 (2011)

Trametes versicolor, ethanol, xylose

講演番号：2B03a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ B校舎03会場

乳糖発酵性担子菌による廃棄乳やホエーからのエタノール生産

Production of ethanol from waste milk and cheese whey by a lactose-fermenting basidiomycete fungus

○金涌 龍一、中川 紗季、簗瀬 英司、岡本 賢治（鳥取大工・生応工）
○Ryuichi Kanawaku, Saki Nakagawa, Kenji Okamoto, Hideshi Yanase (Tottori Univ.)

【目的】リグノセルロースなど未利用資源を原料とするバイオマスリファイナリーに貢献可能な微生物として担子菌に注目している。我々は、褐色腐朽菌*Neolentinus lepideus*が、ヘキソースやペントース発酵能を有することを見出した[1)]。こういったキノコの機能は木質系のみならず、いろいろな場面に応用が期待できると考えている。そこで本研究では、多様な未利用バイオマスを対象とした利活用システムの構築を目的とし、廃棄乳やホエーからのエタノール生産について検討を行った。

【方法】炭素源、酵母エキス、KH_2PO_4、$(NH_4)_2SO_4$、$MgSO_4$・$7H_2O$を含む培地（pH 5）に菌を接種し、28℃で培養した。経時的に採取した試料は、高速液体クロマトグラフで糖およびエタノールの分析を行った。

【結果】ラクトースを唯一の炭素源とし、酵母エキスを含む液体培地で当該担子菌を生育させたところ、速やかな糖の消費とエタノールへの変換を認めた。消費期限の切れた牛乳に窒素源など何も添加せずに発酵させたところ、合成培地と同様の収率でエタノールを生産した。また、同様の方法で、チーズホエーを原料とした場合でも、良好な変換能を示した。このように、本キノコは生息基盤であるリグノセルロースとはかけ離れた性質の原料にも適応できる発酵性を有していることが明らかになった。

1) K. Okamoto *et al.*, Enzyme Microb. Technol. in press.

waste milk, cheese whey, ethanol

講演番号：2B03a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ B校舎03会場

デンプン発酵性担子菌による生ごみからの直接的エタノール生産

Direct ethanol production from kitchen garbage by a starch-fermenting basidiomycete fungus

○岡本 賢治、米田 元輝、簗瀬 英司（鳥取大工・生応工）
○Kenji Okamoto, Motoki Yoneda, Hideshi Yanase (Tottori Univ.)

【目的】自然界に生息する担子菌の中には、酵母と同様に、グルコースをはじめとする糖質のみならず、デンプンなどの多糖類をエタノールに直接変換するものが存在する。我々は、幅広い発酵性を持つ担子菌によるバイオマスリファイナリー構築を目的とした研究を行っている。未利用バイオマスの中で、木質系とは異なり、地域や季節を問わず年中入手可能なのが、我々の生活に直結した食品系廃棄物である。現在、国内の年間排出量1900万トンのうち、約27%が肥飼料等にリサイクルされているのみで、多くは焼却処分となっている。今後、環境への影響および新たなエネルギー資源として、その利活用技術の確立が求められる。そこで今回、担子菌による生ごみの発酵について検討した。
【方法】炭素源、酵母エキス、KH_2PO_4、 $(NH_4)_2SO_4$、$MgSO_4$・$7H_2O$を含む培地（pH 5）に菌を接種し、28℃で培養した。経時的に採取した試料は、高速液体クロマトグラフで糖およびエタノールの分析を行った。
【結果】担子菌をポテト、コーン、小麦由来の各デンプン培地で発酵させたところ、デンプンの種類に関係なく、比較的良好な収率でエタノールを生産した。発酵過程でのデンプン分解酵素の活性にも大きな差異は認められなかった。次に、デンプンを含む原料として、小麦フスマを対象とした発酵試験を行った。その結果、小麦フスマに含まれる糖質が効率良くエタノールに変換されており、本菌はデンプン系原料からのエタノール生産に有効であることがわかった。さらに、大学内の食堂より入手した生ごみを原料とし、酵素等を加えない条件下で発酵を行ったところ、エタノールを直接的に生産できた。この時、生ごみに含まれる糖質の7割以上がエタノールに変換されていた。このように、発酵能を有する担子菌はリグノセルロース資源のみならず、生ごみのリサイクルなど多様な場面での応用が可能と考えられる。

kitchen garbage, starch, ethanol

講演番号：2B03p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ B校舎03会場

リグニン分解酵素発現におけるカルモデュリンの働き

Effects and molecular mechanism of calmodulin on the expression of ligninolytic enzymes

○阪本 鷹行、矢尾 祐樹、上田 美波、本田 与一[1]、亀下 勇[2]、鈴木 一実、入江 俊一（滋賀県大・環、[1]京大・生存研、[2]香大・農）

○Takaiku Sakamoto, Yuki Yao, Minami Ueda, Yoichi Honda[1], Isamu Kameshita[2], Kazumi Suzuki, Toshikazu Irie (Shigakendai, [1]Kyoudai, [2]Kadai)

【目的】白色腐朽菌*Phanerochaete chrysosporium*は10種のリグニンペルオキシダーゼ遺伝子（*lip*）と5種のマンガンペルオキシダーゼ遺伝子（*mnp*）を持つと言われている。本研究室で行ったトランスクリプトーム解析、カルモデュリン（CaM）阻害剤W-7を用いた試験などの結果から、*P. chrysosporium*の*lip*および*mnp*発現は、CaMシグナルにより調節を受けることが強く示唆されている。本研究では、*lip*および*mnp*発現調節に関与するCaM相互作用タンパク質の検索を目的の一つとし、ファージディスプレイ法を用いて*lip*および*mnp*発現時の*P. chrysosporium*培養物由来のcDNAライブラリからCaM相互作用タンパク質を網羅的に取得する。また、従来から*lip*および*mnp*発現に関与すると言われているcAMPシグナルとCaMとの関連についても考察する。
【方法】10 mMのcAMPとホスホジエステラーゼ阻害剤として500 μMのIBMXを添加した条件と、100 μMのW-7を添加した条件を組み合わせて*P. chrysosporium*を培養し、LiPおよびMnP酵素活性測定、転写物量測定を行った。次に、*lip*および*mnp*発現時の菌体から作製したcDNAライブラリ由来のペプチド鎖がディスプレイされたファージライブラリを作製した。組換え*P. chrysosporium* CaMタンパク質をプレートに固定し、得られた組換えファージライブラリを2 mMのCa^{2+}存在条件で加え、Ca^{2+}入りの溶液で洗浄した後に、5 mMのEGTAを含むバッファにてファージを溶出した。さらに、溶出したファージを大腸菌に感染させて増幅し、同様のスクリーニングを繰り返し行うことでCaM結合性の高いと考えられる組換えファージを選抜した。
【結果】培養物にcAMPとIBMXを添加したところ、有意にLiP活性およびMnP活性が増加した。また、cAMP、IBMXに加えてCaM阻害剤として100 μMのW-7を添加したところ、酵素活性は消失した。以上のことは、*lip*および*mnp*発現において、CaMシグナルがcAMPシグナルの下流に位置することを示唆している。次に、選抜したファージについて、ランダムに288プラークをピックアップし、組み込まれたcDNAの配列を決定して遺伝子情報のアノテーションを行った。37個がキシロースリダクターゼ遺伝子由来であった。また、活性酸素種との応答にも関与すると考えられるオキシステロール結合タンパク質遺伝子由来のプラークが8個検出された。他には、Rin（CaM結合性Ras様タンパク質）遺伝子、ヒートショックタンパク質遺伝子、クロマチン形成関連遺伝子群などが検出された。現在、これらの全長配列をクローン化し、大腸菌を宿主とした組換えタンパク質を生産させ、プルダウン法によるCaM結合性の確認を行っているところである。

basidiomycete, white-rot fungi, lignin

講演番号：2B03p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ B校舎03会場

担子菌ラッカーゼ発現によるイネ稈の細胞壁組成変化

Changes in chemical composition of rice straw by fungal laccase expression.

高橋麻紀、澤口知歩、渡辺藍子、濁川睦[1]、古川佳世子[1]、飯村洋介[2]、梶田真也[3]、小口太一[4]、伊藤幸博[1]、○園木和典（弘前大農学生命・分子生命、[1]東北大院農・環境、[2]産総研つくばセ、[3]東農工大院BASE、[4]筑波大GRC）

Maki Takahashi, Chiho Sawaguchi, Aiko Watanabe, Mutsumi Nigorikawa[1], Kayoko Furukawa[1], Yosuke Iimura[2], Shinya Kajita[3], Taichi Oguchi[4], Yukihiro Ito[1], ○Tomonori Sonoki. (Hirosaki Univ., [1]Tohoku Univ., [2]AIST, [3]Tokyo Univ. Agr. Tech., [4]Tsukuba Univ.)

【目的】リグノセルロースを原料とした燃料や化学品の商業的生産を実現する上では、リグノセルロースの糖化効率を向上させることが重要である。リグニンは、リグノセルロースの物理的強度を高めてセルロース成分の単離を難しくするだけでなく、セルロース分解酵素を非特異的に吸着して、酵素の不活性化を引き起こすため、糖化反応効率を制限する主要な因子である。そのためリグニン含量の少ない植物の開発は、燃料や化学品原料の商業的生産にとって重要な要素の一つである。そこで本研究では、担子菌カワラタケ（*Trametes versicolor*）由来のリグニン分解酵素（ラッカーゼIII（LacIII））を活用したリグニン含量の少ない植物の開発に向けて、LacIII発現が及ぼすイネ形質転換体の細胞壁組成への効果を評価した。

【方法】LacIII をコードする cDNA（*LacIII*）の 3’末端に、*Cellulomonas fimi* Endoglucanase A 由来のドメイン間リンカー配列を介して、*Clostridium cellulovorans* 由来のセルロース結合ドメインをコードする遺伝子領域（*CBD*）を連結した（*LacIII-CBD*）。遺伝子発現プロモーターはイネにおいて高発現プロモーターとして利用されている、トウモロコシ由来のユビキチンプロモーターを使用した。調製した遺伝子コンストラクトを用いてイネ（*Oryza sativa* L.）を形質転換し、出穂期まで生育した各形質転換イネの稈について、それぞれ LacIII 活性と細胞壁組成を測定した。LacIII 活性は 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)を基質として A_{405} の変化で評価した。細胞壁組成は酸加水分解により溶出した還元糖量からセルロース量とヘミセルロースを含む非結晶性多糖量を、酸加水分解後の残渣から Klason リグニン量と灰分量を測定した。

【結果】LacIII-CBDを導入した全ての形質転換体において非結晶性多糖量が上昇し、セルロース量が減少していた。これはCBDがセルロースに結合したことにより、セルロースの結晶度が低下したためと考えられる。LacIII活性が確認されたLacIII-CBD形質転換イネにおいては、コントロール系統と比較して有意にリグニン含量が減少していた。これまでにLacIIIを発現させてリグニン含量が減少したという報告例はなく、CBDと融合して生産させた結果、植物細胞壁中のセルロース繊維に結合し、部位特異的にLacIIIが局在して機能した結果と考えられる。

本研究の一部は、弘前大学若手研究者支援事業、形質転換植物研究拠点共同研究の支援を受けて実施した。

Laccase, Cellulose binding domain, Rice straw

講演番号：2B03p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ B校舎03会場

多次元NMR法による^{13}C標識化リグノセルロースの解析戦略

Analytical strategy for ^{13}C labeled lignocellulose by multidimensional NMR

○小松 功典[1]、奥下 慶子[1]、菊地 淳[1,2,3,4]
[1]横市大院生命ナノ、[2]理研PSC、[3]理研ＢＭＥＰ、[4]名大院生命農学
○Takanori Komatsu[1], Keiko Okushita[1], Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[1]Grad. Sch. NonobioSci., Yokohama City Univ., [2]RIKEN PSC, [3]RIKEN BMEP, [4]Grad. Sch. Bioagri., Nagoya Univ.

植物細胞壁の構成成分であるリグノセルロースは，地球上に最も豊富に存在し，なおかつ世界中で入手可能なバイオマス資源である。再生可能資源であるリグノセルロースを原料とするバイオリファイナリーは，化石燃料依存の社会を根本的に変えるコンセプトとして注目されている[1]。リグノセルロースは，セルロース，ヘミセルロース，およびリグニンからなる難分解性の高分子混合物であり，バイオリファイナリーの推進には，リグノセルロースの物性および構造の解析が重要である。

既に米国では^{1}H-^{13}C相関NMRスペクトルを主力とした細胞壁プロファイリングが始動しているように，リグノセルロースの解析にNMR法が活用され始めている[2]。試料中の炭素を^{13}C核で標識すれば，蛋白質の構造解析が多次元NMR法の活用によって推進されたように，リグノセルロース解析の世界も変革できるかもしれない。我々はこうした着眼点から，^{13}C標識リグノセルロースに対して各種多次元NMRパルス系列 (2D-HSQC, 2D-HSQC-TOCSY, 2D-HSQC-NOESY, 2D-HMBC, 2D-INADEQUATE, 2D-LASSY, 3D-HCCH-COSY, 3D-TOCSY-HSQC) を駆使して構造解析をおこなった。その結果，過去に蓄積された帰属情報 [3,4] に依存したシグナル帰属のみならず，^{1}H-^{13}Cおよび^{13}C-^{13}Cスピン相関より実験的に多糖およびリグニンのシグナルを帰属することができた。特に3次元のパルス系列は，2次元のパルス系列と比較して，シグナルをより分離させるため，効率的なシグナル帰属を可能にした。また本会では，相関シグナルの先鋭化により重合構造の詳細を解析できるか議論したい。

引用文献

[1] J. Ragauskas, *et al.,* The Path Forward for Biofuels and Biomaterials, *Science* **311**, 484-489 (2006) [2] Ö. P. Çetinkol, *et al*., Understanding the impact of ionic liquid pretreatment on *eucalyptus*, Biofuels **1**, 33-46 (2010) [3] H. Kim, et al., Solution-state 2D NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO-*d6*/pyridine-*d5*, *Org. Biomol. Chem.* **8**, 567-591 (2010) [4] J. Rencoret, et al., Lignin Composition and Structure in Young versus Adult *Eucalyptus globulus* Plants, *Plant Phys.* **155**, 667-682 (2011)

lignocellulose, multidimensional NMR, ^{13}C labeling

講演番号：2B03p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ B校舎03会場

イオン液体を用いた木質バイオマスの溶解：HSQC 核磁気共鳴分析

Dissolution of ball-milled woody biomass in ionic liquid systems at room temperature: HSQC NMR analysis

○QU Chen、岸本崇生、濱田昌弘、中島範行（富山県大工・生工研セ）
○QU Chen, KISHIMOTO Takao, HAMADA Masahiro, NAKAJIMA Noriyuki (Toyama Prefectural University)

【Objective】A method for NMR characterization of whole cell-wall components, including lignin, cellulose and hemicellulose, was recently developed in our laboratory. The method consists of ball milling of cell wall, dissolution in an ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim]Cl) at 100 °C, *in situ* acetylation, recovery of the material from the solution, and characterization of the product by ^{1}H–^{13}C correlation heteronuclear single quantum coherence (HSQC) NMR spectroscopy in dimethyl sulfoxide (DMSO)-d_6. A higher dissolution temperature was applied compared to some other solvent systems for wood. These conditions have a higher degradation possibility for wood components. In this study, several ionic liquids with or without co-solvent were used to find milder dissolution conditions.

【Method】Ball-milled plant cell walls (0.1g) were dissolved in ionic liquid with or without co-solvents in different ratios and then were *in situ* acetylated with pyridine–acetic anhydride. The acetylated plant cell walls were characterized by HSQC method.

【Results】Ionic liquid 1-ally-3-methylimidazolium chloride ([Amim]Cl), 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim]OAc), and 1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate ([Emim][(MeO)HPO_2]) were effective for fir (*Abies sachalinensis*) wood dissolution. The addition of co-solvent DMSO, *N,N*-dimethyacetamide (DMAc) and pyridine to these ionic liquids were quite efficient to decrease the dissolution temperature. For example, complete dissolution of the ball-milled fir wood was achieved even at room temperature (30 °C) by using these co-solvent in [Amim]Cl. Hardwood white birch (*Betula platyphylla*) and Gramineae, hachiku bamboo (*Phyllostachys nigra*) prepared by ball-milling were also dissolved in the ionic liquid solvent system.

HSQC NMR experiments of the acetylated plant cell walls regenerated from [Amim]Cl–DMAc and from [Amim]Cl–pyridine were successfully conducted. Assignments of NMR signals of the acetylated plant cell wall components, including cellulose, hemicelluloses and lignin, were achieved. The procedure is applicable for the analysis of cell wall components, including cellulose, hemicelluloses and lignin, in various kinds of bimasses without isolation of the components.

ionic liquid, biomass, HSQC

講演番号：2B03p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ B校舎03会場

溶液NMR法による木質バイオマスの定量と精密構造解析

Quantification and accurate structural analyses of wood biomass using solution NMR spectroscopy

○西村 裕志[1,2,3]、岡村 英保[1,3]、小澤 佑[1]、渡辺 隆司[3,4]、片平 正人[1,3]（[1]京大・エネルギー理工学研究所、[2]JSPS、[3]CREST、[4]京大・生存研）

○Hiroshi Nishimura[1,2,3], Hideyasu Okamura[1,3], Yu Kozawa[1], Takashi Watanabe[3,4], Masato Katahira[1,3] ([1]Inst. of Adv. Energy, Kyoto Univ., [2]JSPS, [3]CREST, [4]Res. Inst. for Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ.)

【目的】陸生バイオマスの大半を占める木質バイオマスを有効に活用することは、環境調和型の持続可能な社会を実現する上で重要である。木質バイオマスは主にセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンによって構成されているが、木材組織の中でこれらの構成物質がどのような分子構造をとっているかを正確に把握することは重要な課題である。木材細胞壁構造を包括的に理解する方法として、非破壊測定法であるNMRは有効な手段である。木材を可能な限りインタクトな状態で溶液 NMR 法に適用できれば、化学処理や成分分離をすることなく、木材組織内部の化学構造を原子レベルで把握することが可能となる。本研究では、微粉末木粉そのものを溶液NMRに適用することで、木質細胞壁構造全体を把握し、^{1}H-^{13}C HSQC NMR を中心に定量と精密構造解析することを目的とした。

【方法】木粉は、Fritsch社製ミル (Pulverisette p-6) を用いて微粉砕化し、NMR測定に供した。加熱、酸化の影響を抑えるための粉砕条件の検討を行い、のべ1.5 時間の粉砕処理を行った。NMR測定は超高感度検出器(クライオプローブ)を装着したBruker社製 600 MHz NMR 装置を用いた。

【結果】木材細胞壁構造解析のためには、できる限り温和な条件での微粉末化(ボールミル処理)とNMR測定溶媒への溶解が重要である。本研究では試料調製法の検討を行い、高分解能かつ高感度で^{1}H-^{13}C HSQC NMRスペクトルを取得することができた。

木質バイオマスを評価する上で、構成成分の定量評価は重要である。特に、リグニンの分岐構造やリグニンと糖の結合部(LCC)などNMR法によってのみ観測可能な微細構造を分離し、定量することは、バイオマスの特性を把握する上で重要である。1次元のQ-^{13}C -NMR や 固体NMR法では、植物細胞壁内部の多様な微細構造をスペクトル分離することは困難である。また、通常の^{1}H-^{13}C HSQC NMRスペクトルは定量性が低い。定量を達成するためには、オフレゾナンス効果、緩和時間の相違などを考慮する必要があり、特に重要な留意点として、結合定数($^{1}J_{CH}$)の相違によるシグナル強度差が挙げられる。木材中の構造は多様であるため、定量する結合の$^{1}J_{CH}$はそれぞれ異なる。本研究では、TROSY/anti-TROSY測定により、微細構造を含めた各構成成分の$^{1}J_{CH}$を算出することで定量精度の向上を試みた。またHSQC法を凌駕する高分解能で^{1}H-^{13}C TROSY NMRスペクトルを取得することができた。今後、木質バイオマスの樹種や部位の相違による特性評価や、化学変換・微生物変換過程のモニタリングなどのバイオマス評価系への応用が期待される。

NMR, biomass, lignin

講演番号：2B03p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ B校舎03会場

木材腐朽菌による木質バイオマス分解過程のNMR法を用いた解析

NMR analysis of wood biomass in the course of degradation by wood-rotting fungi

○小澤 佑[1]、西村 裕志[1,2,3]、片平 正人[1,2]、渡辺 隆司[2,4]（[1]京大・エネルギー理工学研究所、[2]CREST、[3]JSPS、[4]京大・生存研）

○Yu Kozawa[1], Hiroshi Nishimura[1,2,3], Masato Katahira[1,2], Takashi Watanabe[2,4] ([1]Inst. of Adv. Energy, Kyoto Univ., [2]CREST, [3]JSPS, [4]Res. Inst. for Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ.)

【目的】陸上のバイオマスの大部分を占める木質バイオマスの利用は、資源、環境の面から重要である。しかし木質バイオマスは難分解性のリグニンに守られており、変換利用が難しい。木材腐朽菌はリグニンの防壁を突破し、木質を分解できる唯一の生体機構であることが知られている。褐色腐朽菌はセルロースを選択的に分解し、白色腐朽菌、特に選択的白色腐朽菌はリグニンを選択的に分解する。これらの菌の分解機構、特に分子レベルの情報を知ることは木質バイオマスの有効利用の為に非常に有用であると考えられる。そこで本研究では、溶液NMR法によって木材細胞壁構造を高精度に解析する方法により、腐朽形態の異なる代表的な木材腐朽菌による木質バイオマス分解過程を包括的に解析する事を目的とした。

【方法】褐色腐朽菌*Gloeophyllum trabeum*、非選択的白色腐朽菌*Phanerochaete chrysosporium*、選択的白色腐朽菌*Ceriporiopsis subvermispora*の３種類の木材腐朽菌を、２種類の培地(ブナ木片培地、木粉培地)にそれぞれ植菌し、28˚Cの同条件下で培養を行った。培養期間は３日から２ヶ月間とし、数日間隔で試料を採取し、木材細胞壁構造の解析と菌体外酵素活性評価を行った。腐朽試料は遊星型ボールミルを用いて微粉砕し、DMSOに溶解し、溶液NMR測定（^{1}H-^{13}C-HSQC）に供した。測定は超高感度検出器(クライオプローブ)を装着したBruker社製 600 MHz NMR 装置を用いた。また、菌体外画分について糖分解酵素(β-D-グルコシターゼ)、リグニン分解酵素(ラッカーゼ、ペルオキシターゼ、マンガンペルオキシターゼ)活性を測定した。

【結果】HSQC-NMRの積分値から、各成分についてリグニンの芳香族環との比を求めたところ、選択的白色腐朽菌、非選択的白色腐朽菌に関して、酸化されたリグニン芳香環の比率が増加していた。また、リグニン芳香環に対して、リグニン側鎖の結合(β-βやβ-5など)が優先的に減少していくことが分かった。これらのことから白色腐朽菌によるリグニン分解に伴い、酸化反応が起こること、芳香環の開裂より側鎖の分解が優先的に起こることが確認できた。積分値から求めたリグニンのシリンギル基とグアイアシル基の量比は、全ての菌種で変化した。このことから褐色腐朽菌であっても、リグニン構造を変化させていることが分かった。このように腐朽した木材中の成分を、NMR法によって官能基レベルで、包括的に解析することができた。今後はより詳細な構造情報の解析をおこなっていく予定である。

lignin, NMR, basidiomycete

講演番号：2B03p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ B校舎03会場

リグノセルロースバイオリファイナリーのための単離リグニンのFT-ICR MS

FT-ICR MS of the isolated lignin for lignocellulosic biorefinery

○吉岡 康一[1]、渡辺 隆司[1,2]（[1]京大・生存研、[2]CREST）
○Koichi Yoshioka[1], Takashi Watanabe[1,2] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]CREST)

【目的】現行のリグノセルロースバイオリファイナリーでは、セルロースやヘミセルロースの利用を中心としており、リグノセルロースの主要成分であるリグニンは熱源などに利用されているのみで、有効な利用はされていない。これらを高付加価値な芳香族基幹物質に変換することで、今後の化学産業の発展に繋がる。しかしながら、リグニンの構造に関しては、その分子量や配列、ネットワーク構造については不明な点が多く、分解および残渣リグニンの構造の解析は非常に困難である。そこで、本研究ではこれらリグニンを活用するために、超高分解能質量分析 FT-ICR MS を用いたリグニンの新規構造解析法の構築を試みた。
【方法】質量分析の試料には、有機溶媒抽出成分を取り除いた針葉樹および広葉樹を用いた。ボールミルによる粉砕の後、ジオキサン水溶液で抽出した単離リグニンを調製し、測定に用いた。質量分析計には、FT-ICR MS (solariX 7.0T, Bruker Daltonics)を用い、イオン化法にはMALDIおよびESI法を用いた。β-*O*-4型二量体リグニンモデルおよび単離リグニンの衝突誘起解離 (CID)によるMS/MSもおこない、開裂パターンを解析した。
【結果】得られたマススペクトルにおいて、リグニン側鎖のβ-*O*-4結合をはじめ、単量体単位間の主要な結合を示唆するピークが観測できた。さらに、それぞれのマススペクトルにおいて、樹種間でのモノマー構造の相違や、広葉樹樹種内での内部配列の違いが見られた。β-*O*-4型二量体リグニンモデルのMS/MSでは、エーテル結合の開裂を主としたMS/MSスペクトルが得られた。この手法を単離リグニンに適用させたところ、特定のイオンをプリカーサーイオンとして選択した場合、*m/z*=226および196の間隔で、プロダクトイオンが観測された。これらは、シリンギル型およびグアイアシル型のβ-*O*-4結合の開裂パターンと一致した。その他の単量体単位間の結合については、解析中である。

lignin, FT-ICR MS, CID

講演番号：2B03p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ B校舎03会場

タイトル: ヒノキ高効率酵素糖化の為のアルコールオルガノソルブ処理法の検討

Title: Investigation of the alcohol organosolv treatments for the enzymatic hydrolysis of Japanese cypress

○秀野　晃大、川嶋　文人[1]、遠藤　貴士[2]、本田　克久[1]、森田　昌敏[1]（愛媛大・上級研究員セ、[1]愛媛大・農、[2]産総研・バイオマス研セ）

○Akihiro Hideno, Ayato Kawashima[1], Takashi Endo[2],Katsuhisa Honda[1], Masatoshi Morita[1] (SRFC Ehime Univ., [1]Fac. Agri. Ehime Univ., [2]AIST BTRC)

【目的】2011年3月11日の東北関東大震災によって発生した福島第一原発事故により、日本のエネルギー政策は根本的な見直しを迫られている。エネルギー多様化による安全保障や、循環型社会の構築、環境産業の主導権を握るという観点からも、木質系バイオエタノールに関する国産技術の開発が望まれる。本研究では、木質系バイオマスのモデルとしてヒノキを用いて、低コストで高糖化率を可能にする前処理法の開発を目指し、オルガノソルブ処理法の検討を行った。

【方法】約15 gのヒノキサンプル及び各種反応溶媒80 mLを入れたガラス内筒（100 cm^3）を、TPR-1型ポータブルリアクター（耐圧硝子工業株式会社）の金属容器に入れ、リアクター内部のヘッドスペースを窒素で置換し、温度コントローラーを用いて種々の温度（140-200°C）、時間（30-60 min）で反応を行った。反応溶媒はメタノール、エタノール、エチレングリコール、水の混合溶媒を用いた。触媒としては、微量の酢酸、塩酸、硫酸を用いた。約400 mLのエタノールを用いてサンプルの洗浄および吸引濾過を行い、残渣を回収し、55˚C、20-21時間の真空乾燥を行った。一部のサンプルは微粉砕処理を行う為に、サンプル約1.8 g、ボール（直径5 mm）約90 gを用いて、400 rpm、10分間でボールミル処理を行った。処理物はX線結晶回折による結晶化度の変化を解析するとともに市販酵素による糖化試験により評価した。

【結果】これまでの実験結果から、酢酸添加オルガノソルブ処理物はボールミル処理を組み合わせると酵素糖化に有効であることがわかっている。本処理物のX線結晶回折の結果、ボールミル処理によって結晶化度が大幅に減少していた。ボールミル処理はエネルギー消費が大きいため、微量の強酸を添加したオルガノ処理について検討を行ったところ、0.4%塩酸含有50%エタノール水溶液で、170℃、45分間の処理が糖化に有効であった。さらに糖化酵素を至適化することによりボールミル処理と同等以上のグルコース収率が得られた。本処理物の結晶化度を調べたところ、無処理物よりも増加しており、ボールミル処理物とは異なる要因による糖化の促進効果が示唆された。微量強酸添加オルガノソルブ処理物の電子顕微鏡による観察から、表面に多数の球状物質（0.2-5μm）が確認され、リグニンの一部が溶出、変性したことが示唆された。本研究の一部は科研費（22780292）の助成を受けたものである。

Japanese cypress, alcohol organosolv treatment, enzymatic hydrolysis

講演番号：2B03p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ B校舎03会場

植物内生菌由来酵素を利用したアルカリ前処理稲わらの効率的糖化

Effective saccharification of alkali-treated rice straw using enzyme from endophytes

○岩井崇郎、伊藤由美、工藤綾子、田中みち子、阿部　歩、曾根輝雄、城間　力[1]、徳安　健[1]、矢部希見子[1]、長島　實[1]、浅野行蔵（北大院農・応生科、[1]食総研）

○Takao Iwai, Yumi Ito, Ayako Kudo, Michiko Tanaka, Ayumi Abe, Teruo Sone, Riki Shiroma[1], Ken Tokuyasu[1], Kimiko Yabe[1], Minoru Nagashima[1] and Kozo Asano (Hokkaido University, [1] National Food Research Institute)

【背景】 近年、稲わらを原料としたバイオエタノール生産が脚光を浴びている。稲わらバイオエタノールには、食糧との競合の回避、資源の有効利用、新たな燃料資源創出等の利点がある。しかし糖化の工程に要する酵素費用のコストが普及におけるハードルとなっている。本研究ではこの問題を解決するため、植物内生菌を資源として、稲わらバイオエタノール生産において市販酵素の糖化を促進する酵素を探索した。植物内生菌とは、宿主に病徴を示すことなく植物体内に生息する微生物の総称であり、宿主に侵入する際、植物細胞壁の分解を担う酵素を生産すると予想される。植物内生菌を利用したバイオエタノール生産は前例がなく、新たな知見が得られると予想した。

【実験】 植物内生菌スクリーニングによって得た *Fusarium* sp. E12-4CA 株及び *Bacillus* sp. 13-2CA 株について、小麦ふすまを用いた培地上での温度、期間に関する最適条件を検討し、また液体培養での培地、炭素源、温度、期間を検討した。さらに *Fusarium* sp. E12-4CA 株由来菌体外粗酵素を各種イオン交換樹脂によって処理し、酵素活性の変化を観察した。なお、粗酵素の糖化能は以下のように測定した。クエン酸緩衝液中で 3 種の市販酵素（Celluclast 1.5L、Novozyme 188、Ultraflo L、いずれも Novozyme 社製）を調整し、植物内生菌由来粗酵素と混合して酵素カクテルを作成した。アルカリ処理した稲わらを酵素カクテルによって糖化（40℃、24 h、160 rpm）し、反応後、遠心によって上清を回収した後、上清中のグルコース及びキシロース濃度を測定し、糖化率を算出した。なお、アルカリ前処理法には、（独）農研機構によって開発された CaCCO 法を採用した 1)。CaCCO 法は水酸化カルシウムによって稲わらをアルカリ処理し、中和に CO_2 を用いるという特徴を持つ。この特徴から、ワンバッチでの稲わらバイオエタノール生産が可能となる。

【結果及び考察】 培養条件検討の結果、*Fusarium* sp. E12-4CA 株は小麦ふすま培養において 27℃の条件下で 3 日間培養した場合、最も高い糖化能が得られた。具体的には、市販酵素と E12-4CA 由来酵素を混合した酵素カクテルを用いると、90%以上の稲わらキシランを糖化することが判明した。また *Bacillus* sp. 13-2CA 株については、ふすま固相培養と液体培養の両方で十分な糖化能が得られた。この結果から、今後はジャーファーメンターによる大量培養を前提として、液体培養を選択することにした。更に 13-2CA 株を蒸留残渣の上清中で 24 h 培養した場合、高い糖化能が得られたことから、蒸留残渣を利用したオンサイト酵素生産の可能性が示された。イオン交換樹脂処理については、E12-4CA 由来菌体外粗酵素のグルカン糖化能を高めることに成功した。

1) Park, J. Y. *et al.*, 2010., Bioresour. Technol., 101, 6805-6811.

rice straw bioethanol, hemicellulolytic enzyme, endophyte

講演番号：2B03p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ B校舎03会場

濾紙を基質とした中高圧条件下でのセルラーゼ反応について

Cellulase reaction using filter paper as a substrate under high-statistic pressure

○藤田 智之，栗原 聖[1]，濱田 龍馬[1]，来山 哲二[2]，采女 信二郎[2]（信州大院・農，[1]信州大・農，[2]ポエック）

○Tomoyuki Fujita, Sho Kurihara[1], Ryoma Hamada[1], Tetsuji Kitayama[2], Shinjiro Uneme[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Puequ)

【目的】セルロースなどの植物系バイオマスはバイオエタノールの原料となるため、環境負荷低減などで注目されている。これまでにセルラーゼ反応の効率化を目的として、市販の酵素６種の圧力依存性を評価したところ、中高圧条件 (~100MPa) での加圧により酵素活性が昂進し、アビセルを基質とした場合には還元糖生成量が２倍に増加することを報告した。[1)] 今回は還元糖生成量を指標に、濾紙を基質としてセルラーゼ反応を行い、中高圧処理の影響について調査した。

【方法】酵素は圧力依存性が認められたセルラーゼ Celluclast 1.5L (Novozymes社) を用いた。セルラーゼ単独もしくはセロビオースのβ-1,4結合を分解する β-Glucosidase (β-G) を1%添加して行った。基質には食品用ミルで粉砕した破砕濾紙を用いた。チャック付き袋に基質、0.25M酢酸緩衝液 (pH4.5) を入れ、酵素を添加して、大気圧 (0.1MPa; AP) または加圧 (90MPa; PP) 下、50℃で反応した。反応後、生成した還元糖量をSomogyi-Nelson法 (660nm) で定量した。

【結果及び考察】アビセルでの反応条件を参考に、緩衝液 10ml 中、濾紙25mg、酵素量10%（対基質重量）で反応を行った結果、AP条件に比べてPP条件で還元糖生成量が暫時的に増加した。PP条件下での生成量はAP条件下での1.5倍程度であった。β-Gを添加するといずれの場合も生成量が増加したが、その効果はPPで顕著であり、168時間でほぼ原料が消失した (図1)。

さらに、反応液中の基質濃度を変化させ、還元糖生成量を比較した。緩衝液 1ml または 2ml 中、濾紙100mg、酵素量2.5%（対基質重量）として10 ml 中での反応と比較した結果、基質濃度を高くすると、還元糖生成量はAP、PPともに顕著に増加したが、10%濃度では逆に低下した。β-G添加でも同様の傾向が認められ、β-G無添加と比較して還元糖生成量が増加した (図2)。

以上の結果から、中高圧条件下での加圧とβ-G添加によりセルラーゼ分解反応が促進されることが明らかになった。今後、さらに詳細な反応条件の検討を行う予定である。

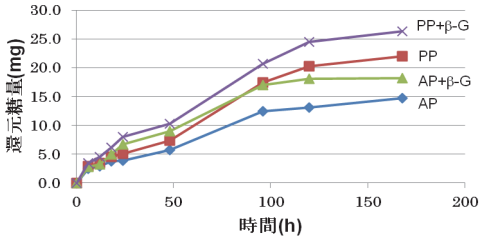


図1 酵素10%量添加の経時的変化

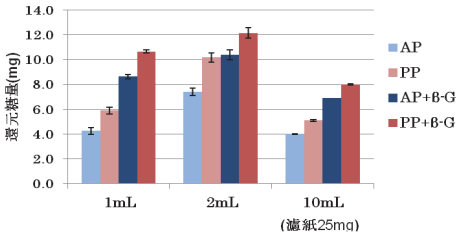


図2 基質濃度と還元糖生成量の比較(24h)

1) 2010年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p.257 (2010)

high-statistic pressure, cellulose , β-glucosidase

講演番号：2B03p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ B校舎03会場

ルーメン細菌*Fibrobacter succinogenes* S85株由来アセチルキシランエステラーゼFSUAxe6Bの生化学的解析

Biochemical and domain analyses of acetylxylan esterase FSUAxe6B from rumen bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85

○吉田昭介、マッキーロデリック[1]、カーンアイザック[1]（慶応大理工、[1]イリノイ大）
○Shosuke Yoshida, Roderick Mackie[1], Isaac Cann[1] (Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [1]Univ. Illinois)

【目的】

地球上に豊富に存在する非食料系のバイオマスである植物細胞壁多糖が次世代の燃料源として注目されている。反芻動物の第一胃に生息する微生物（ルーメン細菌）は、頑強な構造を持つ植物細胞壁多糖の分解と代謝に関わっていることから、バイオ燃料生産へ応用しようとする動きが本格化している。ルーメン細菌の一種である *Fibrobacter succinogenes* は結晶性セルロースを資化する能力が高く、また多くのヘミセルロース分解酵素を生産する。*F. succinogenes* S85 株は近年ゲノム解読が完了し、我々はそのゲノム上にヘミセルロース分解酵素遺伝子群で構成される遺伝子クラスターを発見した。本クラスター上のアセチルキシランエステラーゼ FSUAxe6B に対する生化学的な解析により得られた知見 [1)]について発表する。

【方法・結果】

一次構造予測から FSUAxe6B はマルチドメイン構造を有していることがわかった。タンパク質の分断化や部位特異的変異体を用いた解析、また構造ホモロジーモデルを用いて、ドメイン毎の機能解析を行った。FSUAxe6B の触媒機構は従来型の Ser-His-Asp (or Glu)からなる catalytic triad とは異なり、Ser-His-**Asp and Glu** からなる catalytic tetrad から構成されることが明らかとなった。また、機能未知ドメインが新規の多糖結合モジュールであることを明らかとなった。FSUAxe6B のキシラン結合ドメインとして同定された FPm-1 は、24 のホモログが *F. succinogenes* ゲノムのみに見出されたことから、本菌の特殊な植物細胞壁多糖の利用形態に関わっていることが示唆された。

1) S. Yoshida, RI. Mackie, and IKO. Cann, *Journal of Bacteriology*, 192(2): 483-493 (2010)

biofuel, rumen, acetylxylan esterase

講演番号：2B03p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ B校舎03会場

ヘミセルラーゼ高生産を目的とした*Humicola insolens*ATCC26908株の培養条件の検討

Cultural condition for efficient hemicellulase production of *Humicola insolens*ATCC26908

○西田 奈緒子[1]、松本 和[3]、小山 善幸[2]、荻原 淳[3]、加藤 順[2]、春見 隆文[3]（[1]日大生資科・農化、[2]日大生資科・生命化、[3]日大院生資研究科・生資利用）

○Naoko Nishida[1],Hitoshi Matsumoto[3],Yoshiyuki koyama[1],Jun Ogihara[3],Jun Kato[2],Takahumi Kasumi[3]
([1]Dept.Agric.Biol.Chem. Nihon Univ.,[2]Dept.Chem.Life.Sci.,Nihon Univ., [3]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ)

【目的】再生可能な植物バイオマスを原料としたバイオエタノール生産が注目されているが、原料であるトウモロコシやサトウキビは食糧競合性が高いことから、未利用バイオマスであるイナワラからのバイオエタノールの生産方法の確立が求められている。イナワラはキシラン等のヘミセルロースがセルロースと結合した複雑な構造をしており、一般的に使用されている*Trichoderma*由来のセルラーゼ製剤では十分に糖化分解されないことが多い。そこで、*Humicola insolens* ATCC26908株の生産するヘミセルラーゼを併用した効率的なイナワラ糖化方法を確立することを目的として、本菌によるヘミセルラーゼの高生産技術の検討を行う。

【方法】酵素の高生産条件を検討するため、グルコース5%、大豆由来不溶性窒素源A0.3%の組成で三角フラスコ内にて3日間前培養を行った後、これをシードとして2lジャーファメンターにより炭素源のイナワラと窒素源の大豆由来不溶性窒素源Bを5:1の割合で含む培地で本培養を行い、キシラン分解活性、pNP-Xyropyranoside分解活性を測定した。

炭素源の検討ではグルコース5%、大豆由来不溶性窒素源Aを0.3%の組成で3日間前培養を行い、様々なバイオマスをそれぞれ4%、大豆由来不溶性窒素源Bを0.8%の組成で5日間の培養後、pNP-Xyropyranoside分解活性、pNP-Lactopyranoside分解活性、pNP-α-D-glucopyranoside分解活性の測定を行った。

【結果】本菌は凝集しやすく一般的に使用されている培地での液体培養が困難であったが、グルコース 5%・大豆由来不溶性窒素源 B 0.3%からなる培地で培養することによって菌糸が均一に分散した良好な生育を示した。イナワラと大豆由来不溶性窒素源 B の割合を 5:1 と 5:5 で比較した結果、5:5 で培養を行った方が酵素生産において有効であることがわかった。また pH の影響を検討したところ至適 pH は従来の 7 ではなく 6 が最適であった。

ポテトパルプ、ビートパルプ、オノエヤナギ、α-セルロース、アビセル、低リグニン杉などのイナワラ以外の酵素生産に有効な炭素源の探索を行った結果、オノエヤナギで pNP-Xyropyranoside、ポテトパルプで pNP-α-D-glucopyranoside 分解活性が高くなることを確認した。

Humicola insolens, cultural condition, hemicellulase

講演番号:2B03p14
講演日時、会場:3月23日16:32～ B校舎03会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ヘミセルラーゼによるソフトバイオマスの糖化促進効果の検討

Analysis of promotional effect on soft-biomass degradation with hemicellulases from *Aspergillus oryzae*

Title

○村山 浩一, 久田 博元, 堤 浩子, 秦 洋二, 近藤 昭彦[1], 植田 充美[2]（月桂冠・総研, [1]神戸大院・工・応化, [2]京大院・農・応生）

○Hirokazu Murayama, Hiromoto Hisada, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata, Akihiko Kondo[1], Mitsuyoshi Ueda[2] (Res. Inst., Gekkeikan Sake Co. Ltd., [1]Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch., Kobe Univ., [2] Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】将来的に起こりうる石油および食糧供給問題などの観点から，非可食であるセルロース系バイオマスからの代替エネルギー生産が現在望まれている．ソフトバイオマスにはヘミセルロース及びリグニンが多く含有されている事から，セルラーゼ酵素剤のみではセルロースを効率よく分解できない事が知られている．そこで，本研究ではヘミセルラーゼを添加することにより，糖化効率の向上を目指した．

【方法】糖化促進効果のある遺伝子群を*A. niger*由来endo-inulinase (DDBJ No. AB012771), β-galactosidase (DDBJ No. A00968) 及び*A. saitoi*由来α-1,2-mannosidase (DDBJ No. D49827) を選択した．これらのアミノ酸配列情報から，対応する麹菌*A. oryzae*の遺伝子 (DDBJ No. XM_001823193, FM955406 及びAB069647) をそれぞれ見出した．麹菌から各酵素遺伝子をサブクローニングし，麹菌OSI1013 株を宿主として高発現株を作製した．それぞれの酵素高発現株を30℃，GPY液体培地で培養し，これらを含む培養液上清を市販酵素剤に添加して稲わら前処理産物を分解し糖化促進効果を検討した．

【結果】麹菌でendo-inulinase，β-galactosidase及びα-1,2-mannosidase発現株を作製し，各酵素活性を確認した．β-galactosidaseは 6-24 時間の糖化処理で可溶性オリゴ糖の顕著な増加がみられた．

なお本研究はNEDOバイオマスエネルギー等高効率転換技術開発/セルロースエタノール高効率製造のための環境調和型統プロセス開発の一環として行われたものである．

biomass , hemicellulase, *Aspergillus oryzae*

講演番号：2B03p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ B校舎03会場

海洋性超好熱菌*Thermotoga neapolitana*由来耐熱性β-1,3-キシラナーゼの構造安定性

Structural stability of a thermostable β-1,3-xylanase from marine hyperthermophile *Thermotoga neapolitana*.

○岡﨑 文美、仲島 菜々実[1]、荻野 千秋[1]、近藤 昭彦[1]（神戸大・自、[1]神戸大院・工）

○Fumiyoshi Okazaki, Nanami Nakashima[1], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[1] (Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ. [1]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

【目的】β-1,3-キシラナーゼ（1,3-β-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.32）は、海藻特有の多糖であるβ-1,3-キシランを加水分解するエンド型の酵素であり、海藻細胞壁の構造解析やβ-1,3-キシロオリゴ糖の調製、海藻バイオマスの分解に有用な酵素である。しかしながら、これまでに遺伝子が単離され、酵素学的性質が解析されている酵素は、中温菌由来の3酵素のみである。そこで我々は、産業利用上有用な耐熱性β-1,3-キシラナーゼの取得および機能解析を目的とし、海洋性超好熱菌*Thermotoga neapolitana*由来のβ-1,3-キシラナーゼ（*Tn*Xyn26A）の酵素学的性質を解析し、反応至適温度85 ℃の耐熱性酵素であることを明らかにした。本研究では、*Tn*Xyn26Aの構造安定性を明らかにすることを目的として、熱および変性剤による変性過程を分光学的手法により解析した。

【方法】*Thermotoga neapolitana* DSM 4359株のゲノムDNAより*Tn*Xyn26A遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主とするpETシステムで発現した。菌体抽出液を加熱処理した後に、各種クロマトグラフィーを用いて精製酵素を調製した。グアニジン塩酸塩および熱による変性過程を円偏光二色性（CD）スペクトルにより測定し、安定性を解析した。β-1,3-キシラナーゼ活性は緑藻スリコギズタから調製したβ-1,3-キシランを基質とし、生成した還元糖量をSomogyi-Nelson法で定量することにより求めた。

【結果】大腸菌で発現、精製した*Tn*Xyn26Aは、β-1,3-キシランに特異的に作用して重合度 2～3を中心としたβ-1,3-キシロオリゴ糖を生成したことから、エンド型のβ-1,3-キシラナーゼ活性を保持することが確認された。本酵素の反応至適温度は85 ℃付近であり、10分間の熱処理において85 ℃までの熱安定性示し、活性半減期($t_{1/2}$)は、80℃において77.0 h、85 ℃において23.9 hであった。熱変性を遠紫外CDにより測定した結果、85℃付近まで二次構造が保持され、pH 7.0におけるT_mは92.3℃であった。グアニジン塩酸塩による変性滴定を遠紫外CDにより測定した結果、二状態転移モデル（天然状態[N]⇌変性状態[U]）に良く一致し、20℃におけるΔGは85.2 kJ/molであった。以上の結果より、*Tn*Xyn26Aは高い構造安定性を有することが明らかとなった。

xylanase, structural stability, hyperthermophilic enzyme

講演番号：2B03p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ B校舎03会場

海洋性超好熱菌 *Thermotoga neapolitana* 由来 β-1,3-キシラナーゼの耐熱性を導く要因の解析

Structural properties of a thermostable β-1,3-xylanase from marine hyperthermophile *Thermotoga neapolitana*

○山﨑 清志、岡﨑 文美[1]、荻野 千秋[2]、近藤 昭彦[2]、三上 文三[3]、樽林 陽一、鶴田 宏樹
（神戸大・応構、[1]神戸大・自、[2]神戸大院・工、[3]京都大院・農）
○Kiyoshi Yamazaki, Fumiyoshi Okazaki, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo, Bunzo Mikami[1], Yoichi Kurebayashi, Hiroki Tsuruta (CASS, Kobe Univ. [1]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ. [2]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ. [3]Grd. Sch. Agr., Kyoto Univ.)

【目的】*Thermotoga neapolitana* は、イタリア ナポリ湾の浅海底熱水噴出孔から分離された至適生育温度 80℃付近の超好熱性の真正細菌である。我々はこれまでに *T. neapolitana* 由来の β-1,3-キシラナーゼ（*Tn*Xyn26A）の酵素学的諸性質および熱安定性を解析し、優れた触媒速度と高い熱安定性を示す耐熱性酵素であることを明らかにした。本酵素は、海藻特有の多糖である β-1,3-キシランを加水分解するエンド型の酵素であり、海藻バイオマスの分解に有用である。β-1,3-キシラナーゼの立体構造に関する知見は少なく、中温性海洋細菌 *Vibrio* sp. AX-4 株由来 β-1,3-キシラナーゼ（*Vib*Xyl4）の結晶構造が Protein Data Bank に登録されているのみである。そこで、本研究では、新たに耐熱性 β-1,3-キシラナーゼである *Tn*Xyn26A の X 線結晶構造解析を行い、その耐熱性を導く構造特性を明らかにすることを目的とした。
【方法】大腸菌で発現した組換え *Tn*Xyn26A と市販スクリーニングキットを用いたシッティングドロップ蒸気拡散法により、500 以上の結晶化条件をスクリーニングしたところ、0.2 M magnesium chloride、0.1 M sodium HEPES (pH 7.5)、30%(w/v) polyethylene glycol 400（Hampton Research Crystal Screen Cryo Kit No.23）において良質な結晶（0.2 mm×0.1 mm×0.02 mm）を得ることができた。SPring-8 (BL38B1)での回折実験に供することで *Tn*Xyn26A 結晶の結晶学的性質を得た [1)]。分解能 1.82 Å までの回折データを用い、*Tn*Xyn26A と一次構造上 41%の同一性を示す *Vib*Xyl4 の構造モデル（PDB ID: 2DDX）をサーチモデルとした分子置換法により、初期モデルを構築した後、PHENIX プログラムを用いた精密化により最終構造モデルを構築した。
【結果】a=39.06、b=75.83、c=52.14Å、β=109.0˚、空間群$P2_1$の*Tn*Xyn26A結晶を得ることができた。得られた回折データを基に分解能1.82 Åでの構造モデルを R_{factor}=0.197、R_{free}=0.246まで精密化できた。*Tn*Xyn26Aは$(\beta/\alpha)_8$-barrel構造を有し、触媒残基となる２つのグルタミン酸残基が活性中心に配置されていた。この全体構造と活性中心構造は、位相角のサーチモデルとした*Vib*Xyl4と同様の配置であった。中温酵素である*Vib*Xyl4と、それらの構造を保持するための非共有結合の数を比較したところ、*Tn*Xyn26Aでは、分子内の疎水性相互作用及びイオン結合の数が*Vib*Xyl4に比べて多いことが見出された。これらの相互作用の増加が*Tn*Xyn26Aの構造に安定性を付与することで、*Tn*Xyn26A活性の高い熱安定性が導かれることが示唆された。

1) F. Okazaki *et al. Acta Crystallogr. Sect. F* **67**, 779-781 (2011).

crystal structure, hyperthermophilic enzyme, xylanase

講演番号:2B03p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ B校舎03会場

ベトナムの自然環境からの好熱性嫌気性のセルロース分解細菌の取得およびDGGE法を用いた菌叢解析

Screening and Isolation of Thermophilic Cellulolytic Anaerobic Bacteria and Microbial Community Analysis by DGGE Method in Vietnam Natural Environment

ゴー・ドゥック・ユイ、ダオ・ティ・トゥ・ヒェン、チャン・ティ・トゥ・タオ、山田千早[1]、阿藤真[1]、吉田浩爾[2]、五十嵐泰夫[1]、○ホァン・クォック・カン（ベトナム科学技術アカデミー・熱帯生物学研、1東大院・農生科、2東大・生研）

Ngo Duc Duy, Dao Thi Thu Hien, Tran Thi Thu Thao, Chihaya Yamada[1] , Makoto Atou[1] , Kouji Yoshida[2], Yasuo Igarashi[1] and ○Hoang Quoc Khanh (ITB-VAST, 1Grad. Sch. of Agri. Life Sci. The Univ. of Tokyo, 2IIS The Univ. of Tokyo)

【Purpose】This study aimed to accumulate and to isolate thermophilic cellulolytic anaerobic bacteria from Vietnamese natural environment.

【Methods】To obtain cellulolytic bacteria, Vietnamese natural environment samples were collect from compost and paddy field soil in a farmer of Long An Province, the soil under rice straw stock in Tien Giang Province and the soils from swamp in tropical rain forest in Cat Tien National Park, Dong Nai Province. Accumulative serial culture for cellulolytic bacteria was performed in 50 and 60℃. Cellulolytic bacteria were isolated by roll tube method with avicel as cellulolytic activity indicator. Microbial community of accumulation was evaluated by DGGE method for V3 region of bacterial 16s rRNA genes.

【Result】DGGE analysis indicated 5 major bands; Rb1, Rb2, Rc, Re and Rd. The strain Rd was related to *Clostridium thermocellum* strain S14 (HQ315888.1) and *C. thermocellum* DSM 1313 (CP002416.1), however other 4 bands were just related to uncultured bacteria on GeneBank. Accumulation from compost at 50℃ indicated most stable cellulolytic ability therefore the accumulation was used for isolation. Thirty colonies that indicated clear zone was picked up from roll tube after 20 days incubation, and were purified by roll tube method. Finally 3 pure strains were obtained. All of them were rod shaped, gram positive and spore formed microbes. All 3 strains were related to *Thermobacterium thermosaccharolyticum* (M59119) with 16s rRNA gene BLAST search.

This research was supported by JST/JICA-SATREPS, “Sustainable Integration of Local Agriculture and Biomass Industries.

cellulolytic bacteria, DGGE, Vietnamese Natural Environment

講演番号：2B03p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ B校舎03会場

ナノ材料を用いたセルロース分解菌の選択的スクリーニング

Selective screening of cellulose degrading microorganisms using nanomaterials.

○小出　修、津留美紀子、内村康祐、出口　茂（海洋研究開発機構）
○Osamu Koide, Mikiko Tsudome, Kohsuke Uchimura, Shigeru Deguchi (JAMSTEC)

【目的】セルラーゼによってセルロースを高効率でグルコースへと糖化する技術は、地球上で最も豊富な有機物であるセルロース系バイオマスを原料とした物質生産を確立する上で必須である。しかしながら既存の酵素プロセスには、反応速度が遅い、酵素の価格が高いなどの問題が有るため、高活性なセルラーゼを求め、新たな微生物資源の探索が盛んに行われている。我々は、直径が数十nmのナノファイバー状の結晶性セルロースからなる多孔質体を培養担体とした、セルロース分解菌の新しいスクリーニング手法を確立した。セルロース分解菌をセルロースプレート上で培養すると、セルラーゼによって担体であるナノファイバーセルロースが分解され、プレート表面に凹みが形成されるため、微生物のセルロース分解能を簡便、迅速、かつ超高感度に検出できる。これまでに本手法によって、暗黒の深海から新奇なセルロース分解菌を多数分離／培養することに成功した。今回は、セルロースプレートによってセルロース分解菌を集積培養する際の選択性について、クローン解析と分離培養からアプローチした結果を報告する。

【方法】相模湾沖で、深海の堆積物を無菌的に採取し、硫酸アンモニウムを加えた人工海水を含むセルロースプレート表面に塗抹した。15℃で3ヶ月間培養した後、プレート表面に形成された凹みから遺伝子を抽出した。同時に凹みの中の微生物の分離培養も行った。抽出した遺伝子は16S rRNAのユニバーサルプライマーで増幅し、大腸菌のクローンライブラリーを作製して、16S rRNAの遺伝子配列を解析した。分離培養に成功した菌株についても、16S rRNAの遺伝子解析を行った。

【結果】セルロースプレートに形成された凹みから抽出した遺伝子を用いて作製した大腸菌クローンライブラリーから、16S rRNA遺伝子解析によって、3つの門において77株を同定できた。このうち*Ganmma proteobacteria*門5株、*Fibrobactereres*門1株がセルロース分解能を有すると考えられた。また凹みから分離培養に成功し、16S rRNA遺伝子解析による同定が出来たのは、5つの門11株であった。*Microbulbifer*属2株、*Fibrobacter*近縁種1株、*Micromonospora*属1株、*Ruegeria*属1株については、分離株をセルロースプレート上で再度培養し、凹みを形成することを確認した。なかでも分離培養に成功した*Fibrobacter*近縁種の株は、相同性検索によって得られた結果では、最も相同性が高いもので87％（Uncultured clone）であった。ナノファイバーセルロースプレートが、セルロース分解菌の選択的スクリーニングに極めて有用であることが示された。

Cellulose nanofiber, Cellulase, Screening

講演番号：2B03p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ B校舎03会場

深海起源のセルロース分解菌が生産するセルラーゼの機能と特異性の解明

Uniqueness and functions of cellulases from deep-sea bacteria

○内村　康祐、津留　美紀子、小林　徹、小出　修、出口　茂（海洋研究開発機構）
○Kohsuke Uchimura, Mikiko Tsudome, Tohru Kobayashi, Osamu Koide, Shigeru Deguchi (JAMSTEC)

【目的】セルロースからグルコースを効率的に生産する酵素プロセスは、地球上に最も豊富に存在するセルロース系バイオマスを原料とした物質生産を確立するのに必須である。しかしながら既存のプロセスには、反応速度が遅い、酵素の価格が高いなどの多くの問題が有るため、高活性な新規セルラーゼを求めて、微生物資源の探索が現在も盛んに行われている。我々は、これまでに直径数十nmのナノファイバーセルロースから多孔質平板を培養担体とした、セルラーゼ生産菌の超高感度スクリーニング手法を開発した。さらに新手法を用いて暗黒の深海環境から、新規性の高いセルラーゼ生産菌を多数単離することにも成功した。今回は、深海細菌由来のセルラーゼの機能と特異性の解析を試みた結果を報告する。

【方法・結果】多孔質セルロース平板上で、微生物を培養すると、通常の寒天と全く同様にコロニー形成が見られる。ところが、セルラーゼ生産菌を培養した場合には、培養担体であるナノファイバーセルロースが迅速に加水分解され、培地表面に凹みが形成される。つまり凹み形成の有無を指標として、微生物のセルラーゼ生産能を簡単に識別できる。これまでに多孔質セルロース平板を用いたスクリーニングによって、深海サンプルからセルラーゼ生産菌を多数分離した。分離菌株はいずれも 16S rRNA 解析より極めて新規性が高いことがわかっている。

太陽光が届かない深海に存在するセルロースは、海洋表層で植物プランクトンなどによって生産され、沈降したものと考えられる。また沈降過程では無定形領域や結晶性の低い領域が優先的に分解された結果、深海のセルロースは存在量が少ないのに加えて分解されにくい結晶性領域の割合が高いと予想される。このようなセルロースを基質とする深海由来セルラーゼは、陸上由来の酵素とは異なる特徴を有すると期待されるが、分離菌株はいずれも多量に液体培養することが困難であり、分離株が生産する酵素の精製・解析には至っていない。そこで深海由来セルラーゼの特性を解明するために、深海セルラーゼ生産菌 GE09 株から、PCR を用いてセルラーゼ遺伝子のクローニングを行ない、セロビオハイドロラーゼと示唆される遺伝子配列を取得した。996 アミノ酸より構成される本酵素は、約 460 アミノ酸残基からなる GH6 の活性ドメインを有するが、その相同性は既知の酵素と比べ最大 40%程度しかなかった。また C 末端の約 250 アミノ酸残基は機能が全く未知であった。さらに大腸菌を用いて発現に成功した、N 末端に 6×His-SUMO tag を付加した組換え酵素とセルロースの反応産物中にセロビオースが確認され、クローニングしたセルラーゼのセロビオハイドロラーゼ活性を実際に確認した。

Cellulase, Cellulose Nanofiber, Deep Sea

講演番号:2B03p20
講演日時、会場:3月23日17:48～ B校舎03会場

新規に分離した糸状菌の分泌する稲わら特異的セルラーゼ

Rice straw specific cellulase from newly isolated filamentous fungi.

○青山　晃久、松浦　明、堤内　要、倉根　隆一郎、永井　和夫（中部大・応生）
○Akihisa Aoyama, Akira Matsuura, Kaname Tsutsumiuchi, Ryuichiro Kurane, Kazuo Nagai (CHUBU Univ.)

【目的】現在バイオエタノールなどの生産はトウモロコシや、サトウキビといった食料と競合する原料から作られている。しかしこれには食料価格上昇等の問題がある。代替原料としてセルロース系バイオマスが注目されている。セルロースはグルコースのポリマーであるためグルコースに分解することで発酵等に利用可能である。しかしながら非水溶性、結晶性などの性質から分解糖化が困難であり、利用は限定的である。そこで緩和な前処理で高い分解活性を持つ酵素を探索するため、粉砕処理のみを施した稲わらの分解活性を指標にスクリーニングを行った。

【方法】唯一炭素源として、粉砕稲わらを用いた培地で集積培養を行い、培養液上清の粉砕稲わら分解活性を調べた。分解活性の強いサンプルから菌を単離し、粉砕稲わら、アルカリ処理稲わらおよび各種セルラーゼの基質に対する活性を測定した。活性の強弱は市販酵素4社7種と比較した。

【結果】約800の土壌サンプルから集積培養を行った。最も高い活性が確認されたサンプルから糸状菌を分離した。この糸状菌の分泌する酵素(以下、A酵素)は稲わらを基質とした時の至的温度50℃、至的pH5.0、温度は50℃まで安定(30分処理)、pHは3-10の範囲で安定(30分処理)であった。A酵素は同タンパク量(Bradford法,BSA)で、比較した各種市販酵素に比べ粉砕稲わら対して分解速度、分解率共に優れていた。アルカリ処理稲わらに対しては、比較酵素よりも初期の分解速度が優れており、分解率は同等であった。

一方、Carboxymethyl cellulose, Avicel等の基質に対する活性は市販酵素よりかなり劣っていた。A酵素は人工基質よりもむしろ実際のバイオマスに対して高い活性を示したことより、稲わら等の草本系バイオマスからの次世代バイオエタノール生産に適する可能性がある。
さらに比較した市販酵素製剤の多くは複数種の菌株由来の酵素の混合物であり、単一菌株由来酵素では最も強い活性を有していると考えられる。

cellulase, rice straw, fungi

講演番号：2A04a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ A校舎04会場

ゴマリグナンsesamolin、saminの異性化に関する研究

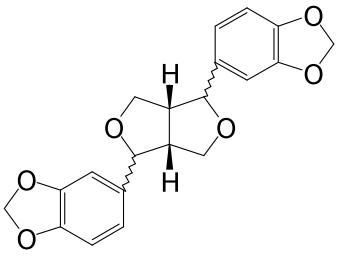
Studies on isomerization of sesamolin and samin

○山本 諭志[1]、松本 恵実[1]、渡邉 紀之[2]、舟橋 智[2]、柳瀬 笑子[2]、中塚 進一[1,2]（[1]長良サイエンス、[2]岐阜大・応生）

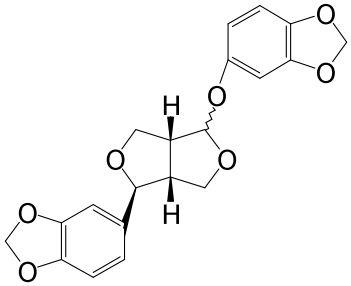
○Satoshi Yamamoto[1]、Emi Matsumoto[1]、Noriyuki Watanabe[2]、Satoshi Funahashi[2]、Emiko Yanase[2]、Shin-ichi Nakatsuka[1,2]（[1]Nagara Science、[2]Gifu-u.）

【目的】ゴマに含まれるリグナンの代表的なものにsesamin、episesaminがある。episesaminは、ゴマ油製造工程においてsesaminが異性化したものであることが確認されており、その活性の違いに興味がもたれている。本研究は、ゴマリグナン類の異性化における機構を考慮し、ゴマに含まれるリグナン類の一つであるsesamolinを中心に、その異性化および再合成を検討した。

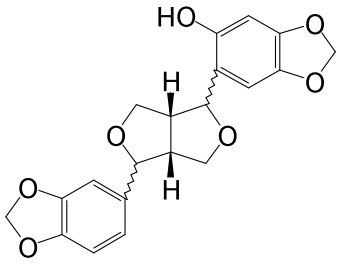
【結果】sesamolinは、酸によってsesaminolに変換されることが知られているが、これは分子内エーテル結合の切断によるものである。しかし、今回、同時に進行するsesaminと同様の立体反転を考慮して、samin、sesamolからのsesamolin形成反応を行った。その結果、sesamolinの生成と共にsesaminolとその異性体ができるに従って、sesamolin異性体、さらにはdisaminyletherが生成することを見出した。また、ゴマ油をオープンカラムやHPLCにて精製し、合成したsesamolin異性体とdisaminyletherを指標として探索したところ、極微量ではあるが、ゴマ油中にも存在することが判明した。



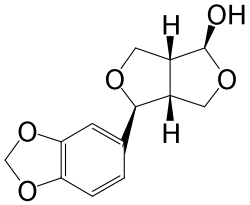
sesamin
episesamin
diasesamin



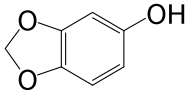
sesamolin
episesamolin



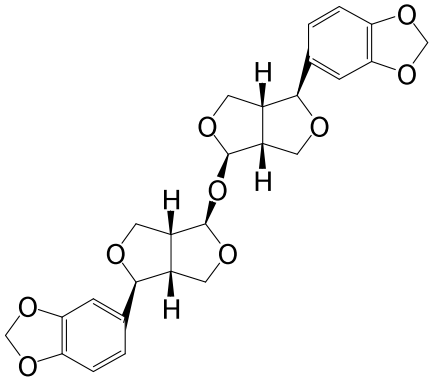
sesaminol
2-episesaminol
6-episesaminol
diasesaminol



samin



sesamol



disaminyl ether

Sesamin, Sesamolin, Lignan

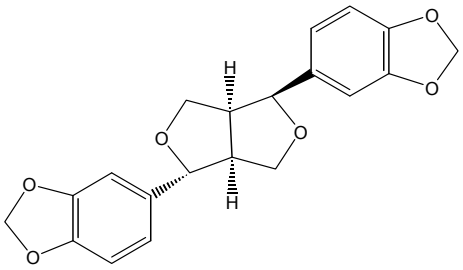
講演番号：2A04a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ A校舎04会場

細辛リグナンSesaminの立体異性体に関する研究

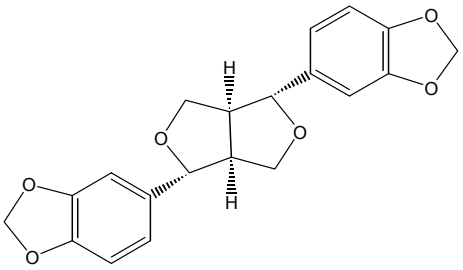
Studies on stereochemistry of Sesamin in *Asiasarum Sieboldii*

○松本 恵実、牧岡 富広、山本 諭志、中塚 進一（長良サイエンス）
○Emi Matsumoto, Tomihiro Makioka, Satoshi Yamamoto, Shin-ichi Nakatsuka (Nagara Science)

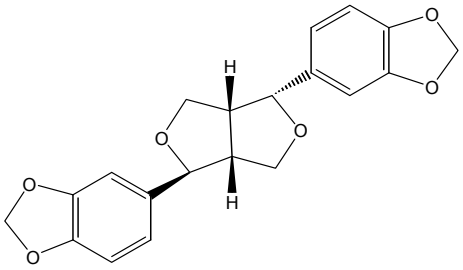
【目的】細辛は日本薬局方に収載されている生薬で、主成分としてAsarinin[Episesamin]、Sesamin等のリグナン類が知られている。Asarinin及びSesaminの立体は(-)-体と報告されている。一方、胡麻や胡麻油の主成分として知られているSesamin及びEpisesaminは(+)-体と報告されている。植物種により光学異性体や立体異性体が単一あるいは混在していることが報告されており、共存する理由や生理活性との関係など大変興味深い。
そこで細辛リグナンの立体異性体の詳細について調べた。
【方法】細辛を抽出、精製し、Asarinin[Episesamin]及びSesaminを得た。
また胡麻由来原料を精製、あるいは合成法によりSesamin及びEpisesaminを得た。
得られたリグナンを用いてHPLCキラルカラムによる分析条件を確立し、本条件で細辛リグナンを分析して立体異性体の詳細について調べた。
【結果】細辛由来リグナンをHPLCキラルカラムで分析することによりAsarininは(-)-体のみであり、Sesaminは(-)-体：(+)-体＝20:1で混在することが分かった。
細辛由来Sesaminを光学分割し(-)-Sesamin及び(+)-Sesaminをそれぞれ99%ee以上の純度で得た。



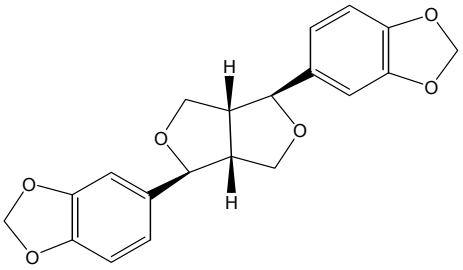
(-)-Asarinin [(-)-Episesamin]



(-)-Sesamin



(+)-Episesamin



(+)-Sesamin

Sesamin, Asarinin, stereochemistry

講演番号：2A04a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ A校舎04会場

円石藻*Pleurochrysis carterae*のココリスに含まれる基質タンパク質に関する研究

Molecular analysis of coccolith matrix proteins

○遠藤博寿、笠島大貴、藤原祥子[1]、都筑幹夫[1]、猿渡和子[2]、小暮敏博[2]、長澤寛道（東大院・農生化・応生化、[1]東薬大・生科、[2]東大院・理）

○Hirotoshi Endo, Hiroki Kasajima, Shoko Fujiwara[1], Mikio Tsuzuki[1], Kazuko Saruwatari[2], Toshihiro Kogure[2], Hiromichi Nagasawa (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, [1]School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, [2]Graduate School of Science, The University of Tokyo)

【目的】骨や貝殻などの石灰化した硬組織には、無機カルシウム塩の他に、結晶形成を制御する微量の有機物、特にタンパク質が含まれている。海洋性単細胞藻類の円石藻*Pleurochrysis carterae*は、炭酸カルシウムでできたココリス(coccolith)と呼ばれる微細構造物でその細胞の表面を覆っている。以前、我々はこのココリスからCoccolith Scale Associated Protein-1 (CSAP-1)と名付けたタンパク質を同定した。そこで、本研究では、ココリスに含まれるCSAP-1以外のタンパク質の探索とその発現解析を行うことを目的とした。

【方法】EDTAを用いてココリスを脱灰して有機基板を単離した後、SDSおよびDTT(dithiothreitol)で処理することにより、CSAP-1を抽出した。次に、処理後の基板をtrypsinで消化し、上清を逆相HPLCに供し、得られた2種類の部分断片のアミノ酸配列を決定した。得られた配列を*Pleurochrysis haptonemofera*のEST databaseに対してBLAST検索を行ったところ、これらの配列は、2つとも*ConC12*と名付けられたcontigにコードされるアミノ酸配列と高い相同性を示した。なお、マイクロアレイ解析により、この*ConC12*はココリス形成を盛んに行っている細胞で顕著に発現している遺伝子であるため、ココリス形成への関与が期待された。そこで、この*ConC12*の*P. carterae*におけるホモログを*CSAP-2*と名付け、*P. haptonemofera*の塩基配列をもとにcDNAのクローニングを行い、全長を取得した。さらに、円石藻のプロトプラストを調製し、再石灰化の過程における*CSAP-2*の発現解析を行った。現在は、プロトプラストに*CSAP-2*のdsRNAを導入することにより、発現の抑制を行い、ココリス形成における影響を調べている。

【結果】cDNAクローニングの結果得られた遺伝子*CSAP-2*は、N末に16残基のシグナルペプチドを含む、728残基からなるタンパク質をコードしており、シグナルペプチドを除いた分子量および等電点は、それぞれ約76,000、4.33という値だった。また、同タンパク質は中央部分に比較的Cysに富む領域を有していたが、既知のドメインと類似する領域は見出せなかった。発現解析の結果、*CSAP-2*は、プロトプラストにおいて盛んにココリス形成が見られる時期に特に発現が上昇していた。さらに、dsRNAをプロトプラスト内に導入することにより、最大で約40%の発現抑制が確認された。

biomineralization, coccolith, *Pleurochrysis*

講演番号：2A04a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ A校舎04会場

ソロモン諸島産プロポリスに関する化学的研究

Chemical studies on propolis collected in Solomon Islands

○乾 沙王里 、島村 裕子[1]、増田 修一[1]、白藤 謙一[2]、Reuben T Moli [3]、熊澤 茂則[1]
([1]静岡県大 食品栄養、[2]特定非営利活動法人 APSD、[3] NPO APSD SOLOMON)
○Saori Inui,[1] Kenichi Shirafuji,[2] Reuben T Moli,[3] Shigenori Kumazawa[1,]

【目的】プロポリスとは、ミツバチが周辺の植物から採取した樹脂状物質を巣に蓄えたもので、その採取場所によって起源植物はさまざまである。従来の研究では、ポプラ由来やバッカリス由来のプロポリスがよく知られているが、近年では、起源植物の不明なプロポリスも多く見出されている。

我々は、数年前に沖縄産プロポリスの成分分析および機能性評価を行い、多数の生理活性を評価してきた。また、沖縄産プロポリスの起源植物をトウダイグサ科の植物オオバギ(*Macaranga tanarius*)であると同定した。今回、ソロモン諸島産プロポリスを入手したため、このプロポリスの成分分析と生理活性評価を行うことを目的とした。

【方法】ソロモン諸島のマライタ島で採取されたプロポリスの原塊 49.5 g をエタノールで抽出し、34.8 g の抽出物を得た。エタノール抽出物について HPLC 分析を行うとともに、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで粗分画し、24 個の分画物を得た。その分画物の 1 つより、分取 HPLC を用いて、5 つの成分を単離した。これらの成分を、MS、NMR、CD 等の各種分析機器を用いて構造解析を行った。また、その抗酸化および抗菌活性を評価した。

【結果】ソロモン諸島産プロポリスを、HPLC 分析したところ、沖縄産プロポリスとピークパターンが似ていた。このことより、ソロモン諸島産プロポリスの起源植物は、沖縄産プロポリスと同様 *Macaranga* 属の植物であると推定された。今回、ソロモン諸島産プロポリスの抽出物から、bonannione A、sophoraflavanone A、(2*S*)-5,7-dihydroxy-4′-methoxy-8-prenylflavanone、propolin I の 4 つの既知化合物と、1 つの新規プレニルフラボノイド化合物を単離、同定した。なお、sophoraflavanone A は今回、プロポリスから初めて同定された化合物であった。また、ソロモン諸島産プロポリスは、沖縄産プロポリスと同等の抗酸化および *Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas aeruginosa* に対する抗菌活性を示した。

propolis, Solomon Islands, prenylflavonoid

講演番号：2A04a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ A校舎04会場

ベチバー，スターアニス及びミルラの抽出物の性質

Properties of the extracts of vetiver, star anise and myrrh

○緑川　直弥，長谷川　登志夫，清宮　はるな[1]，松永　祐[1]，山田　英夫[2]（埼玉大院・理工，[1]埼玉大・理，[2]山田松香木店）

○ Naoya Midorikawa, Toshio Hasegawa, Haruna Seimiya[1], Tasuku Matsunaga[1], Hideo Yamada[2](Saitamadaiin, [1]Saitamadai, [2]Yamadamatsukobokuten)

【目的】我々は，異なる抽出法によって得られた抽出物の香気と含有成分の比較によって，これまで明確になっていなかった白檀，パチュリなどの香気素材の香気特性を明らかにしてきた。例えば，白檀の室温ヘキサン抽出物と水蒸気蒸留物の香気と成分の比較から，白檀の新規香気成分であるギ酸エステル体が白檀香気にとって重要な成分であることを見出した。本研究では，代表的香材であるベチバー，スターアニス及びミルラの香気特性にとって重要な成分をつきとめるため，これら素材より得られた各種抽出物の性質について検討した。

【結果】〈素材に対する各抽出物の香気類似性〉ベチバー，スターアニス及びミルラより，室温ヘキサン抽出と水蒸気蒸留によって香気成分の抽出を行った。得られた抽出物の香気評価の結果，各香材に共通してヘキサン抽出物は水蒸気蒸留物より素材との香気類似性が高いことが認められた。また，MMSE法によるヘッドスペース香気の抽出も行ったところ，得られた抽出物の香気はスターアニス及びミルラではヘキサン抽出物や水蒸気蒸留物よりも素材に類似していた。

〈抽出物の重要香気成分〉NMR及びGC分析により各香材の抽出物の成分を検討した結果，ベチバーの香気はkhusimolをベースにいくつかのアルデヒド体によって形成されていることが推定された。スターアニスではいずれの抽出物にもanetholeとanisaldehydeが主成分として含有し，素材に対する香気類似性が高くなるにつれ，anisaldehydeに対するanetholeの比率が高くなることが認められた。この両成分はいずれも強い香気を有していることから，この2つの成分がスターアニスの香気形成において重要な役割を果たしていると考えられる。ミルラにおいては，その抽出物は多数の成分の混合物であったため，重要香気成分の特定には至っていない。

〈抽出物の熱安定性〉多くの精油は室温で保存すると香りが変化していくため，冷蔵保存されている場合が多い。これは，精油の成分が経時変化するためと考えられる。そこで，各素材の抽出物の熱に対する安定性について検討した。ベチバーにおいては，室温ヘキサン抽出物と水蒸気蒸留物では，主要成分がkhusimolとそのカルボン酸誘導体であるという点で類似していた。しかし，水蒸気蒸留物ではその他に多数の微量成分が観測された。この傾向は，パチュリと同じであり，これら抽出物が熱による成分変化を起こすことを示唆している。スターアニスにおいては，両抽出物間に含有率の違いはあるもののその組成に大きな違いはみられず，白檀にも同じ傾向がみられた。これらの系での抽出物は，比較的熱に対して安定であると言える。ミルラにおいては，ヘキサン抽出物が室温においてさえも保存中数カ月で明確な変化を示した。この特徴は，同じ樹脂系の香材である乳香と類似の性質であった。

Vetiver, Star anise, Myrrh

講演番号：2A04a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ A校舎04会場

黄色タマネギ乾燥外皮由来の新規キサンチリウム色素の単離および構造決定

Isolation and structure elucidation of a new xanthylium pigment from the dried outer scales of yellow onion

○坂本 祐実[1,2]、伊藤 裕才[1]、佐野 明[2]、山崎 壮[1]、穐山 浩[1]（[1]国立医薬品食品衛生研、[2]東理大院・薬）
○Yumi Sakamoto[1,2], Yusai Ito[1], Akira Sano[2], Takeshi Yamazaki[1], Hiroshi Akiyama[1] ([1]NIHS, [2]Tokyo University of Science)

【目的】黄色タマネギの乾燥した鱗茎（外皮）から得られる黄色色素は、水溶性が高く熱や光に安定であることから、食品の着色料または衣服の染料として使用されている。色素は複数の成分からなる集合体で単離精製が難しいことから、化学構造は長い間不明であった。近年演者らのグループによって、乾燥外皮の抽出液から低分子量の色素 cepaic acid (**1**) が単離され、その構造は 9-carboxy-1,3,6,8-tetrahydroxyxanthylium と決定された。この結果は、外皮の黄色色素が鱗茎内に多量に含まれる quercetin から乾燥時の酸化によって形成される xanthylium 化合物であることを強く示唆した。**1** は 430nm に極大吸収波長をもつが、色素全体の極大吸収は 450nm 付近であるため、より長波長域に極大吸収をもつ色素成分が存在するのは明らかである。そこで本研究では色素の全容を解明すべく、タマネギの乾燥外皮から新たな色素の探索を試みた。
【方法】黄色タマネギの乾燥外皮 100g を粉砕し、水溶液 2L 中で 3 時間撹拌を行い、色素を抽出した。C_{18} カラムによる LC/ESI-MS で抽出液を分析した結果、**1** よりも低極性側に溶出するブロードピーク中に、新規色素 (**2**) のピークが観測された。抽出液に塩酸を加えて酸性にした後、酢酸エチルを加えて 2 層分配を行い、**2** を含む色素を有機層に抽出した。得られた色素画分を OPC シリカゲルクロマトグラフィーに負荷し、色素を酢酸エチル/メタノール混合溶媒で溶出させた後、COSMOSIL Cholester カラムを用いた分取 HPLC で **2** の粗精製を行った。続いて COSMOSIL PBB-R カラムで最終精製を行い、**2** を赤橙色粉末として 1.0 mg 単離した。得られた **2** について ESI-MS 分析および DMSO-d_6/TFA を溶媒とした NMR スペクトル分析を行った。
【結果】新規色素(**2**)の紫外可視吸収スペクトルは **1** と相似していたものの、極大吸収波長は 485nm と長波長側に大きくシフトしていた。また、**2** を 3N 塩酸中で 30 分加熱した結果、**1** に変換されたことから、**2** は **1** の類縁体であることが示された。さらに興味深いことに、**1** のカルボン酸をメチルエステル化するためには塩酸メタノール中で 6 時間加熱する必要があるが、**2** は室温下で容易にエステル化されることが観測された。この結果は **2** の分子内にもう 1 つカルボン酸が存在することを示唆した。ESI-MS 分析の結果、正イオンモードで *m/z* 361、負イオンモードで *m/z* 359 に分子関連イオンピークを得たことから、**2** の分子量は 361 (M^+)と判断された。^{1}H NMR スペクトル分析の結果、メタカップリングを示す 2 つの doublet シグナルおよび 1 つの singlet のシグナルのみが観測された。^{13}C-NMR および各種 ^{1}H-^{13}C 2 次元 NMR 分析の結果、**2** は **1** に α-ケトカルボン酸が置換したキサンチリウム化合物であることが示された。

onion, pigment, cepaic acid

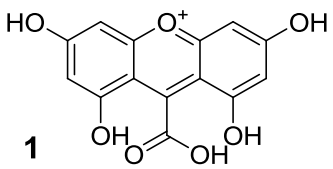
講演番号：2A04a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ A校舎04会場

黄色タマネギ乾燥外皮の黄色色素の形成における酸化過程の必須性

The formation of yellow pigments by oxidation in the dried outer scales of yellow onion

○伊藤 裕才[1]、坂本 祐実[1,2]、山崎 壮[1]、穐山 浩[1]（[1]国立医薬品食品衛生研、[2]東理大院・薬）
○Yusai Ito[1], Yumi Sakamoto[1,2], Takeshi Yamazaki[1], Hiroshi Akiyama[1] ([1]NIHS, [2]Tokyo University of Science)

【目的】黄色タマネギの乾燥した鱗茎（外皮）から得られる黄色色素は、混合成分であることから単離精製が難しく、化学構造は長い間不明であった。近年、演者らによって外皮の抽出液から低分子量の色素 cepaic acid (**1**, 9-carboxy-1,3,6,8-tetrahydroxyxanthylium)が単離・構造決定された。**1** は、鱗茎内に多量に含まれる quercetin から酸化分解で生成した phloroglucinol が、glyoxylic acid への求核反応で架橋された後、脱水および酸化によって形成されると推定された。実際に水溶液中で phloroglucinol と glyoxylic acid を混合すると、**1** を含む黄色の色素が生成することが観察されている。今回、我々は phloroglucinol と glyoxylic acid の反応物中から **1** の中間体を単離・構造決定し、中間体から **1** へ変換する過程で酸化が必須であることを確認した。また、抽出液における色素形成においても酸化が必須であることを見出したので報告したい。



1

【方法】Phloroglucinol と glyoxylic acid を 10:1 の割合で混合し、水中で撹拌して得られた混合液を逆相 LC/ESI-MS で分析した。確認された **1** およびその中間体と考えられる物質を、C_{18} カラムによる分取 HPLC によって単離精製し、中間体については ESI-MS および NMR スペクトル分析を用いて構造決定を行った。黄色タマネギの乾燥外皮 1g を粉砕し、25mM リン酸緩衝液(pH7.5)100mL 中で撹拌を行い色素の抽出を行った。抽出液中の色素量の変化を、30 分後から 16 時間後まで継時的に紫外可視吸収スペクトルを測定することで追跡した。また別に抽出液中に ascorbic acid を添加し、色素量の変化について観察した。

【結果】Phloroglucinol と glyoxylic acid の反応物を逆相 LC/ESI-MS によって分析した結果、**1** よりやや極性が低い位置に、**1** の中間体と考えられるピークを観測した。ESI-MS 分析の結果、正イオンモードで *m/z* 291、負イオンモードで *m/z* 289 に分子関連イオンピークを得たことから、中間体の分子量は 290 と判断された。この中間体を単離精製し、^{1}H-NMR スペクトル分析した結果、メタカップリングを示す 4 つの doublet シグナルおよび 1 つの singlet シグナルを観測した。^{13}C-NMR および各種 ^{1}H-^{13}C 2 次元 NMR 分析の結果、中間体は glyoxylic acid で架橋された 2 分子の phloroglucinol が分子内で脱水し、ラクトン構造を形成したものであることが判明した。精製した中間体は中性の水溶液中で **1** へと変化することが観測され、過酸化水素水の添加でさらに迅速に変化し、またその変化は ascorbic acid の添加で完全に抑制された。色素の抽出液については、外皮を完全に除去したにも関わらず、液中の色素量が継時的に増加することが観察された。これは抽出液中に色素の中間体が存在することを示すものであった。抽出液中での色素形成も ascorbic acid の添加で完全に抑制された。これらのことから乾燥外皮中における色素形成には酸化が必須であることが判明した。

onion, pigment, cepaic acid

講演番号：2A04a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ A校舎04会場

根寄生雑草*Striga gesnerioides*種子発芽誘導物質alectrolの単離と構造決定

Isolation and structure determination of alectrol, germination stimulants for *Striga gesnerioides*

○野村　早紀[1]、上野　琴巳[1]、村中　聡[3]、水谷　正治[1]、滝川　浩郷[1, 2]、杉本　幸裕[1, 2]（[1]神戸大院・農、[2]JST/JICA, SATREPS、[3]国際熱帯農業研究所）

○Saki Nomura[1], Kotomi Ueno[1], Satoru Muranaka[3], Masaharu Mizutani[1], Hirosato Takikawa[1, 2], Yukihiro Sugimoto[1, 2] ([1]Grad. School Agric. Sci., Kobe Univ., [2]JST/JICA, SATREPS, [3]IITA)

【目的】ストライガやオロバンキなどの根寄生雑草種子はストライゴラクトンと総称される発芽刺激物質に応答して発芽する。*Striga gesnerioides* はササゲ(*Vigna unguiculata*)の根から分泌されるストライゴラクトンalectrolに特異的に応答する。Alectrolの構造は確定しておらず、近年、アカクローバー(*Trifolium pretense*)の根滲出液に含まれる(+)-orobanchyl acetateと同定されている化合物と同一であると報告された。しかしながら、(+)-orobanchyl acetate標品には*S. gesnerioides*種子に対する発芽誘導活性が認められなかった。そこで本研究では、*S. gesneriodies*に対する発芽刺激活性を指標にしてササゲの根が分泌する発芽刺激物質を単離し、構造を決定した。またアカクローバーの根浸出液に含まれる発芽刺激物質についても構造を再検討した。

【方法】ササゲを低リン酸条件下で水耕栽培し、水耕第1週目から第8週目までの根滲出物を活性炭に吸着させ回収した。これをアセトンで溶出し、アセトンを留去後、酢酸エチルで残渣からストライゴラクトンを抽出した。抽出物をシリカゲルクロマトグラフィーに供し分画した。溶出液の組成をヘキサン100%から酢酸エチル100%へ10%毎に段階的に変化させた。*S. gesnerioides* 種子に対する発芽刺激活性が認められた画分について、さらにキラルカラムクロマトグラフィーによって精製を進めた。得られた化合物を各種機器分析に供し、構造を解析した。

【結果】シリカゲルクロマトグラフィーによって、酢酸エチルの混合比が50%及び70%で溶出された画分に*S. gesnerioides*種子に対する顕著な発芽刺激活性が認められた。これらの画分をさらに精製し、MSスペクトル、^{1}HNMRスペクトルおよびHPLCの挙動が、それぞれ2'-*epi*-orobancholおよび2'-*epi*-orobanchyl acetate標品と一致する活性化合物を単離した。CDスペクトルからそれぞれは標品の鏡像体であることが判明した。これらの結果より、ササゲの根滲出物に含まれる*S. gesnerioides* 種子に対する発芽刺激物質は*ent*-2'-*epi*-orobancholと*ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetateであると決定した。また、同様の方法で抽出・精製したアカクローバーの根浸出物に含まれるストライゴラクトンもこれらと同一であることを確認した。報告されているalectrolの物性と比較した結果、最初に推定構造が提出されて以来20年を経て、alectrolは*ent*-2'-*epi*-orobanchyl acetateであると結論づけた。

Keyword1 strigolactone, Keyword2 structure determination, Keyword3 alectrol

講演番号：2A04a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ A校舎04会場

エンバクが生産する新規ストリゴラクトンの探索

Investigation of novel strigolactones produced by *Avena strigosa*

○謝　肖男、米山　香織、高根沢　恵子、野村　卓史、来生　貴也、金　賢一、Pichit Khetkam、内田　健一[1]、横田　孝雄[1]、野村　崇人、米山　弘一（宇都宮大・雑草センター、[1]帝京大・バイオ）

○Xiaonan Xie, Kaori Yoneyama, Keiko Takanezawa, Takashi Nomura, Takaya Kisugi, Hyun Il Kim, Pichit Khetkam, Kenichi Uchida[1], Takao Yokota[1], Takahito Nomura, Koichi Yoneyama (Weed Science Center, Utsunomiya Univ., [1]Deparment of Biosciences, Teikyou Univ.)

【目的】ストリゴラクトン（SL）は、ストライガやオロバンキなどの根寄生雑草およびアーバスキュラー菌根菌の宿主認識シグナルとしての機能を持つ植物の二次代謝産物で、さらに植物の体内では「枝分れ」を制御する新しい植物ホルモンである。エンバクは世界中で生産されている稲科作物であるが、西ヨーロッパやブラジルで飼料作物・緑肥として栽培されているエンバクの一種のセイヨウチャヒキ（*Avena strigosa*）は、そのアレロパシー作用から、土壌病害虫の防除資材として利用価値が高い。本研究ではエンバク（セイヨウチャヒキ）が生産するストリゴラクトンの探索および新規ストリゴラクトンの構造解析を試みた。

【方法】表面殺菌したエンバク種子（*Avena strigosa* cv. Hay-oats）500粒をバーミキュライトで7日間栽培した後、水道水を用いて水耕栽培した。水耕液に含まれる根の分泌物を活性炭に吸着させた後、アセトンで溶出し、アセトンを減圧濃縮後、残渣を酢酸エチルで抽出して酢酸エチル可溶中性区（NE区）を得た。NE区をRP-HPLCで分取し、各フラクションについてヤセウツボ（*Orobanche minor*）種子に対する発芽刺激活性を調査した。また、LC-MS/MSを用いて既知ストリゴラクトンの同定を行った。さらに、ヤセウツボ種子に対する発芽刺激活性を指標にして、NE区をシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよびRP-HPLCで精製・単離した。単離したサンプルは、種々の機器分析によって構造解析を行った。

【結果】LC-MS/MS分析では既知SLが検出されなかったが、NE区をODS-HPLCにより分画してヤセウツボ種子に対する発芽刺激活性が認められたフラクションをGC-MSで分析したところ、フラグメントイオンの解列パターンから、少なくとも５種類の新規ストリゴラクトンの存在が示唆された。現在、これら新規SLをさらに精製し、NMRなどの機器分析によって構造解析を行っている。

Strigolactone, Plant hormone, Avena strigosa

講演番号：2A04a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ A校舎04会場

植物寄生性線虫の生産するCLEペプチド

Studies on CLE Peptide derived from Plant-Parasitic Nematode

○開出 智美、永井 あゆみ、得字 圭彦[1]、近藤 竜彦、坂神 洋次（名大院生命農・応用分子生命科、帯広畜産大学[1]）

○Tomomi Kaide, Ayumi Nagai, Yoshihiko Tokuji[1], Tatsuhiko Kondo, Yoji Sakagami (Grad. Sch. of Bioagricultural Sciences Nagoya Univ., Obihiro Univ. of Agr. & Veterinary Medicine[1])

【目的】 植物寄生性線虫は農業上非常に重要な問題となっている。植物寄生性線虫に寄生された作物は生育不良を起こし収量が低下する。そのため様々な防除法が開発されているが、決定的な防除法とはなっていない。植物寄生性線虫の宿主・寄生者関係に関する新たな知見は、植物寄生性線虫の防除法に、新たな選択肢をもたらすことが期待される。

植物寄生性線虫であるネコブセンチュウとダイズシストセンチュウは感染の際に、宿主となる植物に分泌液を注入する。この分泌液の働きにより、ネコブセンチュウは核内倍加した巨大細胞、ダイズシストセンチュウは多核細胞の形成を誘導し、その細胞から養分を得る。近年、植物以外の生物で初めて植物寄生性線虫であるネコブセンチュウとダイズシストセンチュウから*CLE*遺伝子（*16D10*、*HgCLE1*、*HgCLE2*）が発見された。シロイヌナズナの*CLE*遺伝子である*CLAVATA3*遺伝子は茎長分裂組織における幹細胞の分化と脱分化の制御に関与している遺伝子であり、*CLE*遺伝子は細胞の分化において重要な役割を果たしている。線虫の*CLE*遺伝子は宿主に感染する際に食道腺で発現する遺伝子であり、植物における特殊細胞の形成にこの遺伝子が重要な役割を果たしていると考えられている。

植物において*CLE*遺伝子の産物はプロセシングを受けて十数残基のペプチドホルモンとして機能することが明らかになってきている。一方で線虫の*CLE*遺伝子がどのようにプロセシングや翻訳後修飾を受けてCLEペプチドとなるかは不明である。本研究は、線虫の*CLE*遺伝子（*16D10*、*HgCLE1*、*HgCLE2*）に由来するCLEペプチドの化学的本体とその役割を明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】シロイヌナズナに線虫の*CLE*遺伝子を過剰発現させ、過剰発現株が生産するCLEペプチドの同定を試みた。得られた過剰発現株をカルス化し、ノザンブロッティングを用いて線虫の*CLE*遺伝子の発現を確認した。過剰発現株のカルスが生産するペプチドを解析するため、*CLE*遺伝子が強く発現していた*HgCLE2*過剰発現株のカルスを液体培養した。液体培養上清よりペプチドを精製し、MALDI-TOF-MS、MS/MSによりペプチドの解析を行った。その結果、線虫の*CLE*遺伝子（*HgCLE2*）に由来する翻訳後修飾を受けたペプチドを同定した。得られたペプチドをダイズの根にインジェクションし、線虫の*CLE*遺伝子（*HgCLE2*）に由来するCLEペプチドの生理活性を検討した結果についても合わせて発表する予定である。

plant-parasitic nematode, CLE, peptide

講演番号：2A04a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ A校舎04会場

タバココナジラミに抵抗性を有するトマト近縁野生種の探索とその要因の解明

Screening and clarification of the mechanisms of resistant *Solanum* plants related tomato to *Bemisia tabaci*

○北村登史雄[1,2]、武田光能[1]、中島修平[2]（[1]農研機構・野菜茶研、[2]岡山大院・自科）
○Toshio Kitamura, Mitsuyoshi Takeda, Shuhei Nakajima (NARO, Okayama Univ.)

【目的】タバココナジラミ*Bemisia tabaci* は多くの作物における世界的な重要害虫であり、寄主範囲などの生態的特性の異なる多くのバイオタイプを持つ。トマトではトマト黄化葉巻病を媒介するため、要防除水準が非常低く、また、特にバイオタイプQは多くの殺虫剤に対し抵抗性が高度に発達しているため、その防除は非常に困難である。圃場では物理的防除を中心に行っているが、新たな防除法として抵抗性品種の開発が期待されている。これまでに抵抗性品種育成のための育種素材の探索は主にバイオタイプＢを用いて行われており、バイオタイプQに対する知見はほとんどない。このため、トマト近縁野生種20系統に対するバイオタイプQの寄生性を調査し、得られた抵抗性系統について抵抗性機構の解明を行った。
【方法】トマト近縁野生種に対するバイオタイプQ抵抗性系統の探索は本葉5枚程度の脇芽にバイオタイプQ20頭を接種し、72時間後の植物上の寄生数及び産卵数を指標に行った。また、得られた抵抗性系統に対し、トマト黄化葉巻病原因ウイルスを保毒したバイオタイプQを接種しその媒介阻止能を調査した。抵抗性機構の解明は試料溶液を薄くのばしたパラフィルムではさみ、これを摂食したバイオタイプQの死亡率を指標に行った。
【結果】トマト近縁野生種20系統に対するバイオタイプQの寄生性を調査した結果、*S. habrochaites*　2系統、*S. pennellii*　1系統に寄生及び産卵が認められなかった。しかし、これら植物に保毒虫を接種したところ、全ての系統でウイルスの感染が確認された。このため、バイオタイプQは吸汁後、死亡したことが推測された。このため、バイオタイプQは吸汁した後に離脱もしくは死亡したと考えられる。抵抗性を示した*S. pennellii*のメタノール抽出物をバイオタイプQに摂食させたところ、48時間以内に全ての個体が死亡した。*S. pennellii*のメタノール抽出物をフラッシュクロマトグラフィで分画し、バイオタイプQの死亡率を指標としてタバココナジラミに対する抵抗性要因物質について単離を行い、その構造を解析した。

Solanum, Bemisia tabaci, resistance

講演番号：2A04a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ A校舎04会場

ハッサクの傷害葉に含まれる二次代謝物質の単離と同定

Isolation and characterization of secondary metabolites in wounded *Citrus hassaku* leaves

○浅井　智紀[1]、松川　哲也[1]、石原　亨[2]、梶山　慎一郎[1]（[1]近畿大院生物理工・生物工、[2]鳥取大農・生資環）

○Tomonori Asai[1], Tetsuya Mtsukawa[1], Atsushi Ishihara[2], Shin’ichiro Kajiyama[1](1 Div. Biotechnol. Sci., Grad. Sch. Biol. -oriented Sci. and Technol., Kinki Univ. 2 Sch. Biores. Bioenviron. Sci., Tottori Univ.)

【目的】カンキツ類は果樹として世界的に栽培される商業的価値の高い植物の一つであり、生産性向上のための防御物質に関する研究が行われている。カンキツ類における防御物質の研究は外来種を対象としたものが多く、収穫後の果実への傷害や病原菌の感染により誘導される物質が単離されている。スコパロンやスコポレチンなどのクマリン類はレモンやグレープフルーツの果皮において誘導され、カンキツに感染する病原菌において抗菌活性を示すことが知られている。しかし、葉や樹木などの果実以外の部位において誘導される防御物質や、日本在来種のカンキツ類から単離された防御物質に関する報告は少ない。そのため、本研究では日本在来種であるハッサクを対象とし、傷害を受けた葉において誘導される物質の検出および同定を試みた。

【方法と結果】5 mm 角に切断したハッサク葉を蒸留水に浸して 72 時間静置し、傷害処理葉とした。対照として、切断せずに傷害処理葉と同様の条件で 72 時間静置した葉を用いた。得られた植物材料に葉の新鮮重の 10 倍量のメタノールを加えて抽出し、遠心分離により得られた上清を粗抽出液として HPLC 分析に供した。その結果、傷害処理葉では未処理葉に見られないピークが認められたため、粗抽出液を順相オープンカラムクロマトグラフィーにより 20 画分に分画した。分画した画分の内、誘導ピークを含む画分を逆相分取 HPLC に供して化合物を単一のピークになるまで精製した。精製された 2 種の化合物の内、1 つはカンキツ類に特徴的な二次代謝物質として知られる hesperetin であり、もう 1 つは citrusnin-A の対称 2 量体構造をもつ新規の物質であることが明らかとなった。現在、新規物質の詳細な立体化学構造の解析を進めており、その結果も合わせて報告する。

Citrus hassaku, wound, isolation

講演番号:2A04a13
講演日時、会場:3月23日11:32～ A校舎04会場

野菜ジュースからの植物疫病菌の無性生殖促進物質

Promoters of *Phytophthora* asexual reproduction from a vegetable juice

○岩井 里佳、Sudhakar V. S. Govindam、小鹿 一（名大・農、名大院・生命農）
○Rika Iwai, Sudhakar V. S. Govindam, Makoto Ojika (School of Agriculture・Nagoya Univ., Graduate school of Bioagricultural Sci., Nagoya Univ.)

【目的】植物疫病菌（*Phytophthora*）は、植物、特に農作物に感染して、甚大な被害を与える。植物疫病菌は無性生殖と有性生殖の両方で繁殖できるが、通常は無性生殖を営んでおり、条件が整うと遊走子嚢と呼ばれる無性生殖器を形成し増殖する。遊走子嚢は移動性の遊走子を多数放出することにより宿主へ感染し、植物の葉や果実に病状を引き起こす。このため、遊走子を生成する無性生殖の制御は農作物の防衛にとって重要である。

V8野菜ジュースは植物疫病菌を培養する際、培地として一般的に使用されているが、最近、無性生殖による遊走子嚢形成の促進作用があることが明らかとなっていた。本研究では活性検定法の確立と制御物質の単離・同定を行うことを目的としている。

【方法・結果】活性検定法を確立するため、複数の菌株、培養条件の検討を行った。まず、遊走子を効率よく形成する菌株として *P. capsici* NBRC 30696を検定菌として選定した。サンプルはDMSO、界面活性剤によりPS培地中に拡散させ寒天プレートを作成し、疫病菌を植菌し、６日間培養を行い、顕微鏡下、遊走子嚢数を計測した。

Ｖ８野菜ジュースにエタノール（同体積）を加え70℃で抽出後、濾過濃縮した。残った水溶液を酢酸エチル抽出した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離した。活性画分をHPLCを用いて分離し、活性物質を純粋に得た（収率 2.57 mg/l)。単離された化合物の構造をNMRにより解析中である。数種類の類縁体も得られたので、それらの構造と活性にういても報告する。

Phytophthora, asexual reproduction, zoosporangia

講演番号:2A04a14
講演日時、会場:3月23日11:43～ A校舎04会場

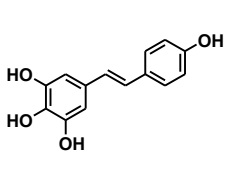
ミャンマー　産薬用植物からの　抗トリパノソーマ化合物の単離精製とその構造

Isolation of Antitrypanosomal Compounds from Myanmar Medicinal Plant

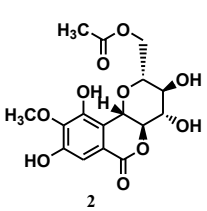
○KHINESWE NYUNT、Elkhateeb Ahmed、土佐 祐輔[1]、鍋田 憲助、片倉 賢[1]、松浦 英幸
(北大院農、[1]北大院獣医)

○NYUNT KHINESWE, Ahmed Elkhateeb, Yusuke Tosa, Kensuke Nabeta, Ken Katakura, Hideyuki Matsuura
(Hokkaido Univ)

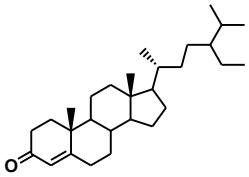
The animal pathogenic protozoan, *Trypanosoma evansi* leads to a wasting disease in cattle, camels and equines, commonly known as surra. It is widely distributed geographically with a wide range of mammalian hosts and causes great economical loss. As a result, there is the search for new and novel sources of antitrypanosomal drugs, for example medicinal plants. *Vitis repens* (Family- Vitaceae) is locally used in the treatment of sore, carbuncles, ulcers hepatitis and tumors. It is widely distributed in Shan state and eastern hills of Myanmar. The crude extract of *V. repens* showed antitrypanosomal activity [1]. The aim of the present research is to identify the antitrypanosomal compounds from *V. repens*. The dried rhizome of *V. repens* (1.2 kg) were pulverized and extracted with ethanol, and the extract was concentrated to dryness *in vacuo*, and the residue was partitioned between n-hexane, ethyl acetate and water(1L, each), successively. Bioactivity-guided fractionations of the ethyl acetate fraction of *V. repens* were chromatographed on silica gel column and yield 5 fractions. Compounds **1** and **2** were isolated from fraction 3 by using the Silica gel, Sephadex LH-20 and HPLC. Compound **3** was purified from fraction 1 by Sephadex LH-20 column and subjected to preparative TLC over Silica gel. The chemical structures of isolated compounds were determined by means of spectroscopic methods (^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{1}H-^{1}H COSY, HMQC and HMBC) and by comparison of their physical and spectral data with the literatures. The compounds were identified as resveratrol (**1**) (22 mg), 11-*O*-acetyl bergenin (**2**) (6 mg), and stigmast-4-en-3-one (**3**) (5.2 mg) and isolated from this plant for first time. The compounds were examined for their *in vitro* antitrypanosomal activities against trypomastigotes of *T. evansi*. Resveratrol showed inhibitory activity against *T. evansi* with an IC_{50} value of 31.4 µg/mL, and 11-*O*-acetyl bergenin and stigmast-4-en-3-one exhibited IC_{50} values of 61.2 and 62.8 µg/mL, respectively.



1



2



3

[1]. Bawn, S.,et al., 2010. *J. Vet. Med. Sci.* 72 (4): 525-528.

Trypanosoma evansi, *Vitis repens*, Antitrypanosomal activities

講演番号：2A04a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ A校舎04会場

植物由来MEP経路阻害物質の単離と構造解析

Isolation and structural analysis of a novel inhibitor of the MEP pathway from a plant extract

○北原一治、高橋俊哉[1]、越野広雪[1]、佐々木康幸、矢嶋俊介（東農大応生科・バイオ、[1]理研・基幹研）

○ Kazuharu Kitahara, Shunya Takahashi[1], Hiroyuki Koshino[1], Yasuyuki Sasaki, Shunsuke Yajima (Dept. of Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [1]RIKEN ASI)

【目的】　生物にとって必要不可欠なイソプレノイドはイソペンテニル二リン酸から生合成されている。イソペンテニル二リン酸合成経路は 2 種類知られており、真核生物が主に保有しているメバロン酸経路と真正細菌が保持している 2-*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) 経路である。MEP 経路はヒトには存在しないため、新規薬剤分子の有用なドラッグターゲットと考えられる。本研究は植物体から MEP 経路阻害物質を単離し、構造解析を行うことで新規薬剤の候補物質を見つけ出す事を目的とした。

【方法・結果】　コショウ科植物(*Piper* sp.)の乾燥物を破砕後メタノール抽出し、メタノールとヘキサンにより分画を行った。メタノール画分を中圧液体クロマトグラフィーにより分画し、活性試験を行った。活性試験は、MEP経路の初発酵素である1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) とその生成物を基質とする酵素1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase（DXR） の2つを共役させた系を利用した。DXSはpyruvateとD-glyceraldehyde 3-phosphate (D-GAP) を縮合し1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) を合成する。DXPはDXRによってMEPに変換されるが、この際にNADPHが$NADP^+$に酸化される。このときの、NADPHの減少をその吸光度（$\lambda = 340$ nm）を測定することで阻害活性を評価した。活性のみられたフラクションをさらに高速液体クロマトグラフィーを用いて分画を行った。活性測定と精製を繰り返し単一のピークを得た。構造解析はLC-MS, GC-MSにて分子量と組成式を解析し、NMRを用い平面構造を決定した。その結果、この物質はメチレンジオキシフェニル基を有する新規化合物と考えられた。コショウ科の植物にはメチレンジオキシフェニル基を有するものが多く存在しており、それらには抗菌活性や殺虫活性が知られている。今回明らかにした構造には立体異性体が存在したことから、その立体化学と生物活性をより詳細に明らかにする目的で合成を試みた。まず、１０-ウンデセン-１-オールを出発物質とし、Jacobsenの方法によるエポキシドの光学分割と分子内オキシマイケル反応を経て決定した化合物の可能な４種の立体異性体すべてを合成した。現在、天然物との比較検討を行っている。

MEP pathway, drug target, enzyme inhibitor

講演番号：2A04p01
講演日時、会場：3月23日13:49～ A校舎04会場

Discosia sp.が生産するPhotinide A,Bの構造訂正と新規誘導体の単離

Structure Revision of Photinides A,B and Isolation of their Novel Derivatives

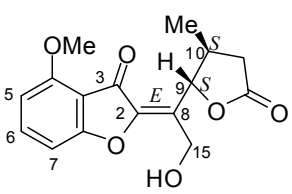
○安村 良子、金丸 沙樹、田中 和明、根平 達夫[1]、橋本 勝（弘前大・農学生命、[1]広島大院・総合科学）

○Ryouko Yasumura, Saki Kanamaru, Kazuaki Tanaka, Tatsuo Nehira[1], Masaru Hashimoto (Hirosaki University, [1]Hiroshima University)

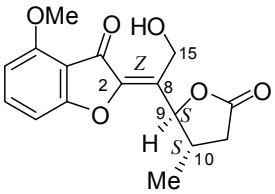
【目的】津軽地方で見出される生態学的に特徴のある真菌をスクリーニングして新規有用物質を探索・構造決定する。

【方法・結果】*Discosia* sp.から文献既知の photinide A (**1**), B (**2**)を単離した。これら化合物の機器スペクトルデータは Ding らによる文献値 [1)]に一致した。彼らは、C2, C8 位二重結合の立体化学について、^{1}H NMR スペクトルの C3 位カルボニル基による C9 位プロトンの遮蔽効果を基に帰属していた。しかしその解釈は教科書等の記述とは逆であり、訂正する必要があると予想した。そこで分子軌道に基づく NMR 化学シフトの理論計算を行ったところ、我々の仮説が正しいことが支持された。また報告者は同培養液から新たに C9-C10 位 γ−ブチロラクトン部の立体に関する新規化合物 photinide C (**3**), D (**4**)を単離した。これらの C9, C10 位の相対立体化学は NOE スペクトルを測定することにより、二重結合の配置は ^{1}H NMR スペクトルの C9 位プロトンの化学シフトについて **1**, **2** のそれらと比較して決定した。

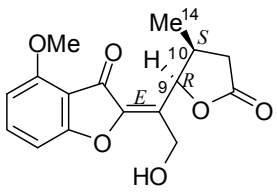
化合物 **1** と **3** は、波長軸について互いに鏡像の CD スペクトルを与え、両分子の発色団の空間位置が鏡像の関係にあることが示唆された。これまでの実験で得た情報、すなわち「**1** と **3** は C9,C10 位いずれかの異性体である」を考慮して分子モデリングによる安定構造の発色団配置を比較し、C9 位における絶対立体化学の異性体であると予想した。さらに、DFT 6-31G*を用いた分子軌道計算に基づく **1** の CD スペクトルの理論計算を行い、その絶対立体化学は(*E*,9*S*,10*S*) 配置であると結論した。Ding らも絶対立体化学について議論しているが、彼らは「**1**（文献では **2**）の CD スペクトルは波長 210nm で負の値」というデータのみを根拠に、報告者とは逆の(9*R*,10*R*)配置を結論している。上記問題を実験的に解決する目的で、**1** のオゾン分解で得られるカルボン酸 **5** を合成品と比較して結論を得るべく検討を行っている。発表ではその結果をあわせて報告する。



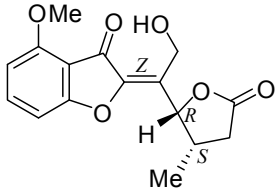
photinide A
(**1**, use to be B)



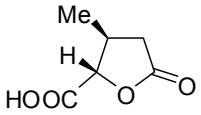
photinide B
(**2**,use to be A)



photinide C (**3**)



photinide D (**4**)



5

1) G. Ding *et al.* , *J. Nat. Prod* **2009**, 72, 942

Photinides, structural revision, CD spectra

講演番号：2A04p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ A校舎04会場

Plipastatin とFengycin の構造混乱終結(2)

Termination of Structural Confusion between Plipastatin and Fengycin

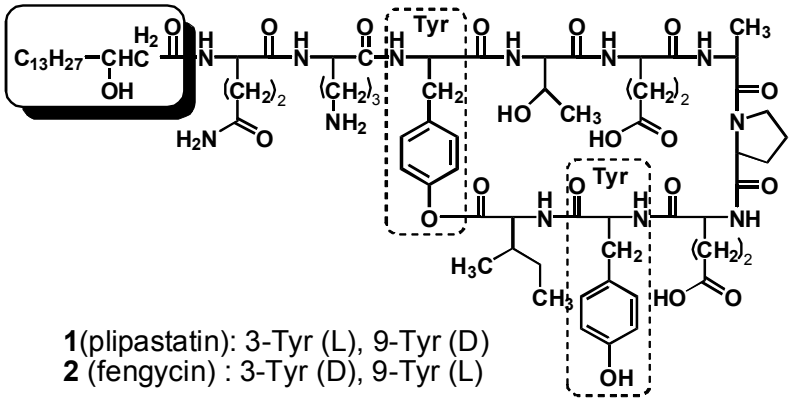
本間 美保、田中 和明、紺野 勝弘[1]、柘植 謙爾[2]、奥野 智旦[3]、○橋本 勝（弘前大・農生、[1] 富山大・和漢研、[2] 慶應大学生命科学研究所、[3] 秋田看福大）

Miho Honma, Kazuaki Tanaka, Katsuhiro Konno [1], Kenji Tsuge [2], Toshikatsu Okuno[3], ○Masaru Hashimoto（Hirosaki Univ., [1] Toyama Univ., [2] Keio Univ., [3] University of Akita Nursing and Welfare）

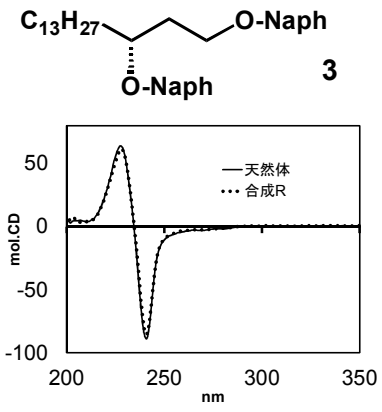
【目的】*Bacillus* 属が生産する抗菌性デプシペプチド plipastatin (**1**)と fengycin (**2**)は、分子内に両鏡像体の二つの Tyr 残基を有し、それらの入れ替わったジアステレオマーとして知られている。我々は *Bacillus subtilis* H366B 培養液から **1**, **2** のいずれかと思われるデプシペプチドを単離した。このものは **2** の文献の ^{1}H NMR スペクトルデータと良い一致を示すが、**1** のそれとは一致しない。一方、二つの Tyr 残基の配置については **1** のそれと一致するが **2** とは異なるという矛盾した結果を得た（昨年本大会で報告）。これら化合物の生物活性や生合成の詳細を議論するためには上記に関する混乱の終結が必須である。そこで、我々の単離したデプシペプチドの構造を独自に解析、さらに過去のデータと比較して **1**, **2** に関する構造混乱の終結を計画した。

【結果】まず、*N* 末端側の 3-ヒドロキシ脂肪酸部分の絶対配置を検討した。**1**, **2** について多くの論文が報告されているが、この部分について、3-ヒドロキシヘキサデカン酸メチルを大量に合成した最近の論文ではその$[\alpha]_D$ を-6° （J-P. Genet *et al. Adv.Synth.Catal.* 2007）と小さく、分解物の収量を考慮すると、旋光度の文献値との比較は確実とは言えない。そこで酸加水分解物をビス-2-ナフトイルエステル **3** に誘導後、CD スペクトルを測定したところ、微量サンプルにも関わらず明確な負の分裂型コットン効果を観測、*R* 配置が示唆された。(N. Berova *et al*. *Chirality* 1997) さらに、*R* 配置体を有する **3** を合成し、同一の CD スペクトルを得ることにより、これを確認した。

今大会では、IT-CID-MS を用いたアミノ酸配列の独自の解析を含め、**1** と **2** は同一物質として収斂すべきという結論に至った経緯を報告する。



1(plipastatin): 3-Tyr (L), 9-Tyr (D)
2 (fengycin) : 3-Tyr (D), 9-Tyr (L)



pipastatin, fengycin, 構造収斂

講演番号：2A04p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ A校舎04会場

細菌によるアフラトキシン生産阻害活性に関する研究

Aflatoxin production inhibitory activity of a bacterium

○ウスマジャムナク、河合亮、長澤寛道、作田庄平（東大院・農生科・応生化）
○Usuma Jermnak, Ryo Kawai, Hiromichi Nagasawa and Shohei Sakuda
(Grad.Sch.Agric.Life Sci., Univ.Tokyo)

Aflatoxins, toxic secondary metabolites of some *Aspergillus* species, contaminate foods and feeds and threaten human and animal health. It is difficult to resolve the aflatoxin contamination problem due to lack of an effective method to control aflatoxin production. Specific aflatoxin production inhibitors are useful for preventing foods and feeds from aflatoxin contamination. During the course of our screening for aflatoxin production inhibitors, the culture broth and culture filtrate of a soil bacterium were shown to inhibit aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* without affecting the fungal growth. In a model infection experiment with peanut, the culture broth of the bacterium decreased the aflatoxin production on peanut without affecting the fungal growth. The active component involved in the culture filtrate was purified by charcoal column chromatography and reverse-phase HPLC under a basic condition. Identification of the active principle is now in progress.

Aflatoxin production inhibitor, culture broth and culture filtrate of strain no.27

講演番号：2A04p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ A校舎04会場

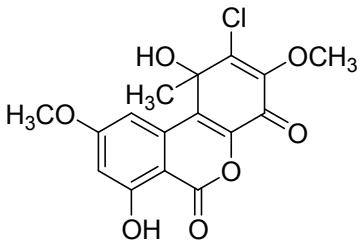
糸状菌が生産するアフラトキシン生合成阻害物質

Inhibitors of aflatoxin biosynthesis produced by fungi

○山崎 寧之、石原 亨[1]、矢部 希見子[2]、中島 廣光[1]（鳥取大院・農、[1]鳥取大・農、[2]食総研）
○Yasuyuki Yamasaki, Atsushi Ishihara[1], Kimiko Yabe[2], Hiromitsu Nakajima[1]
(Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [1]Fac. Agric., Tottori Univ., [2]NFRI)

【目的】アフラトキシン(AF)は*Aspergillus flavus* や*A. parasiticus* などの糸状菌が生成する発癌性二次代謝産物である。一方、norsolorinic acid (NA)はAFの生合成経路上で最初に見出される安定な色素中間体である。われわれのグループはAF生合成阻害の標的をNAまでの経路とし、これまでにいくつかの糸状菌由来のNA生成阻害物質を報告してきた。前回の大会では糸状菌エンドファイト(Sm-6 株)の生産する化合物 **1** ($C_{16}H_{13}ClO_7$: TMC-264と同定)、その類縁体である新規な化合物 **2** ($C_{15}H_{11}ClO_7$)と**3** ($C_{16}H_{13}ClO_6$)の化学構造とNA生成阻害活性について報告した。今回、新たに2種のTMC-264類縁体を見出したのでそれらの化学構造とNA生成阻害活性を報告する。

【方法・結果】NA生成阻害活性を次の2種の試験方法で調べた。被験物質を含むGY寒天培地でNA蓄積変異株を生育させ、目視でNA生成量を評価する阻害試験Aと、被験物質を含むGY液体培地でNA蓄積変異株を生育させ、菌体重量を測定しNA生成量をHPLCで定量する阻害試験Bである。スクリーニング、あるいは代謝産物の精製には阻害試験Aを、精製された代謝産物の正確な阻害活性の評価には阻害試験Bを用いた。化合物 **1**～**3** の生産量を増やし阻害試験Bを用いてそれらのNA生成阻害活性を詳しく調べること、また新たな類縁体を得ることを目的に麦芽培地の培地成分が代謝産物の生成に与える影響を検討した。その結果、KClを添加した麦芽培地で類縁体生産量の増加が見られたので、KCl添加培地で本菌を培養し、培養濾液抽出物を得た。TMC-264のUVスペクトルと類似するUVスペクトルを持つ代謝産物をこれら抽出物中に検索し、化合物 **4** ($C_{16}H_{15}ClO_7$)と化合物 **5** ($C_{16}H_{14}O_6$)を単離し、機器分析データに基づいてそれらの化学構造を解析した。また、阻害試験**B**を用いて代謝産物のNA生成阻害活性を調べた。化合物 **1** のIC_{50}値は 3 μmol/Lで、30 μmol/Lより高い濃度では菌の生育を阻害した。化合物 **2** のIC_{50}値は 30 μmol/Lで、100 μmol/Lの濃度でも菌の生育には影響を与えなかった。化合物 **3** はNA生成や菌の生育に対して全く阻害活性を示さなかった。化合物 **4** と **5** については現在検討中である。



TMC-264

aflatoxin, inhibitor, biosynthesis

講演番号：2A04p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ A校舎04会場

コムラサキシメジ由来の植物成長調節物質による植物成長の分子機構の解明

Elucidation of the molecular mechanism of the plant growth by the plant growth regulator from *Lepista sordida*

○関口　周兵[1]、 崔 宰熏[2]、道羅　英夫[3]、本橋　令子[4]、平井　浩文[1]、河岸　洋和[1,2]（[1]静大農・応生化、[2]静大院・創造、[3]静大・遺伝子、[4]静大農・共生バイオ）

○Shuhei Sekiguchi[1], Jae-Hoon Choi[2], Hideo Dohra[3], Reiko Motohashi[4], Hirohumi Hirai[1], Hirokazu Kawagishi[1,2]([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]Institute for Genetic Research and Biotechnology, Shizuoka University, [4]Department of Biological Science, Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

【目的】ゴルフ場などでシバが環状に繁茂した後枯れ、そのあとにキノコが発生することがある。その現象は“フェアリーリング現象”と言われている。我々はフェアリーリングを形成する菌の一種であるコムラサキシメジの培養ろ液から植物成長調節物質(2-azahypoxanthine,AHX; imidazole-4-carboxamide,ICA)を精製・構造決定し、植物に対する成長調節活性の検討及び作用メカニズムの解明を明らかにした。[1,2] 本研究ではこれらの物質による植物成長の分子機構の解明を目的とした。

【方法・結果】AHX及びICAの大量合成を行った。両化合物にスペーサーを導入し、この誘導体をリガンドとしたアフィニテーカラムを作成した。そして、イネの地上部及び、地下部で分け緩衝液にて抽出を行い、凍結乾燥させた。その凍結乾燥物をサンプルとしてアフィニテーカラムクロマトグラフィーに供し、植物のタンパク画分から吸着画分を精製した。この特異的に結合したタンパク質を電気泳動し、目的のスポットを切り出しtrypsin処理後、LC-MS/MSでペプチド断片のアミノ酸配列を推定した。

また、植物成長調節物質(AHX、ICA)を継続的に処理し生育させたイネの地上部及び、地下部のタンパク質の発現はコントロールのものと比較して差異が現れるかプロテオーム解析を現在行っている。

1) J.-H. Choi et al., ChemBioChem, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi et al., J. Agric. Food Chem., 58, 9956-9959 (2010)

Lepista sordida, plant growth regulator, molecular mechanism

講演番号：2A04p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ A校舎04会場

コムラサキシメジ由来の植物成長調節物質とそれらの代謝産物に関する化学的研究

Chemical studies on metabolites of plant growth-regulating substances from the faily ring-forming fungus *Lepista sordida*

○竹田 翔伍[1]、崔 宰熏[2]、山川 泰広[1]、越野 広雪[3]、浅井 辰夫[4]、平井 浩文[1]、河岸洋和[1,2]（[1]静大農・応生化、[2]静大院・創造、[3]理研、[4]静大農・バイオ）

○Shogo Takeda[1], Jae-Hoon Choi[2], Yasuhiro Yamakawa[1], Hiroyuki Koshino[3], Tatsuo Asai[4], Hirohumi Hirai[1], Hirokazu Kawagishi[1,2] (Department Of Applied Biological Chemistry, Faculty Of Agriculture, Shizuoka University[1], Graduate School Of Science and Technology, Shizuoka University[2], RIKEN, The Institute of Physical and Chemical Research[3], Department Of Applied Biological Sience, Faculty Of Agriculture, Shizuoka University[4])

【目的】我々は以前、フェアリーリングの惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する2-azahypoxanthine（AHX）及びimidazole-4-carboxamide（ICA）を単離した[1, 2)]。また、昨年度の本大会においてこの植物成長調節物質の代謝産物の可能性を報告した[3)]。本研究では、植物体内における代謝産物の単離・精製、及び植物に対する成長調節活性の検討を目的とした。

【方法・結果】AHXを処理したイネの抽出物をHPLCで分析したところ、AHX無処理のイネの抽出物には見られない化合物の存在が確認できたことから、この化合物を単離したところ、AHXの代謝産物であることがわかった。この代謝産物は新規化合物であった。この代謝産物の合成法を確立し、大量合成を行い、AHX, ICAおよびAHX代謝産物を用いてイネのポット栽培試験および水田栽培試験を行った結果、各化合物を処理したイネの成長促進が認められ、収量が増加した。また、AHX代謝産物を用いたコムギ栽培試験を行った結果、成長促進が認められ、収量が増加した。

1) J-H Choi *et al.*, *ChemBioChem*, 11, 1373-1373 (2010)
2) J-H Choi *et al.*, *J. Agric. Food Chemi*, 58 (18), 9956-9959 (2010)
3) 小堀 一ら　平成23年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p 15

Lepista sordida, plant growth-regulator, metabolites

講演番号：2A04p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ A校舎04会場

コムラサキシメジが産生するフェアリーリング惹起物質の植物内生の証明

Demonstration of the existence of plant growth regulators produced by *Lepista sordida* in plant

○崔 宰熏[1]、山川 泰広[2]、関口 周兵[2]、竹田 翔伍[2]、大西 利幸[1]、森田 明雄[2]、本橋 令子[3]、平井 浩文[2]、河岸 洋和[1,2]（[1]静大院・創造、[2]静大農・応生化、[3]静大農・共生バイオサイエンス）

○Jae-Hoon Choi[1], Yasuhiro Yamakawa[2], Shuhei Sekiguchi[2], Syougo Takeda[2], Toshiyuki Onishi[1], Akio Morita[2], Reiko Motohashi[3], Hirofumi Hirai[2], Hirokazu Kawagishi[1,2] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [3]Department of Biological Science, Faculty of Agriculture , Shizuoka University)

【目的】我々は以前、フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する2-azahypoxanthine (AHX) 及びimidazole-4-carboxamide (ICA)を単離した[1, 2)]。さらにこのAHXをイネに処理したところ、このイネ中から新たにAHXの代謝産物の可能性を報告した[3)]。また、これらの化合物を様々な植物に処理したところ、全ての植物において植物成長調節活性が見られた。この結果を受け、我々は、植物自身がこれらAHX関連化合物を作り出し、自然界に普遍的に存在するのではないかと仮説を立て、LC-MS/MSを用いて植物体からのAHX関連化合物の内生の有無を調べることを目的とした。

【方法・結果】イネ及びシロイヌナズナをはじめとした数十種類の植物を地上部と地下部に切り分け、それぞれエタノール及びアセトン抽出を行い、抽出物を得た。その後、得られた抽出物を前処理し、PC HILICカラムを用いてLC-MS/MS (LTQ Orbitrap)に供したところ、イネの地下部よりAHX及びその代謝産物の内生を確認した。そこで現在、検出されたAHX及びその代謝産物が実際にイネ由来の化合物である事を証明するために、無菌状態でイネを生育中である。また、イネ以外の植物の抽出物についても更に分画を進めている。

1) J-H Choi et al., ChemBioChem, 11, 1373-1377 (2010)
2) J-H Choi et al., J. Agric. Food Chem., 58 (18), 9956-9959 (2010)
3) 小堀 一ら、平成23年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p 15

Lepista sordida, Plant growth regulator, LS-MS/MS

講演番号：2A04p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ A校舎04会場

ナラタケ(*Armillaria mellea*)が産生する多感作用物質の化学的解明

Chemical studies on allelopathy compounds from *Armillaria mellea*

○小堀　一[1]、関谷　敦[2]、平井浩文[1]、河岸　洋和[1,3]（[1]静大農・応生化、[2]森林総研、[3]静大院・創造）

○Hajime Kobori[1], Atsushi Sekiya[2], Hirai Hirofumi[1], Hirokazu Kawagishi[1,3] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Forestry and Forest Products Research Institute, [3]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

キシメジ科ナラタケ属のナラタケ(*Armillaria mellea*)は生きている植物に対する寄生性、病原性が非常に強く、ナラタケ寄生による病害は「ナラタケ病」と呼ばれている。また、ナラタケは他の菌類に対する影響も強く、イッポンシメジ科イッポンシメジ属のキノコであるタマウラベニタケ(*Entoloma abortivum*) は近傍にナラタケの菌糸があると球状の奇形を生じることが知られている[1)]。本研究では、ナラタケが産生する他の菌類や植物に対する活性物質の探索を目的とした。

【方法・結果】

ナラタケ488および543菌株を約3週間液体培養することで得られた培養液を濾過し、菌体および培養ろ液に分け、培養ろ液を分液ロートを用いて液-液分配することによって、ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、1-ブタノール可溶部および水可溶部に順次分画した。それらの画分をエノキタケ(*Flammulina velutipes*)に対するペーパーディスクアッセイおよびレタス(*Lactuca sativa*)に対する植物成長調節活性試験の結果を指標に各種クロマトグラフィーで分画した結果、ナラタケ488および543株のヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部から数種類の化合物の単離に成功した。このうち収量の多い4種類の化合物をレタスおよびユーカリ(*Eucalyptus camaldeusis*)に対する植物成長調節活性試験に供したところ、根および胚軸の伸長を著しく抑制した。また、それら化合物をエノキタケに対するペーパーディスクアッセイに供し、エノキタケの菌糸に対する影響を検討した。

1)今関六也ら　日本のきのこ

Armillaria mellea, plant growth regulation, allelopathy compounds

講演番号：2A04p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ A校舎04会場

新規ナフトキノン化合物 JBIR-85 の単離、構造決定および生合成に関する研究

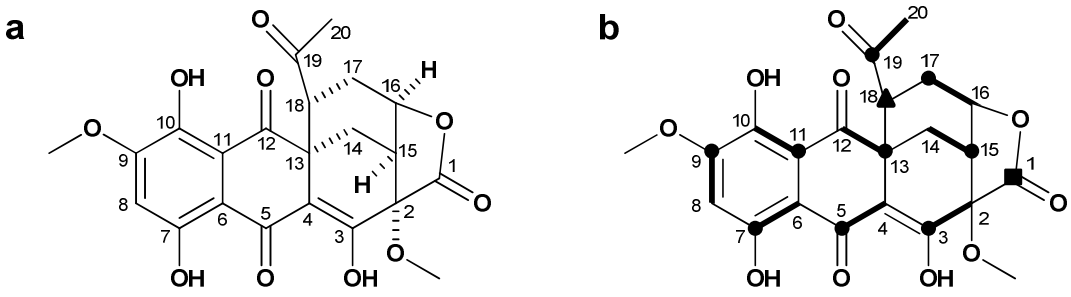
Studies on isolation, structure determination and biosynthesis of a new naphthoquinone compound, JBIR-85

○泉川美穂、本橋慶一郎、佐藤龍太朗[1]、永井文、大西康夫[1]、高木基樹、新家一男[2]（JBIC、[1]東大院・農生科、[2]産総研）

○ Miho Izumikawa, Keiichiro Motohashi, Ryutaro Satou[1], Aya Nagai, Yasuo Ohnishi[1], Motoki Takagi, Kazuo Shin-ya[2] (JBIC, [1]Tokyo Univ., [2]AIST)

【目的】多種多様な構造を有する天然化合物は、医薬品開発の優れたソースとして用いられているが、様々なアッセイ系に適応可能とするため、抽出物のみでなく、単離天然化合物ライブラリーを用いた、新たな天然物スクリーニングの戦略拡大が強く望まれている。そこで我々は、単離天然化合物ライブラリーを構築することを目的に、種々の放線菌について二次代謝産物を分析した。

【方法と結果】沖縄県首里の土壌から分離した *Streptomyces* sp. RI-77 を培養し、菌体アセトン抽出物より、酢酸エチル抽出、各種クロマトグラフィーを用いて、新規ナフトキノン系化合物 JBIR-85 を単離した。単離化合物の平面構造に関しては、各種 NMR 解析により決定した。本化合物は、これまでに無い新奇な骨格を有していたため、構造の確認を行うと共に、絶対配置を明らかにするため、X 線結晶構造解析を行った。その結果、本化合物はナフトキノン様骨格に、3 環性の新奇な骨格を有する化合物であることを明らかにした (a)。さらに、この高度に環化した構造の生合成に興味が持たれたため、[1-^{13}C] 及び [1,2 -$^{13}C_2$]酢酸の取り込み実験を行った (b)。本標識パターンから、本化合物の 3 環性部分は、Baeyer-Villiger 反応を経由して環化する経路により生合成されると推測した。



a : JBIR-85 の構造、b : ^{13}C 標識パターン（●、■ : [1-^{13}C]酢酸による標識、— : [1,2-$^{13}C_2$]酢酸標識による ^{13}C-^{13}C カップリング、▲ : [1,2-$^{13}C_2$]酢酸の 2 位による標識）

JBIR-85, *Streptomyces*, polyketide

講演番号：2A04p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ A校舎04会場

微生物代謝産物フラクションライブラリーとMP plotを活用した新規化合物の探索

Discovery of new compounds based on a microbial metabolite fraction library and MP plot

○野川俊彦、岡野亜紀子、田中健一、浦本昌和、高橋俊二、長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

○Toshihiko Nogawa, Akiko Okano, Kenichi Tanaka, Masakazu Uramoto, Shunji Takahashi, Hiroyuki Osada (Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】多様な構造と活性を有する微生物代謝産物を有効利用するために、我々の研究室では微生物培養液を系統的に分画することで微生物代謝産物フラクションライブラリーを作製している。作製したライブラリーをLC/MSにより分析することで、抽出物では検出できなかった微量代謝産物を見出すことが可能である。本研究では、ライブラリーから効率良く特徴的構造を有する新規代謝産物を探索するためにスペクトルデータベースを作製し、これらをライブラリーと組み合わせることで新規化合物を探索することを目的とした。

【方法と結果】微生物培養液約20 Lをアセトンで抽出後、得られた抽出液を酢酸エチルと水で分配し有機溶媒可溶性画分と水溶性画分を得た。有機層画分は、シリカゲルを用いた中圧液体クロマトグラフィー（MPLC）により粗分画後、各画分を逆相HPLCにより分画することでフラクションを作製した。水層画分はDIAION HP-20による粗分画後、逆相MPLCにより分画した。この方法で１つの菌株より約300のフラクションを作製した。フラクションは全てフォトダイオードアレイを用いたLC/MSにより分析し、各含有成分のUV吸収およびマススペクトルを測定することで成分情報が付加されたライブラリーとした。得られたスペクトルデータをもとに２種のデータベースを作製した。一方は市販のソフトウェアを用いた一般的なスペクトルデータベースであり、もう一方は我々の研究室で開発したMP（Microbial Products）plotである。これは、UVクロマトグラム上に得られたピーク（代謝産物）の保持時間を横軸、そのピークに対応するマスナンバー（分子量）を縦軸に取り二次元プロットしたものである。各代謝産物は二次元上のドットとして表現され、それらの座標は代謝産物の物性を反映している。このMP plotでは、物性の類似した化合物は近傍のドットとして現れるため、このことを利用し特定の化合物の類縁体探索を容易に行うことが可能である。さらに、プロットを菌株ごとに比較することで菌株特有の化合物群を探索することが可能であり、これは新規化合物探索に有用である。これら２つのデータベースと微生物代謝産物フラクションライブラリーを組み合わせた化合物探索方法について報告する。さらに、この方法を利用してverticilactam、spirotoamide AおよびBなどの新規化合物を単離したので、それらの構造についても合わせて報告する。

fraction library, MP plot, microbial metabolite

講演番号：2A04p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ A校舎04会場

微生物代謝産物からのMRSAに対するアルベカシン耐性克服物質の探索

Search for circumventors of arbekacin resistance in MRSA

○ 須賀 拓弥[1]、 石井 貴広[1,2]、 岩月 正人[2]、 山本 剛[2]、 野中 健一[2]、 松本 厚子[2]、
増間 碌郎[1,2]、高橋 洋子[1,2]、花木 秀明[2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]
([1]北里大感染制御科学、[2]北里大生命研)

○ Takuya Suga[1], Takahiro Ishii[1,2], Masato Iwatsuki[2], Tsuyoshi Yamamoto[2], Kenichi Nonaka[2], Atsuko Matsumoto[2], Rokuro Masuma[1,2], Yoko Takahashi[1,2], Hideaki Hanaki[2], Satoshi Omura[2], Kazuro Shiomi[1,2]
([1]Graduate school of infection control sciences, Kitasato University, [2]Kitasato institute for life sciences, Kitasato University)

【目的】

アミノグリコシド系抗生物質アルベカシン（ABK）は、薬剤耐性菌に有効な効果があるとしてMRSA に対して用いられてきたが、近年では ABK 耐性 MRSA も出現しており、使用範囲が限定されるようになってきた。ABK 耐性 MRSA の主な耐性機構は、修飾酵素である二機能酵素によるアセチル化およびリン酸化と考えられている。このような耐性機構を阻害することができれば、ABK 耐性を克服できることが期待される。そこで、微生物代謝産物からの MRSA に対する ABK 耐性克服活性物質の探索を行った。

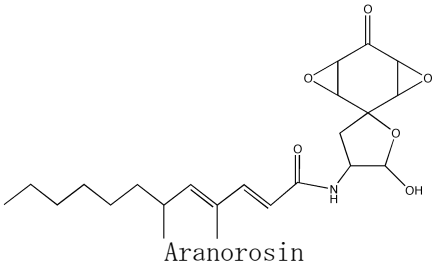
【方法】

活性評価はペーパーディスク法により行い、試験菌として ABK 耐性 MRSA を用いた。菌の増殖に影響を与えない濃度の ABK 含有の寒天培地と ABK 非含有寒天培地にそれぞれペーパーディスクを置いて培養後、両寒天培地で阻止円径に有意な差が認められるものを選択した。[a)]

単離した活性物質については二機能酵素阻害活性を評価した。大腸菌により発現させたリコンビナント二機能酵素を用い、基質と試薬を混合して、TLC にて展開しニンヒドリンで呈色させ基質が残存しているか確認した。

【結果】

糸状菌ならびに放線菌の培養液約７,000サンプルをスクリーニングした結果、いくつかの微生物培養液にABK含有培地と非含有培地で有意な差が認められた株を再培養した。この微生物培養液について、各種カラムクロマトグラフィーにより精製を行い、活性物質を単離した。取得した活性物質の中でも糸状菌から単離したaranorosin[b)] は、二機能酵素のリン酸化反応を阻害していることが示唆された。



Aranorosin

a) Tetrahedron **67**: 6644-6648 (2011).
b) J. Antibiot. **41**: 1780-1784 (1988).

Keyword1：Arbekacin resistance in MRSA, Keyword2：circumventor of resistance, Keyword3：microbial metabolite

講演番号：2A04p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ A校舎04会場

脳梗塞治療薬候補SMTPの新規同族体

Isolation of novel congeners of SMTP, a candidate therapeutic agent for ischemic stroke

○大竹　新也、小川　哲弘、長谷川　啓子[1]、西村　直子[1]、鈴木　絵里子、蓮見　恵司（東農工大農・応生科、[1]ティムス）

○Shinya Otake, Tetuhiro Ogawa, Keiko Hasegawa[1], Naoko Nishimura[1], Eriko Suzuki, Keiji Hasumi (Tokyo Noko Univ, [1]TMS Co., Ltd)

【目的】糸状菌 *Stachybotrys microspora* が生産するトリプレニルフェノールSMTP-7は、血栓溶解促進作用と抗炎症作用を併せもち、優れた脳梗塞改善作用を示す。血栓溶解作用はプラスミノゲン活性化を促進するモジュレーター活性によるものであり、抗炎症作用はsoluble epoxide hydrolase (sEH) の阻害によることが示唆されている。SMTP分子は、クロマンラクタムとイソプレン側鎖から成る基本骨格とラクタム窒素に結合した側鎖(N側鎖)から構成される。N側鎖の構造が上記両活性に大きく影響する。本研究では、SMTPのイソプレン側鎖の構造が異なる同族体を同定し、sEH阻害の構造活性相関情報を得ることを目的とする。
【方法】SMTP同族体の内で最も単純なN側鎖をもつSMTP-0を使用して、微生物変換による新規同族体の創製を試みた。また、SMTPの生産菌の培養を通常より延長して自己代謝による変換も試みた。変換体の精製は、溶媒抽出、逆相HPLCにより行い、NMR、MS等の機器分析により構造を決定した。
【結果】土壌より分離した真菌をスクリーニングし、16株に変換活性を確認した。そのうちの2株を用いた変換培養から3種類の新規同族体を単離した。またSMTPの生産菌による自己代謝産物として2種類の新規同族体を単離した。これらの新規同族体は、イソプレン側鎖の構造が変換された化合物であり、N側鎖が異なる従来のSMTP同族体とは別の種類の同族体と位置付けられる。新規同族体は溶解性に優れ、一部の新規同族体はSMTP-0と同等のsEH阻害活性を示したことから、イソプレン側鎖の修飾はsEH阻害活性を大きく損なうことなく物性を制御するのに有用であることが示唆された。

Bioconversion, Epoxide hydrolase, Inhibition

講演番号：2A04p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ A校舎04会場

哺乳類 DNA ポリメラーゼを阻害する新規アザフィロンの単離と構造決定

Isolation and structure determination of new Azaphilones that inhibit mammalian DNA polymerases

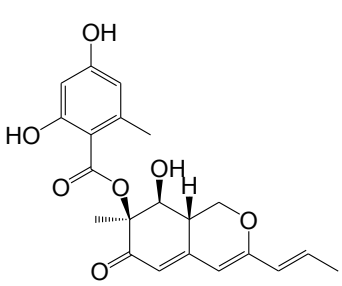
○明畠 佑典、竹内 倫文、倉持 幸司[1]、紙透 伸治、栗山 磯子[2]、吉田 弘美[2]、水品 善之[2]、菅原 二三男（東理大理工・応生、[1]京都府大院・生命環境、[2]神戸学院大栄養・栄養）

○Yusuke Myobatake, Toshifumi Takeuchi, Kouji Kuramochi[1], Shinji Kamisuki, Isoko Kuriyama[2], Hiromi Yoshida[2], Yoshiyuki Mizushina[2], Fumio Sugawara (Tokyo Univ. of Sci., [1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kobe-Gakuin Univ., Dept. of Nutr. Sci.)

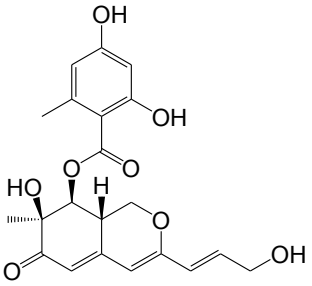
【目的】哺乳類の DNA ポリメラーゼ(pol) は、15 種類の分子種が存在しており、A, B, X, Y の 4 つのファミリーに分類される。DNA pol は、生命の維持に重要な DNA の複製・組換え・修復などに関わるが、生物学的機能の詳細は未解明である。特定の DNA pol 分子種を阻害する化合物群はこれら酵素群の機能解析の良いツールになると考えられる。本研究では、数多くの生理活性物質を生産する真菌に着目し、その培養液から哺乳類の DNA pol 分子種を阻害する化合物を探索した。今回、*Penicillium pinophilum* の培養液中から、DNA pol ファミリーを選択的に阻害する新規アザフィロンを単離・構造決定したので報告する。

【方法】日本各地の土壌・海洋生物を採取し、酢酸・アルコール・熱などで処理後、付着している真菌を液体培地で約 2～3 週間培養した。その培養液を有機溶媒で抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、化合物を単離した。単離した化合物を質量分析や NMR などで解析し、その構造を決定した。単離・構造決定した化合物は DNA pol 阻害活性試験を行った。

【結果】葛西臨海公園で採取した海藻を酢酸処理後、分離した *Penicillium pinophilum* を PDB 培地（4 L)、14 日間、静置培養し、この培養液を塩化メチレンで抽出した。得られた粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。単離した 2 つの化合物の構造を質量分析、NMR などにより解析し、以下の構造と決定した。これらの化合物はアザフィロン骨格を有する新規化合物であり、Pinophilin A, B と名付けた。さらに、Pinophilin A, B の各種 DNA pol 阻害活性を測定したところ、DNA pol A ファミリー(DNA pol γ)、DNA pol B ファミリー(DNA pol α, δ, ε)、DNA pol Y ファミリー(DNA pol η, ι, κ)を阻害するが、DNA pol X ファミリー(DNA pol β, λ, μ, TdT)は阻害しないことが明らかになった。



Pinophilin A



Pinophilin B

azaphilone, DNA polymerase, natural product

講演番号：2A04p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ A校舎04会場

ミミズ糞土中のイネいもち病菌に効果を示す物質の探索

Antifungal Substance from Earthworm Casts

○高木 修太郎、津田 菜友美、佐藤 義大、菅原 二三男、鎌倉 高志（東理大院理工・応生科）
○Shutaro Takagi, Nayumi Tsuda, Yoshihiro Sato, Fumio Sugawara, Takashi Kamakura(Tokyo University of Science)

【目的】イネいもち病菌*Magnaporthe oryzae*はイネにいもち病を引き起こす病原糸状菌である。本菌は分生子から発芽管を伸長させ、その先端に形成される付着器により植物体内へと侵入する。本研究に先立ち、一部のミミズ糞土製品が植物病原糸状菌に対して抑制的な効果を示す傾向があることを予備的な実験で見出した。そこで、病原糸状菌に対する抗菌性成分がミミズ糞土に含まれる可能性を検証した。本研究では、ミミズ糞土（みみず太郎100, ㈱豊徳, 徳島）に含まれるイネいもち病菌抑制活性物質の特定およびその作用機作の解析を最終目的としている。
【方法・結果】ミミズ糞土を熱水抽出してイネいもち病菌の分生子に投与したところ、発芽および付着器の形成に対する抑制活性を示した。有機溶媒により抽出したところ、酢酸エチル画分に強い活性を見出した。得られた活性画分をフラッシュカラムクロマトグラフィーで三回分画を行い、活性画分を特定した。最終活性画分中に含まれる物質を構造解析し、ミミズ糞土の活性候補物質として DDTCT (7,8,9,10,11,12,19,20,21,22,23,24-dodecahydro-dibenzo[1,6,13,18]-tetra-oxacyclooctadecine-2,5,14,17-tetrone)およびHDDA(hexadecanedioic acid)を同定した。DDTCT、HDDAは単体および二者のみの混合状態ではイネいもち病菌に対する活性は、最終活性画分に比較して強くなかったので、ミミズ糞土の主たる活性物質は他に存在すると考えられた。しかしながらDDTCT、HDDAの作用機作にも興味が持たれたので簡単な解析を行ったところ、イネいもち病菌の細胞周期、病原性には大きな影響は及ぼさなかった。一方で、HDDAは酸素消費を減少させたことから呼吸に影響を及ぼす可能性が示唆されたが、ミトコンドリアの数や分布には大きな変化はなかった。

Magnaporthe oryzae, *Glomerella cingulata*, phytopathogenic fungi

講演番号：2A04p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ A校舎04会場

Penicillium sp. FKI-5329が生産するNADH-フマル酸還元酵素阻害化合物

NADH-fumarate reductase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FKI-5329

大山 公成[1]、○森 美穂子[1,2]、増間 碌郎[1,2]、高橋 洋子[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]（[1]北里大院・感染制御、[2]北里大・生命研）

Kimimasa Ohyama[1], ○Mihoko Mori[1,2], Rokuro Masuma[1,2], Yoko Takahashi[1,2], Satoshi Omura[1], Kazuro Shiomi[1,2] ([1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato Univ., [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ.)

【目的】寄生虫の中でも蠕虫症は、死に至るケースこそ原虫症に比べ少ないものの経過が慢性的で、長期間にわたり人の健康や社会生活に影響を与えるため、特に開発途上国では大きな問題となっている。我々は新たな抗蠕虫薬の開発を目的として、蠕虫特異的な嫌気的エネルギー代謝系に着目し、同代謝系上のミトコンドリア呼吸鎖複合体IとIIから成るNADH-フマル酸還元酵素（NFRD）を阻害する化合物を微生物二次代謝産物から探索した。

【方法と結果】NFRD阻害活性はブタ回虫（*Ascaris suum*）体壁筋から調製した粗ミトコンドリアを用いて測定した。NFRDは哺乳類の呼吸鎖にも存在する複合体Iを含む。NFRD阻害活性を示すサンプルから哺乳類の複合体Iを阻害するものを除くため、ウシ心筋から調製した粗ミトコンドリアを用いて、複合体Iを含むNADH-酸化酵素（NO）の阻害活性も併せて調べた。放線菌・糸状菌培養液約8,400サンプルをスクリーニングした結果、糸状菌*Penicillium* sp. FKI-5329株培養液にNFRD選択的な阻害活性を見出した。培養液の酢酸エチル抽出物を各種カラムクロマトグラフィーで精製し、ペンタエン構造を持つprugosene A1と新規類縁体を活性化合物として単離した。

NADH-fumarate reductase, *Penicillium*, prugosene

講演番号：2A04p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ A校舎04会場

微生物二次代謝産物からの赤痢アメーバ原虫特異的含硫アミノ酸代謝酵素阻害物質の探索

Search for microorganisms-produced inhibitors against sulfur-containing amino acid metabolic pathway of *Entamoeba histolytica*

○増田 祐衣[1]、森 美穂子[1,2]、野崎 智義[3]、筒井 歩[2]、砂塚 敏明[1,2]、増間 碌郎[1,2]、高橋 洋子[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]
([1]北里大院感染制御、[2]北里大生命研、[3]国立感染研)
○Yui Masuda[1], Mihoko Mori[1,2], Tomoyoshi Nozaki[3], Ayumi Tsutsui[2], Toshiaki Sunazuka[1,2], Rokuro Masuma[1,2], Yoko Takahashi[1,2], Satoshi Omura[2], Kazuro Shiomi[1,2]
([1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University, [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, [3]Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases)

【目的】
赤痢アメーバ症は赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）が水・食物から経口感染し大腸に寄生することにより起こる下痢症であり、熱帯～亜熱帯の開発途上国で多数の感染者がみられる。また我が国においても近年、年間約千件の発症事例が厚生労働省に報告され、重要な感染症の一つとなっている。治療には抗菌・抗原虫薬であるメトロニダゾールが用いられているが、感染に関与するシスト状態の原虫には効かないことに加え、耐性原虫の出現、催奇形性等の問題があり、異なる作用機構を持つ新薬の開発が望まれている。我々は赤痢アメーバに特異的な含硫アミノ酸代謝を担う酵素群に着目し、これらの酵素を阻害する物質は赤痢アメーバ症の治療薬になると考え、微生物二次代謝産物からの探索を始めた。
【方法】
哺乳類とは異なり、赤痢アメーバの含硫アミノ酸代謝経路ではセリンからセリン-アセチル転移酵素（SAT）とシステイン合成酵素（CS）によりシステインが合成される。我々は大腸菌で発現させた赤痢アメーバのSATとCSを用いて、96穴プレートでの酵素阻害活性測定系を構築し、初めに、この測定系で天然化合物ライブラリー316化合物の酵素阻害活性を調べた。続いて、本測定系を用いて放線菌・糸状菌培養液を探索源としたスクリーニングを開始した。
【結果】
天然化合物ライブラリー316化合物中、ascofuranoneのみがSATを選択的に阻害した。一方、CSを阻害した化合物は13化合物見い出され、それらは共通して構造中にナフトキノン骨格を持っていた。また、酵素阻害活性を示す放線菌・糸状菌培養液も見出し、現在活性物質の単離を進めている。

Cysteine synthase, *Entamoba histolytica*, Sulfur-containing amino acid metabolic pathway

講演番号:2A04p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ A校舎04会場

植物から分離された希少放線菌の生産する新規物質の探索

Discovery of new aranciamycin analogs, produced by plant-derived rare actinomycetes

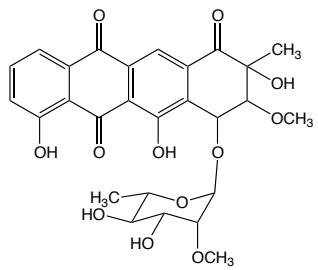
○富田 智宏[1]、岩月 正人[2]、奥山 竜輝[1]、中島 琢自[3]、松本 厚子[2]、高橋 洋子[1,2]、森 美穂子[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]（[1]北里大感染制御、[2]北里大生命研、[3]北里大感染制御研究機構）

○Tomohiro Tomita[1]、Masato Iwatsuki[2]、Ryuki Okuyama[1]、Takuji Nakashima[3]、Atsuko Matsumoto[3]、Yoko Takahashi[1,2]、Mihoko Mori[1,2]、Satoshi Ōmura[2]、Kazuro Shiomi[1,2]（[1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University, [2]Kitasato Institute for Life Sciences Kitasato University, [3]Research Organization for Infection Control Sciences Kitasato University）

【目的】放線菌の二次代謝産物からは多くの抗生物質が発見されている。しかし近年、新規物質の発見頻度の低下が問題となっている。そこで我々のグループでは新規物質をより効率良く発見するための工夫として代謝産物解析が未検討な希少放線菌の分離を行っている。このような背景のもと植物から分離された希少放線菌の二次代謝産物解析を行い、それに基づいて新規物質の探索を行った。

【方法】植物から分離された希少放線菌の中から生育の良好な12属41株を選び、4種類の培地を用いて培養した。得られた培養液の酢酸エチル抽出物164サンプルを逆相系カラムを用いてPDA-HPLC分析した。

【結果】植物から分離された希少放線菌代謝産物のHPLCデータのパターン比較より*Sphaerisporangium*属および*Kibdelosporangium*属放線菌の複数の菌株が特徴的なUV吸収(λmax 224, 258, 275, 524 nm) を有する化合物群を生産することを見出した。そこで*Sphaerisporangium* sp. K10-0461株培養液より本化合物群の取得を行った。培養液(40 ml)にEtOHを添加、留去後、酢酸エチル分配を行った。得られた酢酸エチル抽出物(74.3 mg)はシリカゲルオープンカラム(クロロホルム：メタノール系)にて分画を行った。目的の化合物群を確認した10:1画分(31 mg)についてHPLC分取を行い目的のUV吸収を有する化合物5成分を数mgずつ単離した。各種機器分析より3成分を既知化合物であるaranciamycin[1)]、aranciamycin A[2)]、DC87B[3)]と同定するとともに新規類縁体2成分の構造を決定した。植物から分離された多くの*Sphaerisporangium*属および*Kibdelosporangium*属がaranciamycin類を生産していることから本化合物群が植物と菌の共生もしくは寄生に関与していると推定している。



Aranciamycin

[1)]Helve. Chim. Acta., **53**,87-88 (1970)
[2)]Appl. Microbiol. Biotechnol., **80**,15-9 (2008)　[3)]特公昭 60-1152

Keyword1 Aranciamycin, Keyword2 Plant-derived rare actinomycetes, Keyword3 Structure elucidation

講演番号：2A04p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ A校舎04会場

タイトル　*Penicillium* sp. FKI-5249の生産する新規アザフィロン化合物の構造及び活性

Structure and activity of a new azaphilone compound produced by *Penicillium* sp. FKI-5249

○新妻　恵[1]、森　美穂子[1,2]、岩月　正人[1]、中島　琢自[3]、野中　健一[1]、増間　碌郎[1,2]、大村　智[1]、塩見和朗[1,2]（[1]北里大生命研、[2]北里大院感染制御、[3]北里大感染制御研究機構）

○Megumi Niitsuma[1], Mihoko Mori[1,2], Masato Iwatsuki[1], Takuji Nakashima[3], Kenichi Nonaka[1], Rokuro Masuma[1,2], Satoshi Omura[1], Kazuro Shiomi[1,2]

[1]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University、[2]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University、[3]Reseach Organization for Infection Control Sciences, Kitasato University

【目的】アザフィロン化合物は、*Penicillium* sp.、*Emericella* sp.をはじめとする様々な糸状菌の二次代謝産物の一つとして知られている。これまでに、抗菌、抗真菌、抗ウイルスやNO（一酸化窒素）産生阻害等、種々の生物活性が報告されており大変興味深い化合物である。

NOは、血管平滑筋の調節や神経間の情報伝達など、生体内で多くの役割を担っているが、その過剰な産生は、炎症の原因となり、リウマチ、糖尿病などの慢性炎症性疾患や癌にも関与が報告されている。今学会では、*Penicillium* sp. FKI-5249の培養液から単離した新規アザフィロン化合物について、構造決定およびNO産生阻害活性についての解析を行ったので報告する。

【方法および結果】得られた培養液の酢酸エチル抽出物をカラムクロマトグラフィーにより精製し、５種類の既知アザフィロン化合物及び新規類縁体一成分を取得した。NMRならびに各種機器分析を用いて構造決定を行い、RAW264.7細胞を用いて、LPSに誘導されるNO産生の抑制効果を調べた。その結果、全てのアザフィロン類縁体でNO産生阻害活性が認められた。構造活性相関などとあわせて報告する。

Keyword 1 *Penicillium* sp., Keyword 2 new azaphilone , Keyword 3 structure elucidation

講演番号：2A04p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ A校舎04会場

イオンモビリティー質量分析装置を利用した天然物化合物の構造解析

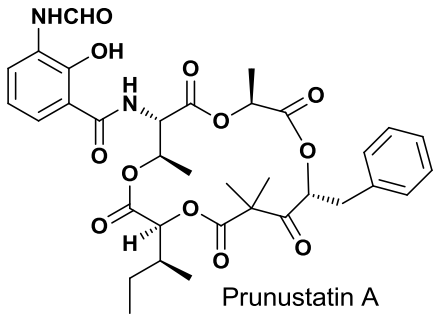
Structure analysis of natural products utilizing ion mobility MS

○小曽根郁子、高木基樹、新家一男[1]（JBIC、[1]産総研）
○Ikuko Kozone, Motoki Takagi, Kazuo Shin-ya[1] (JBIC, [1]AIST)

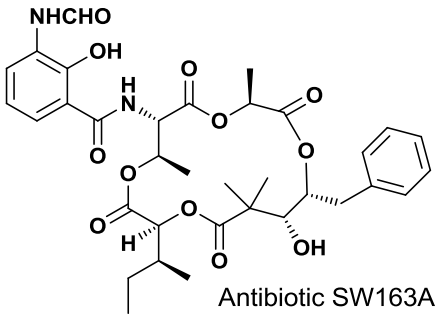
【目的】天然化合物は、医薬品開発において優れたリード化合物であることが知られており、様々なスクリーニング系に適応できるようにするため、我々は微生物の生産する二次代謝産物を主とする天然物化合物ライブラリー構築を進めている。効率的にライブラリーを構築するため、また可能な限り多様な構造を有する化合物ライブラリーを構築するためには、微生物培養物中に存在する多くの類縁体を、迅速かつ高感度に同定することが望まれる。そこで、従来のNMRやMSといった構造決定技術に加えて、イオンモビリティー質量分析装置を用いた天然化合物の構造解析を進めている。イオンモビリィーMSとは、化合物の構造のかさ高さなどにより現れてくる表面積の違いにより、化合物の構造を分離する機能であり、その分離はドリフトタイムとして表示される。本手法は、構造決定への応用が期待される新たな分析技術であり、今後の応用を目的に、我々の持つ化合物についてイオンモビリィーMS分析を行った。

【方法・結果】SynaptG2 HDMS (Waters)を使用し、dihydroxybenzoic acidについて6種類の構造異性体のイオンモビリティー分析を行った。その結果、同一分子量を有するこれらの化合物はそれぞれ異なるドリフトタイムを示し、また化合物の形状のかさ高さを衝突断面積として計算し、ドリフトタイムとの関係を調べたところ、両者は相関関係を示したことから、イオンモビリティーの構造決定における有用性が示唆された。

次に、15員環マクロサイクリック環を共通構造とする4種類のneoantimycin系化合物、JBIR-04、JBIR-05、prunustatin A、antibiotic SW163Aをそれぞれイオンモビリティーで分析し、衝突断面積との関係を検討した結果、これらの化合物のドリフトタイムと衝突断面積との間に相関関係があることが確認できた。Prunustatin Aとantibiotic SW163Aの構造の差異は、ケトン基と水酸基であるが、三次元構造には大きな差があることが明らかになり、今後の化合物の立体構造を検証する優れた測定法であることが明らかになった。



Prunustatin A



Antibiotic SW163A

Ion mobility MS, structure determination, *Streptomyces*

講演番号：2A04p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ A校舎04会場

植物病原細菌のflagellin糖鎖構造の解明：*P. syringae*のflagellin糖鎖について

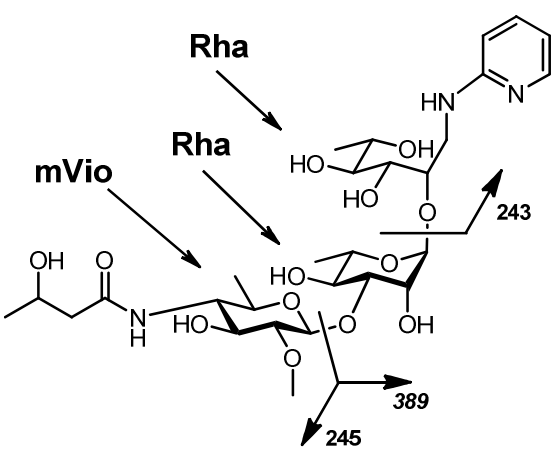
Structural analysis of glycan moieties of flagellin in phytopathogenic bacteria

○山本 雅信、知久 和寛、石井 忠、亀山 眞由美、小野 裕嗣、吉田 充、田口 富美子[1]、一瀬 勇規[1]（農研機構・食総研、[1]岡山大院・自然科学）

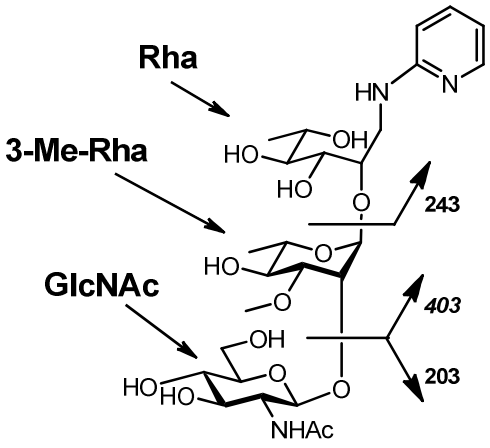
○Masanobu Yamamoto, Kazuhiro Chiku, Tadashi Ishii, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Hiroshi Ono, Mitsuru Yoshida, Fumiko Taguchi[1], Yuki Ichinose[1] (NFRI, [1]Okayama University)

[目的]植物病原細菌防除のため、病原性発現に必須である鞭毛構成糖タンパク質flagellinの糖鎖構造やその病原性との関連を調べている。これまでにタバコやダイズを宿主とする*P. syringae*のflagellinは、6箇所のセリンにラムノース(Rha)と修飾ビオサミン(mVio)からなる三糖または四糖糖鎖が結合していることを明らかにしている。今年度は同種の他病原型が持つflagellinの糖鎖について、より詳細な構造解析をおこなった。

[結果]シリンゲ型flagellinの糖鎖は他病原型と異なることがMALDI-TOFMSおよびLC-ESI/MS解析の結果から示唆されており、糖鎖を切り出しGC/MS解析することにより三糖糖鎖がGlcNAc、3-Me-RhaならびにRhaからなることが示されている。今年度はさらに大量の菌体培養をおこない、精製されたflagellin糖鎖のNMRによる解析を試みた。Flagellinのヒドラジン分解およびPA化標識により得られたPA化糖鎖を解析した結果、β-GlcNAc*p*-(1→2)-α-Rha3Me*p*-(1→2)-Rha-ol-PAであることが明らかになった。またシリンゲ型と同様、トマト型およびインゲン型のflagellinについても、NMRを用いた構造解析をおこなう予定である。



P. s.* pv. *tabaci
P. s.* pv. *glycinea



P. s.* pv. *syringae

glycoprotein, *Pseudomonas syringae*, flagellin

講演番号：2A04p21
講演日時、会場：3月23日17:59～ A校舎04会場

Pseudomonas syringae の D-Rha と L-Rha 生合成関連遺伝子破壊株中の LPS 構造と運動性への影響

Effects of defect in D-rhamnosyl and L-rhamnosyl biosynthetic genes on lipopolysaccharide structure and motility in *Pseudomonas syringae*

○知久 和寛、常見 和彦[1]、山下 祐佳里[1]、山本 雅信、亀山 眞由美、小野 裕嗣、吉田 充、田口 冨美子[1]、岩城 雅子[1]、一瀬 勇規[1]、石井 忠（農研機構・食総研、[1]岡山大院・自然科学）

○Kazuhiro Chiku, Kazuhiko Tsunemi, Yukari Yamashita, Masanobu Yamamoto, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Hiroshi Ono, Mitsuru Yoshida, Fumiko Taguchi[1], Masako Iwaki, Yuki Ichinose[1], and Tadashi Ishii (NFRI, [1]Okayama University)

病原細菌の外膜表層に存在するリポ多糖（LPS）やべん毛構成糖タンパク質であるフラジェリン糖鎖は病原性因子として機能している。演者らは、植物病原細菌*Pseudomonas syringae*のLPSやフラジェリン糖鎖は共にD-ラムノース（D-Rha）あるいはL-ラムノース（L-Rha）を構成糖として含んでいることを明らかにしている。本研究では、*P. syringae* pv. *glycine* race 4株（Pgl4）中のLPSやフラジェリン糖鎖の構成糖であるRha合成に関与するGDP-D-Rha生合成遺伝子（*gmd*と*rmd*）、推定D-Rha糖転移酵素遺伝子（*WbpZ*）、dTDP-L-Rha生合成遺伝子（*rmlD*）をそれぞれ欠損させた４つの変異株について、LPS構造と表面疎水性、運動性を野生株と比較した。

Pgl4野生株および各変異株より熱フェノール法により抽出した画分を、SDS-PAGEにより泳動パターンを比較した結果、野生株はO抗原糖鎖部位を含むLPSと、O抗原糖鎖構造を含まないリポオリゴ糖（LOS）の両方を有することがわかった。⊿*gmd*と⊿*rmd*、⊿*WbpZ*由来の抽出物にはLOSのみが観察され、LPSは認められなかったことから、これらの遺伝子はLPSのO抗原糖鎖の生合成に必要であることが示唆された。そこで、野生株や各種変異株より得られたLPSあるいはLOSを1%酢酸条件下にて部分加水分解後、ゲルろ過カラムを用いて精製し、構成糖分析並びにキラル分析、NMR分析により詳細な構造解析を行った。その結果、Pgl4のO抗原糖鎖はD-Rhaからなる四糖の繰り返し構造を有しており、コアオリゴ糖はL-Rhaを末端に含む既知構造であることが示された。さらに、MALDI-TOFMSにより野生株および各種変異株のコアオリゴ糖鎖構造を比較した結果、野生株および⊿*gmd*、⊿*rmd*、⊿*WbpZ*変異株は全て同じMSおよびMS/MSスペクトルを示し、D-Rha生合成・転移関連遺伝子の欠損はコアオリゴ糖鎖構造に影響を与えないことが示された。一方、L-Rha生合成遺伝子欠損株である⊿*rmlD*については、そのMSおよびMS/MSスペクトルから、コアオリゴ糖末端に存在するL-Rhaが欠落していることが示唆され、電気泳動で⊿*rmlD*のLOSのバンドがわずかにダウンシフトして観測された結果と一致した。

LPSのO抗原糖鎖が欠落した⊿*gmd*、⊿*rmd*、⊿*WbpZ*変異株の運動性を野生株と比較したところ、野生株よりもswimming能、swarming能ともに低下し、表面疎水性が上昇した。これらの変異株のべん毛タンパク質の糖鎖構造は野生株と同じであることから、LPS中のO抗原糖鎖の欠落が*P. syringae*の菌体表面特性を疎水性に変化させ、運動性を低下させることが示唆された。

Pseudomonas syringae, lipopolysaccharide, rhamnose

講演番号：2A05a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ A校舎05会場

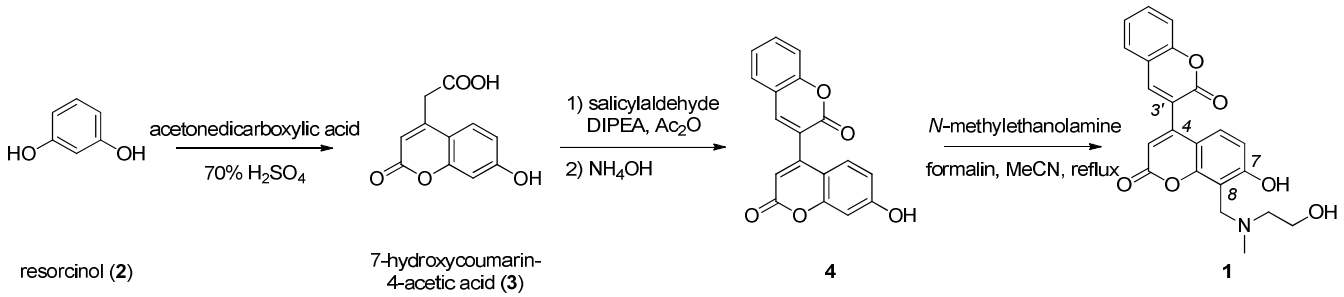
細胞周期 G2/M 期に作用する小分子化合物の構造活性相関研究

Structure-activity relationships of small molecule compounds affecting the G2/M cell cycle phase progression

○高木隆吉[1,2]、清水猛[1]、川谷誠[1]、青野晴美[1]、近藤恭光[1]、本田香織[1]、柴隆一[2]、長田裕之[1]
(理研基幹研・ケミカルバイオロジー[1]、東電大院工・物質工[2])
○Ryukichi TAKAGI[1,2], Takeshi SHIMIZU[1], Makoto KAWATANI[1], Harumi AONO[1], Yasumitsu KONDOH[1], Kaori HONDA[1], Ryuichi SHIBA[2], Hiroyuki OSADA[1] (Chem. Biol., RIKEN ASI[1], Mat. Eng., Tokyo Denki Univ[2])

【目的】
正常細胞に比べて多くのがん細胞は、細胞周期 M 期に作用する抗がん剤に感受性が高いことが知られている。理研・長田抗生物質研究室では細胞周期に作用する新たな薬剤を取得する目的でターゲットベースやセルベースの様々なスクリーニングを行っており、その過程で、ダイクマリン構造を有する化合物 **1** が弱いながら G2/M 期に作用することを見出していた。そこで私たちは化合物 **1** の構造と生物活性に興味を持ち、構造活性相関研究および構造の最適化を行うこととした。

【方法及び結果】
化合物 **1** は主クマリン骨格の 7 位にフェノール性水酸基および 8 位に [(2-hydroxyethyl)(methyl)amino]methyl 基が置換した 4,3'-結合ダイクマリン構造を有している。化合物 **1** はダイクマリン **4** に対する *N*-methylethanolamine およびホルマリンを用いる Mannich 反応で合成可能である。また、ダイクマリン **4** を resorcinol (**2**)と acetonedicarboxylic acid から合成できる 7-hydroxycoumarin-4-acetic acid (**3**)と salicylaldehyde を用いる Perkin 反応で合成することを計画した。実際 Perkin 反応および Mannich 反応の条件検討を行った結果、resorcinol から 4 行程で収率よく化合物 **1** を合成できる条件を見出した。さらに、その条件を応用し化合物 **1** の誘導体を合成することとした。合成した誘導体を HeLa 細胞に対する細胞増殖阻害活性を調べた結果、オリジナル化合物よりも低濃度で活性を示す誘導体を合成することができた。今回、それらの構造活性相関について報告する。



resorcinol (**2**)　　7-hydroxycoumarin-4-acetic acid (**3**)　　**4**　　**1**

G2/M phase, dicoumarin, SAR

講演番号：2A05a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ A校舎05会場

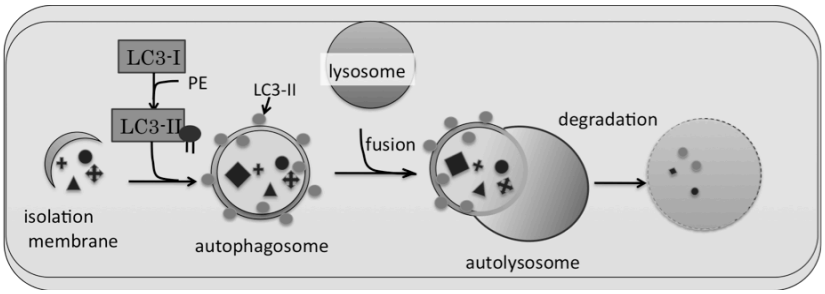
タイトル Xanthohumolのautophagy制御機構解析

Title Xanthohumol impaired autophagosome maturation through direct inhibition of valosin-containing protein

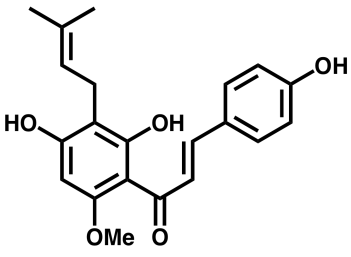
○ 金墻 周平、笹澤 有紀子、田代 悦、野川 俊彦[1]、室井 誠[1]、近藤 恭光[1]、長田 裕之[1]、井本 正哉（慶応大理工、[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

○ Shuhei Kanagaki、Yukiko Sasazawa、Etsu Tashiro、Toshihiko Nogawa、Makoto Muroi[1]、Yasumitsu Kondoh[1]、Hiroyuki Osada[1]、Masaya Imoto (Keio. Univ.、[1]Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】Autophagyはリソソームを介して非選択的にタンパク質を分解する経路であり，がんや神経変性疾患に深く関わっていることが知られている．しかしながらその詳細なメカニズムはわかっていない．そこで，本研究ではautophagyを制御する化合物を取得しautophagyのメカニズムを明らかにすることを目的とした．



【方法および結果】Autophagyでは，はじめにタンパク質がautophagosomeに覆われる．次にautophagosomeがリソソームと融合しautolysosomeを形成することでタンパク質が分解される．Autophagyの検出にはautophagosome膜に特異的に局在するLC3-IIタンパク質の発現上昇およびdot状の局在観察が広く用いられる．LC3-IIのdot状の局在を上昇させる化合物を当研究室所有の化合物ライブラリからスクリーニングした．その結果，カルコン類であるXanthohumol (XN)にその活性を見出した．XNはホップ抽出物に含まれる化合物であり，世界中の研究によって様々な生理活性が明らかにされてきた．しかしXNがautophagyを制御するという報告はなかった．



そこで詳細なautophagy制御機構を解明するために，XNの結合タンパク質の探索を行った．その結果，XN固定化ビーズ特異的に結合するタンパク質として，valosin-containing protein(VCP)を見出した．VCPは小胞体内で蓄積した不良タンパク質を細胞質へ輸送するのに関わっていることが知られているが，近年autophagyとの関連が報告されている．そこで実際にVCPがautophagyを制御しているか調べるためにVCPをknock downした．結果，LC3-IIの発現上昇が見られた．さらにVCP-GSTのリコンビナントタンパク質を用いたin vitro binding assayの結果，VCPはXNに直接結合していることが示唆された．

【結論】XNはVCPに直接結合し，VCPの機能を阻害することでautophagyを制御している可能性を示唆した．

autophagy, Xanthohumol, Valosin-containing protein

講演番号:2A05a03
講演日時、会場:3月23日09:22～ A校舎05会場

理研・天然化合物バンク(NPDepo)を利用したコレステロール代謝・分布を変化させる化合物のスクリーニング

Screening for chemical compounds modifying cholesterol metabolism and distribution by using research facility of RIKEN NPDepo.

○斎藤 臣雄[1]、石塚 玲子[2]、小林 俊秀[2]、長田 裕之[1] ([1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー、[2]理研基幹研・脂質生物学)

○Tamio Saito[1], Reiko Ishitsuka[2], Toshihide Kobayashi[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN ASI, [2]Lipid Biol., RIKEN ASI)

【目的】

理化学研究所・天然化合物バンク（NPDepo）では、多様な生命現象を解明するためのバイオプローブや、創薬シード化合物を探索するケミカルバイオロジー研究をはば広く支援する目的で、化合物ライブラリーをはじめとする研究基盤の整備・拡充を進めている。NPDepoの化合物ライブラリーに収録されている約39,000化合物の中から、スクリーニング用ライブラリーを選定し、また、構造類縁化合物を検索して提供するなど、効率的な化合物スクリーニング支援を行い、これまでに、大学・公的研究機関の研究者を中心に延べ303件の支援依頼に応じて類計13万化合物を提供している。さらに、幅広い生物系研究者のハイスループットスクリーニングを支援する目的で、化合物ライブラリーのアレイ化とスクリーニングを実施している。

【方法】

NPDepoの化合物ライブラリーの1,056化合物を用いて、細胞内コレステロールの代謝と分布を変化させる化合物のスクリーニングを行った。コレステロール結合タンパク質であるθトキシンドメイン4(D4)のEGFP標識体(EGFP-D4)を用いた蛍光顕微鏡アッセイにより、細胞表面へのEGFP-D4の結合を減少させる化合物35種を取得した。このうち、既知のコレステロール生合成阻害剤等を除いた27化合物について、コレステロール蛍光プローブfilipinによる染色や生化学的解析を行った。

【結果】

コレステロールを後期エンドゾームに蓄積させる化合物17種、コレステロール生合成を阻害する化合物5種、D4の細胞膜への結合を阻害する化合物2種を取得した。本研究では、コレステロールプローブEGFP-D4を用いた自動化蛍光イメージングにより、コレステロールの代謝や分布の変化を感度よく検出できるアッセイ法を確立した。

NPDepo, chemical library, cholesterol metabolism/distribution

講演番号：2A05a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ A校舎05会場

プロテオーム解析を用いたTerpendole類縁体の作用解析

Proteomic analysis of HeLa cells treated with terpendole derivatives.

○室井　誠[1]、石井　康之[1,2]、近藤　久恵[1]、本山　高幸[1]、長田　裕之[1]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー、[2]法政大・工）

○Makoto Muroi, Yasuyuki Ishii, Hisae Kondoh, Takayuki Motoyama, Hiroyuki Osada ([1]RIKEN ASI, [2]Housei Univ.)

【目的】糸状菌の生産するTerpendole Eがkinesin spindle protein (KSP)とも呼ばれるEg5の阻害剤である事が本研究室の中澤らによって再発見された[1]。Eg5阻害剤は抗がん剤のターゲットとしても注目されている。一方、我々は蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システム(2D-DIGE)を用いて、薬剤処理HeLa細胞のプロテオームの変化を比較する事によって、新規化合物の標的分子の推定するシステムを構築した。それを用いることによって、作用の明らかでなかったBNS-22の標的がトポイソメラーゼIIの選択的な阻害剤である事を示した。本プロテオーム解析系を用いてTerpendole E、並びに、類縁体の作用解析を行なった。

【方法】Terpendole E、並びに、その誘導体である11-ketopaspaline、不活性型のTerpendole I, 既知のEg5阻害剤を用いて実験を行なった。プロテオーム解析を行なう為の濃度決定を行なう為に、48時間薬剤でHeLa細胞を処理して、WST-8を用いて細胞数を測定した。細胞の増殖をほぼ完全に阻害する濃度でプロテオーム解析を行なった。コントロール並びに18時間薬剤処理を行なったHeLa細胞から調製したライゼートを蛍光標識した後、２次元電気泳動を行ない2D-DIGEのシステムを用いてスポットの定量を行なった。約300スポットの定量データを用いて、データベースの化合物とクラスター解析を行なった。また、解析可能な全てのスポットから薬剤処理によって顕著に変動しているスポットを選び出した。再度、薬剤処理細胞のライゼートについて２次元電気泳動を行ない、対応するスポットをPMF法、または、LC-MS/MSを用いて同定した。

【結果】クラスター解析の結果、Terpendole E 、11-ketopaspalineとEg5阻害剤のMonastrolやS-trityl-L-cysteineはチューブリン阻害剤の重合阻害剤並びに脱重合阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤を含むクラスターに分類された。一方、Terpendole Iはこれらの薬剤とは異なったクラスターに分類された。Terpendole EなどのEg5阻害剤は細胞周期をM期で阻害するが、クラスター解析を用いた解析では、データベース上の他の阻害剤とは分類可能であるが、チューブリン阻害剤等のM期阻害剤とは分類できなかった。しかし、クラスター解析に用いる個々の薬剤では特徴的なスポットの増減が見られる事から、これらのスポットを同定する事によって、クラスター内の化合物の分類ができる事が示唆された。

[1] Nakazawa J. et al (2003) Chem. Biol. 10:131-137

Proteome, Terpendole, Eg5

講演番号：2A05a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ A校舎05会場

p38γおよびp38δ特異的阻害剤探索のための化合物アレイの改良

Improvement of chemical array for screening specific inhibitor of p38γ and p38δ

○近藤 恭光、須藤 龍彦、本田 香織、内田 素子、林 輝雄、長田 裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

○Yasumitsu Kondoh, Tatsuhiko Sudo, Kaori Honda, Motoko Uchida, Teruo Hayashi, Hiroyuki Osada (Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】化合物アレイによるスクリーニングは、興味のあるタンパク質の小分子リガンドをハイスループットに探索するための有効な手法である[1]。我々が開発した化合物アレイは、PEG末端にジアジリン基を有するリンカーをスライドガラスに導入し、紫外線照射により化合物をリンカーに固定化するものである。この方法により天然物及び天然物誘導体を官能基非依存的に固定化することが可能となった。プロリンロッドをさらに連結させた長鎖リンカーを化合物アレイに導入したところ、p38αと特異的活性阻害剤であるSB203580との相互作用を感度よく検出できるようになった。さらにS/N比を向上させる目的で、種々のMPCポリマーをタンパク質処理時に添加し、最適なMPCポリマーの選択を行った。そして、改良した化合物アレイを用いて、p38αT106M変異体に特異的に結合する小分子の探索を行った。

【方法と結果】p38α活性阻害剤として汎用されているSB203580(SB)を固定化した化合物アレイを用いて、種々のMPCポリマー添加時におけるSBスポットのシグナル強度、バックグラウンド値を指標に、p38α結合小分子探索に最適なMPCポリマーの選択を行った。その結果、Lipidure®-BL1002（日油（株））が、バックグラウンドを低下させ、S/N比を劇的に向上させた。さらに、ゲートキーパーアミノ酸をThrからMetに変異させp38γおよびδを模倣したSB非感受性p38αT106Mでは、この条件下でもシグナルを検出することができず、SBとp38αとの特異的相互作用を化合物アレイ上で検出できることを証明した。そこで、特異的阻害剤が未報告のp38γおよびδ特異的阻害剤を探索するために、p38αとp38αT106M変異体のアレイデータを比較したところ、二つの化合物がp38αT106M変異体にのみ結合することが明らかになった。このように改良型化合物アレイを用いたスクリーニングは、アミノ酸置換変異体もしくは近縁のタンパク質を対照とすることにより、より効率的に特異的阻害剤を探索する手法として期待できる。

1. Minagawa, S., Kondoh, Y., *et al.*, *Biochem. J.*, **435**, 237-246 (2011).

Chemical array, p38 MAP Kinase, MPC polymer

講演番号：2A05a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ A校舎05会場

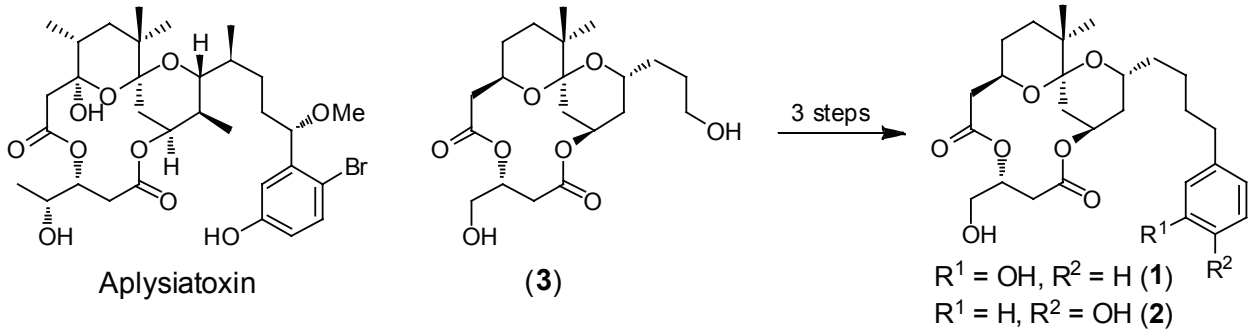
抗腫瘍性 Aplysiatoxin 単純化アナログの側鎖の構造活性相関を目的とした合成経路の確立

Establishment of a synthetic method of antineoplastic analog of aplysiatoxin for structure-activity studies of its side chain

○朱 裕姫，柳田 亮[1]，徳田春邦[2]，鈴木信孝[2]，入江一浩（京大院農，[1]香川大農，[2]金沢大院医）
○Yuki Shu, Ryo C. Yanagita, Harukuni Tokuda[1], Nobutaka Suzuki[1], Kazuhiro Irie (Kyoto Univ., [1]Kagawa Univ., [2]Kanazawa Univ.)

【目的】Protein Kinase C (PKC) は，細胞内情報伝達の鍵酵素であり，その異常な活性化はがん等の疾患の原因となっている．本研究グループは，海洋生物アメフラシから単離された発がんプロモーター・aplysiatoxin の骨格を利用し，PKC を標的とした新規抗がん剤リードとして **1** を開発した (*J. Am. Chem. Soc*. **2009**, *131*, 7573)．しかしながら，**1** の細胞増殖抑制活性を支配する構造因子には不明な点が多く，詳細な構造活性相関研究が必要である．特に側鎖構造の活性への寄与が大きいことから，本研究では **1** の側鎖構造の効率的変換を可能とする新規合成経路を確立し，従来法では合成困難であった水酸基の *p* 位置換体 **2** を合成し，活性評価を行なった．

【方法及び結果】化合物 **1** の側鎖の構造変換を容易にする目的で，鍵中間体 **3** からアルデヒドへの酸化，Wittig 反応，脱保護（還元反応）を用いて様々な側鎖を導入できる合成ルートを設計した．鍵中間体 **3** は，1,4-ブタンジオールを出発原料とし，**1** の合成法に準じて 18 段階で合成し（総収率 1.0%），**3** を経由して **1** を合成できることを確認した．次いで，フェノール性水酸基を *p* 位に持つ **2** の合成を試みた．化合物 **2** は，**1** の閉環段階における $KMnO_4$ によるアルケンの酸化開裂に *p*-ベンジロキシベンジル基が耐えないことから，**1** と同様の経路での合成が困難であった．しかしながら，今回確立した経路を用いることにより，**2** の合成に成功した．化合物 **2** の PKC アイソザイムへの結合能を，[^{3}H]phorbol 12,13-dibutyrate と PKC C1 ペプチドを用いた競合結合試験で評価した結果，PKC 各アイソザイムに対する結合能は **1** と同等であることが判明した．また，*in vivo* の発がんプロモーション活性と高い相関性を示す Epstein-Barr ウィルス早期抗原 (EBV-EA) 誘導試験においても，**2** は **1** と同様に EA をあまり誘導せず，発がんプロモーター・TPA による EA 誘導を顕著に阻害した．以上の結果から，側鎖のフェノール性水酸基の置換位置は，これらの活性にほとんど影響しないことが示唆された．化合物 **2** のがん細胞増殖阻害試験は現在検討中である．



Protein kinase C, Aplysiatoxin, Tumor promotion

講演番号：2A05a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ A校舎05会場

日本産フサコケムシに含まれるブリオスタチン類の同定と活性評価

Identification and biological activities of bryostatins isolated from Japanese bryozoan

○植野紗代，柳田　亮[1]，村上一馬，村上　明，徳田春邦[2]，鈴木信孝[2]，藤原健史[3]，入江一浩
（京大院・農，[1]香川大・農，[2]金沢大院・医，[3]OP-BIO Factory）
○Sayo Ueno, Ryo C. Yanagita[1], Kazuma Murakami, Akira Murakami, Harukuni Tokuda[2], Nobutaka Suzuki[2], Takeshi Fujiwara[3], Kazuhiro Irie (Kyoto Univ., [1]Kagawa Univ., [2]Kanazawa Univ., [3]OP-BIO)

【目的】Protein Kinase C (PKC) は細胞内情報伝達の鍵酵素であり，その異常な活性化はがんなどの疾患に関連している．海洋動物フサコケムシから単離された bryostatin 1 (bryo-1) は抗がん活性を示す PKC 活性化剤として注目されているが，天然からの単離収率が低く，合成も多段階を要することから，活性発現に必要な構造に関して不明な点が多い．本研究では，化学合成した PKC C1 ドメインを用いた本研究グループ独自のスクリーニング法により，日本産フサコケムシから bryo 類を単離・同定し，それらの生理活性評価を行なった．

【方法及び結果】福岡県今津で採集されたフサコケムシ (湿重量 6 kg) のクロロホルム/メタノール抽出物を溶媒分配し，酢酸エチル層 (26.5 g) を得た．これを bryo-1 の標的酵素の一つである PKCδ の C1B ドメインに対する結合能を指標にして，各種クロマトグラフィーにより分画した．PKCδ-C1B に対する結合能は，[^{3}H]PDBu の特異的結合の阻害によって評価した．その結果，bryostatin 4 (1.2 mg), 5 (0.3 mg), 8 (0.5 mg), 10 (2.3 mg), 14 (0.9 mg), 19 (0.3 mg) を単離・同定した．Bryo-4, 5, 8, 10 の日本産フサコケムシからの単離は，釜野らによる報告 (*J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1868) と一致するが，今回新たに bryo-14, 19 を同定できた．C 環の 20 位置換基の活性発現に及ぼす影響を明らかにする目的で，bryo-4, 10, 14 に着目し，各種活性評価を行なった．まず，全長 PKCδ に対する結合能及び活性化能を調べたところ，最も親水性が高い bryo-14 の活性が他の 2 つと比べてやや低かった．一方，エステル側鎖を持たない bryo-10 は bryo-4 と同等の活性を示し，20 位エステル側鎖は PKCδ の活性化に必要ないことが判明した．次に，発がんプロモーション活性と高い相関関係にある Epstein-Barr ウィルス早期抗原 (EBV-EA) 誘導試験を行なった結果，いずれも bryo-1 と同様ほとんど EA を誘導せず，発がんプロモーター・TPA による EA 誘導を顕著に阻害した．以上の結果は，bryo 類の C 環の 20 位側鎖は，これらの活性発現にほとんど寄与していないことを示唆している．

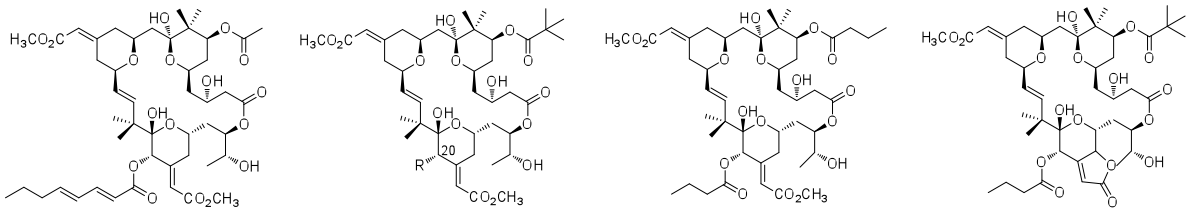


図　Bryo-1 および単離した bryo 類の構造．括弧内の値は Clog P 値を示す．

Protein kinase C, Bryostatin, Tumor promotion

講演番号：2A05a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ A校舎05会場

国内流通タイム(*Thymus suturoides*)に含有されるCYP阻害活性物質(第2報)

Effective cytochrome P450s (CYPs) inhibitors isolated from thyme (*Thymus saturoides*) purchased from a Japanese market. (Part 2)

○山里 実央、Zeineb Brahmi、松井 真央、大久保 将啓、草刈 悠奈、重藤 桜子、丹羽 瞳、菅谷 紘一、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東農大応生科・栄養）

○Mio Yamasato, Zeineb Brahmi, Mao Matsui, Masahiro Okubo, Yuna Kusakari, Sakurako Shigeto, Hitomi Niwa, Kouichi Sugaya, Jun-ichi Onose, Naoki Abe (Dept. of Nutr. Sci. , Faculty of Applied Bio. , Tokyo Univ. of Agri.)

【目的】

近年、疾病予防や健康維持・増進を目的として、さまざまな機能性を持つ食品が注目を浴びている。しかし、これら機能性食品は、薬物との相互作用を考慮することなく一般に広く用いられている。こういった機能性食品の広がりや高齢化の進行等により機能性食品と医薬品が併用される機会の増加が予想され、食品の機能性成分と医薬品の相互作用が懸念される。しかし、食品と医薬品の相互作用に関する報告は医薬品間の相互作用に関する報告数に比べ少ないのが現状である。そこで、様々な食材を用いて薬物代謝の主要酵素であるシトクロム P450(CYP)阻害活性をスクリーニングした結果、市販されているシソ科イブキジャコウソウ属タイムに強い阻害活性がみられた。タイムは肉料理などに用いられるほか、チュニジアなどの地域では咳や浸出性粘膜炎の民間療法に用いられている。本研究では、国内流通タイムに含有される CYP 阻害活性物質を明らかにし、その活性評価を行うことを目的とした。

【方法・結果】

CYP 阻害活性試験法としては、蛍光発色を利用した酵素活性測定法を用いた。タイム中・酸性画分の CYP3A4 に対する阻害活性試験において、IC_{50} 値 6.59±0.81 μg/ml を示したことから、Sephadex LH-20 やシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画後、分取用 TLC を用いて活性物質の精製を行い、主要活性物質として 8-methoxycisilineol (**1**)を単離し、報告した[1,2]。今回さらに 2 種の活性化合物質を単離し、NMR スペクトルを用いて化学構造を検討したところ、活性物質をポリメトキシフラボンである、cirsilineol (**2**)および 4',7-dihydroxy-5,6,8-trimethoxy flavone (**3**)と同定した。これら 2 つの化合物について、CYP3A4 に対して阻害活性試験を行った結果、IC_{50} 値が **2** は 7.62±0.1 μM、**3** は 4.92±0.4 μM を与えた。さらに他の CYP の主要なアイソザイムに対する阻害活性についても検討を行っている。

1) 2011 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p.19
2) Zeineb B., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* ,**75** (11), 110328-3 (2011)

cytochrome P450, Thyme, polymethoxyflavone

講演番号：2A05a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ A校舎05会場

Potent Mechanism-based Inhibition of Human P450 CYP3A4 and CYP2D6 *in vitro* by Tunisian Thyme, *Thymus algeriensis*

○Zeineb Brahmi, Hitomi Niwa, Mio Yamasato, Sakurako Shigeto, Yuna Kusakari, Kouichi Sugaya, Jun-ichi Onose, and Naoki Abe (Tounoudai)

The use of medicinal and aromatic plants has increased significantly despite of the lack of data about their efficacy and toxicology. These herbal medicines are often co-administrated with therapeutic drugs, and contain a number of phytochemicals that may be biologically active and capable of interaction with the human cytochrome P450 (CYPs).

The inhibitory effect of the extract of *Thymus algeriensis* and its phytochemical luteolin-3'-glucuronide (**1**) on CYP isoforms were determined using the Vivid CYP blue substrate. Compound **1** exhibited potent CYP inhibitory effect on three tested CYP isozymes specifically against CYP2D6 with IC_{50} values of 0.63 ± 0.09 μM which is higher than cimetidine, a known CYP2D6 inhibitor, showing IC_{50} value of 20.57 ± 6.90 μM. In addition, Compound **1** was potent mechanism-based inhibitor of CYP3A4 and CYP2D6 compared to the negative controls. Thus, the CYP3A4 inhibitory effect of compound **1** increased from 28.50 ± 1.35 μM (without pre-incubation) to 97.33 ± 0.54 μM (after 40 min of pre-incubation), and its CYP2D6 inhibitory effect increased from 15.08 ± 5.20 μM (without pre-incubation) to 86.81 ± 4.42 μM (after 40 min of pre-incubation).

These results suggest that co-administration of thyme with drugs that are metabolized by either CYP 3A4 or CYP 2D6 may potentially result in herb-drug interaction.

Human cytochrome P450, *Thymus algeriensis*, luteolin-3'-glucuronide

講演番号：2A05a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ A校舎05会場

二糖類のインスリン様作用に関する研究

Study about insulin mimetic activity of some disaccharides

○木村　太郎、山崎　一諒、飛鋪　亮吾、加藤　英介、川端　潤（北大院農）
○Taro Kimura, Kazuaki Yamasaki, Ryogo Hishiki, Eisuke Kato, Jun Kawabata (Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ.)

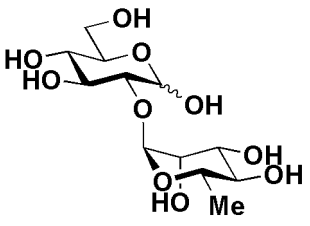
【目的】

フラボノイド配糖体がインスリン作用を有することがこれまでにいくつか報告されている。これらは*in vivo* において血糖値降下作用を示すことが報告されており、糖尿病の予防・治療に有用と考えられる。我々は*Cyathea phalerata* の茎から単離され、ナノモルレベルでの強力な活性を有することが報告されているKaempherol 3-neohesperidosideに注目し、構造活性相関研究を行った結果、部分構造である二糖 **1** のみでもインスリン様作用を示すことが明らかとなった。

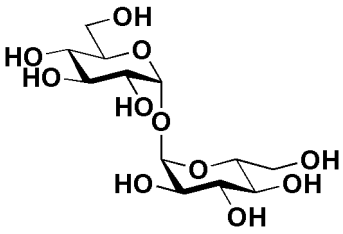
本研究では他の二糖類にも **1** と同様にインスリン様作用を有するものがあるのではと考え、複数の二糖類についてインスリン様作用の評価を行った。また、**1** のインスリン様作用がインスリン受容体を介しているかについて検討することとした。

【方法と結果】

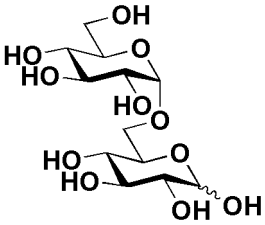
筋細胞モデルL6を用い、各種の二糖による刺激後の2-deoxyglucose取り込み量を指標にインスリン様作用を評価したところ、インスリン様作用を有する３つの新しい二糖(**2**, **3**, **4**)を見出した。また現在、分化したL6細胞を **1** で刺激後、インスリン受容体のリン酸化についてwestern blotting法を用いて検出し、**1** の作用がインスリン受容体を介しているかについて検討を行っている。



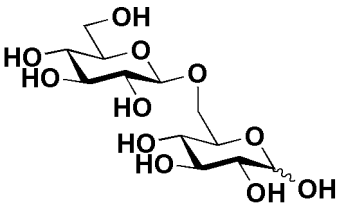
neohesperidose (**1**)



trehalose (**2**)



Isomaltose (**3**)



gentiobiose (**4**)

insulin mimetic, diabetic mellitus, glucose uptake

講演番号：2A05a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ A校舎05会場

フラボノイド-ネオヘスペリドース複合体のインスリン様活性に対するグリコシド結合の影響

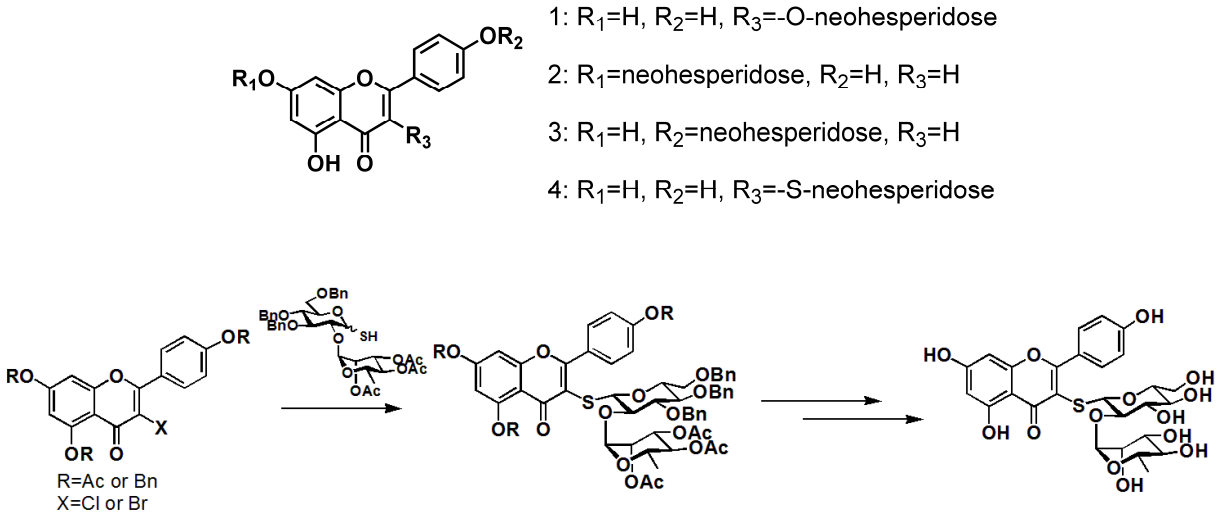
Effect of glycoside bond on insulin mimetic activity of flavonoid-neohesperidose conjugate

○飛鋪　亮吾、山崎　一諒、加藤　英介、川端　潤（北大院農）
○Ryogo Hishiki, Kazuaki Yamasaki, Eisuke Kato, Jun Kawabata (Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ.)

【目的】糖尿病は現在世界的に患者数が増加しており、深刻な問題となっている。その治療・予防には様々な薬剤や機能性食品が利用されているが、近年報告された kaempferol 3-*O*-neohesperidoside (**1**) はインスリンに依存せずに単独で細胞の糖取り込みを促す作用(インスリン様作用)を有し、新たな薬剤候補としての可能性が期待されている。当研究室ではこの化合物の構造活性相関研究を行い、糖部分である neohesperidose のみでもインスリン様作用を示すことを明らかとした。[1] また一方で分子内に部分構造単位として neohesperidose を有していてもインスリン様作用を示さない化合物もあり、**1** のインスリン様作用についても活性測定条件下で遊離した neohesperidose が示している可能性が示唆された。

本研究ではこの点について知見を得るために、各種類縁体の合成を行いその活性を調べることとした。

【結果】化合物**1**と同じフラボノイド骨格を持つが糖結合部位が異なる apigenin 7-*O*-neohesperidoside (**2**), apigenin 4'-*O*-neohesperidoside (**3**)を合成し、それらのインスリン様作用について検討を行った。その結果、これらは活性を示さないことを確認し、やはり遊離の neohesperidoseが活性本体である可能性が示唆された。しかし、立体障害が原因である可能性も完全には否定できない。そこでさらに確証を得るため、現在**1**と結合位置は同じだが、*S*-グリコシドをもつapigenin 3-*S*-neohesperidoside (**4**)を合成している(Scheme 1)。



Scheme 1. *S*-グリコシド体の合成

1. Yamasaki, K. et al. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 17-21.

Insulin mimetic, diabetes mellitus, flavonoid glycoside

講演番号：2A05a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ A校舎05会場

インスリン様作用を有する二糖ネオヘスペリドースの作用部位解析に向けた蛍光標識化研究

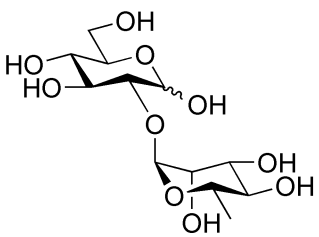
Synthesis of fluorescence labeled neohesperidose as a probe

○新田 貴大、加藤 英介[1]、川端 潤[1]（北大農・生機科、[1]北大院農・応生科）

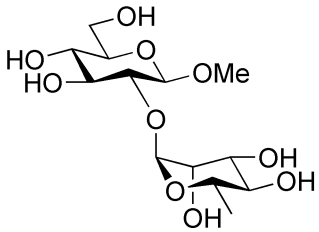
○Takahiro Nitta, Eisuke Kato[1], Jun Kawabata[1] (Fac. Agr. Hokkaido Univ., [1]Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ.)

【目的】インスリンは体内で血糖降下作用を示す唯一のホルモンであり、現代社会において深刻な問題となっている糖尿病の発症とその治療に密接に関与している。近年、フラボノイド配糖体 Kaempferol-3-*O*-neohesperidoside が単独で筋細胞に糖吸収を促進させる作用（インスリン様作用）を持つこと、及びその活性本体が糖部分の neohesperidose(**1**)であることが報告された。しかし低分子化合物である **1** が、分子量数千のペプチドホルモンであるインスリンと同様の活性をどのように示すのか、作用メカニズムについては未だ不明のままである。そこで、本研究はその作用メカニズム解明へのアプローチの一つとして、neohesperidose(**1**)の蛍光標識を行い、蛍光プローブとすることでその作用部位を可視化することを目指した。

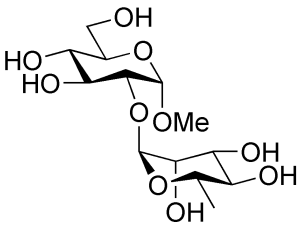
【方法と結果】化学修飾を施しても活性に影響を与えない部位を探索するため、特定の部位が化学修飾されたneohesperidose数種類を合成し、それらのインスリン様活性をL6細胞における2-deoxyglucose取り込み量の定量アッセイによりそれぞれ評価した。まず、最終生成物がアノマー混合物となることを防ぐ目的でβ1位及びα1位メトキシ体**2**、**3**の合成と活性評価から行った結果、**2**に活性が保持されている事が判明した。現在これを踏まえ、化合物**4**などの合成と活性評価を行い、蛍光基の導入可能部位を探索している。



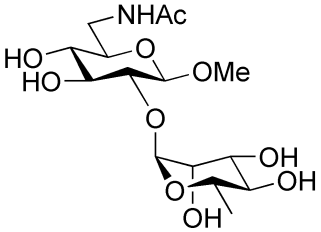
1



2



3



4

Insulin mimetic, Disaccharide, Fluorescent probe

講演番号：2A05a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ A校舎05会場

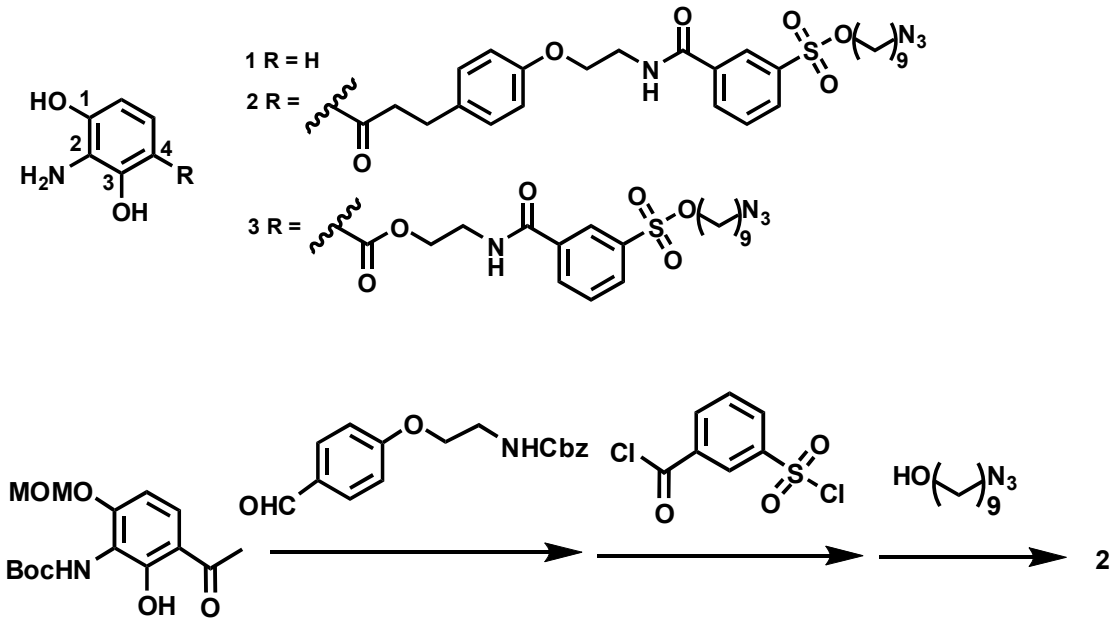
2-アミノレゾルシノールのα-グルコシダーゼ結合部位の解明に向けたプローブ分子の合成

Synthesis of 2-aminoresorcinol probe for elucidating the binding site of α-glucosidase

○辻　裕貴、及川　健一[1]、加藤 英介[1]、川端 潤[1]（北大農、[1]北大院農）
○Hiroki Tsuji, Kenichi Oikawa[1], Eisuke Kato[1], Jun Kawabata[1] (Fac. Agr. Hokkaido Univ., [1]Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ.)

【目的】α-グルコシダーゼ阻害剤は、食後の血糖値上昇を抑制するため糖尿病の治療薬として有用である。当研究室において、2-アミノレゾルシノール（1）がラット小腸α-グルコシダーゼ（マルターゼおよびスクラーゼ）を強力に阻害することが明らかになった。現在薬剤として使用されているボグリボースなどは糖と類似した構造をしており、α-グルコシダーゼを拮抗的に阻害する。一方、1は糖と構造が大きく異なり、またスクラーゼを不拮抗的に阻害することから、他の拮抗阻害剤とは作用部位が異なると考えられる。そこで本研究では、1の作用部位の解明に向けてプローブ分子を合成することを目的とした。

【方法・結果】1の構造活性相関研究により、ベンゼン環4位のアシル化又はアルコキシカルボニル化が1の活性に影響しないことが明らかになっている。そこで、プローブ2および3を設計、合成することにした。その際、ラベル化するための反応基としてトシル基を使用し、またタグとしてクリックケミストリーにより様々な機能性部位を導入できるアジド基を用いた。以下のスキームによって合成を行ったプローブ2は、1と同等の活性を示すことが確認され、現在これを利用して阻害部位近傍をラベル化し、酵素に対する1の作用部位の特定を行おうとしている。また、プローブ3についても現在合成を行っている。



scheme 1

glucosidase inhibitor, intestinal glucosidase, diabetes mellitus

講演番号：2A05a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ A校舎05会場

植物生長抑制作用を有する希少糖誘導体の親水性官能基が生物活性に与える影響

Role of hydrophilic functional groups of rare sugar derivatives with plant growth inhibitory effect

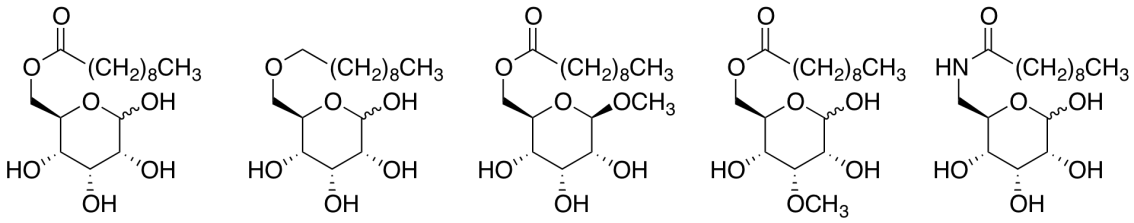
◯柳田 亮、山足 陽和、橋谷 矩史、川浪 康弘（香川大・農）
◯Ryo C. Yanagita, Haruka Yamaashi, Norifumi Hashitani, Yasuhiro Kawanami (Kagawa Univ.)

【目的】

D-Allose は，D-glucose の 3 位エピマーであり，天然に稀にしか存在しない希少糖の一種である．これまでの研究から，D-allose は植物生長抑制活性，がん細胞増殖抑制作用，抗酸化作用など様々な生理活性を示すことが明らかにされている．我々の研究グループはこれまでに，D-allose の 6 位アシル化誘導体が D-allose よりもワンオーダー程度高い植物生長抑制作用を示すことを報告している.[1] D-Allose 6 位アシル化体による植物生長抑制はジベレリン A_3 で回復するのに対して，D-allose ではこの回復が見られないことから，両者の作用機構は異なっていることが示唆されている. 本研究では, 6-*O*-decanoyl-D-allose (All-C10) のカルボニル基を除去した D-allose の 6-*O*-decyl 体 (**1**) を合成し，生物活性における本カルボニル基の役割を明らかにすることを目的とした.

【方法および結果】

化合物 **1** は，既知の出発物質より 3 段階で合成した．化合物 **1** は，レタスに対して All-C10 に匹敵する生長抑制活性を示した．この結果は、アシル基のカルボニル基ではなく、炭化水素鎖が All-C10 の高い植物生長抑制活性において重要であることを示唆している。さらに、All-C10 の 1 位ヘミアセタール基をメチルアセタールに変換した誘導体 (**2**) ならびに 3 位水酸基のメチル化体 (**3**)，エステル結合をアミド結合に変換した誘導体 (**4**) の植物生長抑制活性についても併せて報告する。



[1] Kobayashi, M. *et al*., *Biosci*. *Biotechnol*. *Biochem*. **2010**, *74*, 216.

Allose, Rare sugar, Plant growth

講演番号：2A05a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ A校舎05会場

酸化型タキシフォリンによるアミロイド β の凝集抑制機構

Suppression mechanisms of amyloid β aggregation by oxidized taxifolin

○佐藤瑞穂, 村上一馬, 井久保遥子, 片山寿美枝[1], 赤木謙一[1], 入江一浩
(京大院農・食生科, [1]医薬基盤研究所)

○Mizuho Sato, Kazuma Murakami, Haruko Ikubo, Sumie Katayama,[1] Ken-ichi Akagi,[1] and Kazuhiro Irie
(Grad. Agri., Kyoto Univ., [1] NIBIO)

【目的】アルツハイマー病 (AD) の原因物質である 42 残基のアミロイド β (Aβ42) は, 凝集することによって神経細胞毒性を示す. これまでに本研究グループは, 動物試験によってマリアアザミ種子の抽出物である silymarin に抗 AD 活性を見出し,[1)] その構成フラボノイドである (+)-taxifolin が Aβ42 凝集抑制活性を有することを明らかにした. また昨年の関西・中部支部合同大会において, (+)-taxifolin が空気酸化されて生成した酸化体 (*o*-キノン体) が Aβ42 の凝集抑制活性に関与していることを報告した.[2)] 本研究では, 酸化型 (+)-taxifolin による凝集抑制の作用機序を明らかにすることを目的として, 酸化型 (+)-taxifolin の Aβ42 の二次構造への影響ならびにその作用部位を調べた.

【方法と結果】 Aβ42 (25 μM) と (+)-Taxifolin (50 μM) をリン酸バッファー (pH 7.4) 中, 37 °C でインキュベーションし, Aβ42 の二次構造の変化を CD スペクトルにて経時的 (0, 4, 8, 24, 48 時間) に測定したところ, β-シート形成速度が顕著に減少し, 酸化剤である $NaIO_4$ (100 μM) を加えるとさらに減少した. 48 時間インキュベーション後の反応液を電子顕微鏡にて観察したところ, (+)-taxifolin 存在下で形成されるフィブリルは, Aβ42 のみで形成されるものに比べて細く, 断片化していた. ところで, フラボノイドの酸化体は, 求核性アミノ酸残基と共有結合を形成することによりタンパク質の機能を阻害することが報告されている.[3)] このことから, 酸化型 (+)-taxifolin が Aβ42 の Arg5, Lys16 または Lys28 と 1,4-付加あるいはシッフ塩基を形成することで凝集を抑制していることが予想された. そこで, Aβ42 に (+)-taxifolin および $NaIO_4$ を添加し, リン酸バッファー中, 37 °C で 4 時間反応させた溶液を, LC-MS にて分析した結果, Aβ42 と酸化型 (+)-taxifolin との 1,4-付加体と考えられるピークが検出された. 以上の結果から, Aβ42 は酸化型 (+)-taxifolin と付加体を形成し, β-シート構造を取りにくくすることで凝集を抑制する可能性が示唆された. 現在, Aβ42－(+)-taxifolin 付加体の詳細な MS 解析を行っている.

【参考文献】

1) Murata, N. *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2010**, *74*, 2299.
2) 佐藤瑞穂ら, 2011 年度日本農芸化学会関西・中部支部合同大会講演要旨集, p71.
3) Zhu, M. *et al*., *J. Biol. Chem*. **2004**, *279*, 26846.

Alzheimer's disease, Amyloid β, Flavonoid.

講演番号：2A05p01
講演日時、会場：3月23日13:49～ A校舎05会場

カイコ細菌感染症モデルを用いて治療効果を指標に単離した新規抗生物質、カイコシンの構造と作用機構解析

Structure and mode of action of novel antibiotic, Kaikosin isolated by using the silkworm infection model.

○浦井 誠[1]、浜本 洋[1]、Atmika Paudel[1]、村上 和久[2]、堀江 亮[1]、浜瀬 健司[3]、関水 和久[1,2]
([1]東大院・薬、[2]ゲノム創薬研究所、[3]九大院・薬)
○Makoto Urai[1], Hiroshi Hamamoto[1], Atmika Paudel[1], Kazuhisa Murakami[2], Ryo Horie[1], Kenji Hamase[3], Kazuhisa Sekimizu[1,2]
([1]The Univ. of Tokyo, [2]Genome Pharmaceuticals Institute Co., Ltd., [3]Kyushu Univ.)

これまでの抗生物質探索では、試験管内で抗菌活性を示す物質を探索し、その後、哺乳類の感染症モデルで治療効果を確認するという手法でおこなわれてきた。しかし、試験管内で抗菌活性を示す化合物のほとんどは、体内動態の悪さや毒性などの問題から、治療効果を示さない。従って、治療効果を指標としたスクリーニング系が有用であると考えられるが、哺乳類モデルにはコストや倫理的な問題がある。

われわれはこれまで、より簡便で多数の個体が使用可能なカイコ幼虫に着目し、カイコ幼虫が黄色ブドウ球菌等のヒトに対する病原性菌の注射により殺傷され、臨床で使用されている抗生物質の投与によって治療されること、その治療に必要な体重あたりの治療必要量は哺乳類での値と一致していることを明らかにしてきた。

そこで実際にこの系を用いて、土壌細菌培養液から黄色ブドウ球菌感染に対する治療効果を指標に抗生物質の探索・精製を試みてきた結果、新規抗生物質、カイコシンを見出した。カイコシンは、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対しても抗菌活性を示し、また、黄色ブドウ球菌感染マウスでも治療効果を示した。この構造についてNMRやMS、キラルHPLC分析等を組み合わせて解析した結果、新規のリポペプチド系抗生物質であり、絶対配置を含む全構造を決定した。さらに、その作用機構についても解析したので報告する。

antibiotic, Kaikosin, silkworm

講演番号：2A05p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ A校舎05会場

HL60細胞における山菜由来のエンドパーオキサイド化合物のアポトーシス誘導メカニズム

Mechanism of apoptosis induction in HL60 cells by the endoperoxide compound from edible wild plants

○坂本 良美、上杉 祥太、土屋 英子[1]、長田 裕之[2]、木村 賢一（岩手大院・農、[1]広島大院・先端物質、[2]理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

○Yoshimi Sakamoto, Shota Uesugi, Eiko Tsuchiya[1], Hiroyuki Osada[2], Ken-ichi Kimura (Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [1]Grad. Sch. Adv. Sci. Matt., Hiroshima Univ., [2]Chem. Biol., RIKEN ASI,)

【目的】3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene（EDBD）は、遺伝子変異酵母（*cdc2-1 rad9*Δ）の表現型を用いてキク科山菜のシドケ（モミジガサ）およびボウナ（ヨブスマソウ）から単離したビサボラン型セスキテルペン化合物である。EDBDは、ヒト急性前骨髄性白血病細胞HL60に対して、カスパーゼ活性化による核の断片化およびDNA断片化を伴うアポトーシス様細胞死を誘導し、担癌マウスへの単独投与により腫瘍増殖を抑制する。これまでに、EDBDの最大の特徴であるエンドパーオキサイド構造が$FeSO_4$存在下において開裂し、この構造変換時に生じるラジカル中間体がEDBD誘導細胞死に重要であることを明らかにしてきたが、EDBDがどのような細胞内シグナルにより細胞死を誘導しているかは未解明である。そこで、本研究ではHL60細胞におけるEDBD誘導細胞死のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】EDBDの標的分子を明らかにするために、光親和型固定化法によるアフィニティークロマトグラフィーを用いて、EDBDの結合タンパク質を解析した。コントロールビーズとEDBDを固定化したビーズのそれぞれにHL60細胞のcell lysateを供した結果、EDBDに特異的な結合タンパク質を得ることはできなかった。

そこで、各種MAPK阻害剤（SB203580（p38 MAPK inhibitor）、SP600125（JNK inhibitor）、PD98059（ERK inhibitor））を用いてEDBDが誘導するDNA断片化を調べたところ、SB203580でのみ阻害が認められた。続いて、ウエスタンブロットを用いてそれぞれ（p38、JNK、ERK）のタンパク質発現とリン酸化について調べた結果、EDBD添加によりp38が濃度および時間依存的にリン酸化の増加が認められた。また、JNK、ERKについては一定の効果が得られなかった。このことから、EDBD誘導細胞死にはp38のリン酸化が関与していることが示唆された。

さらに、アポトーシスに関わるシグナル経路のタンパク質発現について、ウエスタンブロットを用いて解析した。発光基質を用いた場合と同様にカスパーゼ8、カスパーゼ9、およびカスパーゼ3の活性化、並びにPARPの切断が濃度および時間依存的に起こっており、全カスパーゼ阻害剤存在下において、EDBDによるDNAの断片化が抑制されていた。したがって、EDBD誘導細胞死にはカスパーゼ経路の活性化が関与していることが示唆された。また、Bid 並びにBax の切断が濃度および時間依存的に起こっていたことから、外因性並びに内因性経路の両経路を活性化していることが示唆された。

3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene, anti-tumor, MAPK

講演番号：2A05p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ A校舎05会場

久慈産琥珀由来の新規Ca^{2+}シグナル伝達阻害物質kujigamberolのHL60細胞に対する生物活性

Biological activity of a new Ca^{2+}-signal transduction inhibitor, kujigamberol, isolated from Kuji amber against HL60 cells

○南川 裕樹、叶 躍奇[1]、高橋 俊哉[1]、越野 広雪[1]、新田 久男[2]、宮川 都吉[3]、木村 賢一（岩手大院・農、[1]理研・基幹研、[2]久慈琥珀（株）、[3]広島大院・先端物質）

○Yuki Minamikawa, Yue Qi Ye[1], Shunya Takahashi[1], Hiroyuki Koshino[1], Hisao Shinden[2], Tokichi Miyakawa[3], Ken-ichi Kimura (Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [1]RIKEN, ASI, [2]Kuji Kohaku Co. Ltd., [3]Grad. Sch. Adv. Sci. Matt., Hiroshima Univ.)

【目的】琥珀は、太古の松柏科植物の樹脂が地中に埋没し、長い年月を経て化石化したものである。装飾品としての利用の他、ロシアでは医療、日本では美容の分野で用いられているが、その生物活性を指標とした琥珀の成分探索研究はほとんど報告されていなかった。我々は、Ca^{2+}超感受性の遺伝子変異酵母（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）を用いた生育円を指標としたスクリーニングにより、岩手県久慈産琥珀（8500万年前）からノルラブダン型新規化合物kujigamberol(15,20-dinor-5,7,9-labdatriene-18-ol) を見出し、全合成にも成功している。しかし、kujigamberolの詳細な生物活性やその標的分子は不明であることから、酵母と細胞を用いた構造活性相関、並びにウエスタンブロットによるHL60細胞でのタンパク質発現を調べ、標的分子にせまることを目的とした。

【方法・結果】全合成によって得られた(*R*)及び(*S*)-kujigamberolとその類縁体を用いて遺伝子変異酵母に対する生育円活性を調べた結果、kujigamberolの8または9位の炭素に結合するアルキル基が生育円活性に重要であり、4位の絶対立体配置及びメチル基は生育円活性に影響しないことが示唆された。また、ラブダン型ジテルペノイドは広く抗がん活性が報告されていることから、kujigamberolとその類縁体のHL60細胞に対する細胞毒性活性をMTT法により調べたところ、(*R*)及び(*S*)-kujigamberolはHL60細胞に対して細胞毒性活性（IC_{50}=19.6 μM、24.0 μM）を示し、生育円活性と同様の活性を示した。また、kujigamberolのアポトーシス誘導活性を蛍光顕微鏡観察及びアガロースゲル電気泳動法により調べた結果、kujigamberolはクロマチンの凝縮並びに時間及び濃度依存的なDNA断片化を引き起こした。そこで、kujigamberolのHL60細胞内カスパーゼの活性化作用を、カスパーゼ基質を用いた化学発光法により調べた結果、kujigamberolはカスパーゼ3/7、8及び9を2時間から時間依存的に活性化し、50 μMから濃度依存的に活性化した。また、広域カスパーゼ阻害剤z-VAD-fmk処理によりkujigamberolのDNA断片化作用が抑制されたことから、kujigamberolの細胞毒性活性はカスパーゼ依存的なアポトーシス誘導によるものである可能性が示唆された。そこで、アポトーシスのシグナル伝達経路に関与するタンパク質発現量をウエスタンブロット法で調べたところ、60 μMのkujigamberol処理においてBax及びBcl-2の発現量は変化しなかった。現在、kujigamberolの詳細な作用経路について検討している。

Kuji amber, kujigamberol, Ca^{2+}-signal transduction

講演番号：2A05p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ A校舎05会場

酵母ユビキチンリガーゼRsp5変異株を用いた新規スクリーニング系の検討

Study on a novel screening method using the yeast ubiquitin ligase Rsp5 mutant

○上杉 祥太[1]、喜多島 萌[2,3]、川村 悠実[2]、高木 博史[3]、木村 賢一[1,2]（[1]岩手大院・農、[2]岩手大・農、[3]奈良先端大・バイオ）

○Shota Uesugi[1], Moe Kitajima[2,3], Yumi Kawamura[2], Hiroshi Takagi[3], Ken-ichi Kimura[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [2]Fac. of Agri., Iwate Univ., [3]Grad. Sch. of Biol. Sci., NAIST)

【目的】一般に細胞は、温度、pH、栄養飢餓、化学物質など種々のストレス環境に適応する機構を備えているが、長時間または複合的なストレスが負荷されると、細胞内で構造や機能が異常となったタンパク質が蓄積し、生育阻害や細胞死が誘導される。真核生物のモデルである酵母*Saccharomyces cerevisiae*のHECT型ユビキチンリガーゼRsp5変異株（$rsp5^{A401E}$）は、各種ストレスに対し感受性を示すことから、ストレス環境下で$rsp5^{A401E}$を生育させる作用を持つ化合物は、酵母のストレス適応機構に関わる機能、さらにはヒトの生体機能に対する活性を有することが期待される。そこで本研究では、$rsp5^{A401E}$を用いてストレス環境下での生育円活性という表現型を利用し、新たな生理活性物質の探索方法を確立することを目的とした。

【方法・結果】スクリーニングには、$rsp5^{A401E}$が特に高い感受性を示し、かつ操作が簡便な高温ストレス（37℃）を用いた。また、酵母を3.5×10^5 cells/mlの細胞密度に調整後、37℃、30時間の高温ストレスに曝し、28℃で2日間培養した後の生育円活性（大きさと表現型）を測定した。次に、本スクリーニング系で得られる物質を推定するため、抗癌剤を中心に標的分子が明らかな285種の化合物を含む阻害剤キットをスクリーニングに供した。その結果、calcineurin阻害活性を有する免疫抑制剤であるFK506とcyclosporin A、およびMdm2阻害剤である*trans*-4-iodo-4’-boranyl-chalcone（TIBC）の3種類が、高温ストレスに曝した$rsp5^{A401E}$に対してのみ特異的に生育円活性を示すことが明らかとなった。我々は、これまで酵母の各種遺伝子変異株の生育円を利用したスクリーニング系を行い、Ca^{2+}シグナル伝達に関わる遺伝子の変異株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）を用いてFK506とcyclosporin Aを検出しているが、$rsp5^{A401E}$を用いたスクリーニングにおいて新たにヒトのMdm2を標的とする化合物が検出された。Mdm2阻害剤であるTIBCは、$rsp5^{A401E}$に対して0.25μg/disc以上で濃度依存的に生育円活性を示す。Mdm2は癌抑制遺伝子産物p53を基質とするヒトのRING型ユビキチンリガーゼであるため、その阻害剤は新たな抗癌剤の標的となることが期待されている。そこで、ヒト乳腺癌細胞でp53が正常なMCF7と異常なMDA-MB-231に対するTIBCの細胞毒性をMTTアッセイにて測定した。その結果、それぞれのIC_{50}値は12.0、40.5μMを示し、特に前者に対する感受性が高かったことから、本スクリーニング系においてMdm2阻害活性を有する抗癌剤候補化合物を検出できる可能性が示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, ubiquitin ligase Rsp5, Mdm2 inhibitor

講演番号：2A05p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ A校舎05会場

ハンカチノキ（*Davidia involucrata*）に含まれる生物活性物質の構造と活性

Structures and biological activities of biological active substances isolated from *Davidia involucrata*.

○木村 賢一[1,2]、川村 悠実[1]、上杉 祥太[2]、久保田 辰徳[1]、奥田 恵子[1]、渡辺 牧子[1]、越野 広雪[3]、米山 操[3]、伊藤 昭博[3]、吉田 稔[3]（[1]岩手大・農、[2]岩手大院・農、[3]理研・基幹研）

○Ken-ichi Kimura[1,2], Yumi Kawamura[1], Shota Uesugi[2], Tatsunori Kubota[1], Keiko Okuda[1], Makiko Watanabe[1], Hiroyuki Koshino[3], Misao Yoneyama[3], Akihiro Ito[3], Minoru Yoshida[3]（[1]Fac. of Agri. Iwate Univ., [2]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [3]RIKEN ASI.）

【目的】ハンカチノキ(*Davidia involucrata*)は、南西中国原産のミズキ科（ハンカチノキ科）の落葉高木であり、4～5月に花の周りを2枚の大きさが異なる葉のような白色の苞が囲むユニークな植物である。そこで、各種スクリーニング系を用いて、ハンカチノキに含まれる新たな生物活性物質を探索することを目的とした。

【方法】ハンカチノキの葉を乾燥後メタノール抽出、酢酸エチル抽出後、Diaion HP20に供して活性物質を吸着させ、50%メタノールで溶出させた。HPLC（ODS、14% CH_3CN-0.1% CH_3COOH）分析にて、AとBの2成分が認められたため、A成分は単離精製してMSやNMRにより構造同定を行った。また、B成分はその特徴的なUVにより推定した。Prolyl oligopeptidase (POP：EC3.4.21.26))反応は、*Flavobacterium*由来のPOPと合成基質Z-Gly-Pro-*p*NAを用いて410nmの吸光度測定により行った。また、SUMO（Small Ubiquitin-like Modifier）化反応は、ジギトニン処理した細胞にE1、E2、およびGFPと融合させた野生型SUMOを添加し、ATP存在下で生じるGFP-SUMOの蛍光シグナルを観察した。また、*in vitro*の反応は、SUMO化タンパク質であるRanGAP1を基質としたウエスタンブロットにて行った。

【結果・考察】ハンカチノキの葉のメタノール抽出物(10 mg/ml)に、POPとSUMO化反応阻害が認められた。そこで、POP阻害活性を指標に活性物質を単離精製し、その途中でSUMO化阻害も調べ同一物質かを確かめながら行った。単離精製したA物質は茶褐色粉末として得られ、HR-FAB-MSより分子量938、分子式$C_{41}H_{30}O_{26}$が推定され両方の阻害活性を有していた。分子量の大きさに比べ、NMRシグナルは非常に単純なシグナルを示した特徴から、既に各種レセプター阻害活性が知られているエラジタンニンのdavidiinであることが明らかとなった。DavidiinのPOP阻害のIC_{50}は0.025 μMであり、阻害形式はDixon-plotにより非拮抗阻害であった。また、同時に*in vitro* のSUMO化阻害活性もIC_{50}=0.15 μMを示し、これまでの阻害剤の中で最も強力な活性であった。一方、B物質はその特徴的なUVからellagic acid（$C_{14}H_6O_8$：302）と推定されたため、市販品との比較により同定したが、その活性はdavidiinよりも弱かった。現在、がん細胞に対する影響についても調べている。

Davidiin, prolyl oligopeptidase、SUMO

講演番号：2A05p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ A校舎05会場

中国産食用茸ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有vialinin類のKU812細胞におけるTNF-α発現阻害活性に関する研究

Inhibitory effects on TNF-α appearance of vialinins, isolated from Chinese edible mushroom *Thelephora vialis*, in KU812 cells

○飯田 恭兵、和田 真実、矢嶋 俊介[1]、矢島 新[2]、越野 広雪[3]、菅谷 紘一、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東農大応生科・栄養、[1]東農大応生科・バイオ、[2]東農大応生科・醸造、[3]理研）

○kyo-hei Iida, Mami Wada, Shunsuke Yajima[1], Arata Yajima[2], Hiroyuki Koshino[3], Kouichi Sugaya, Jun-ichi Onose, Naoki Abe (Dept. of Nutr. Sci., Faculty of Applied Bio.,Tokyo Univ. of Agri., [1]Dept. of Bio. Sci., Faculty of Applied Bio.,Tokyo Univ. of Agri., [2]Dept. of Fermen. Sci., Faculty of Applied Bio.,Tokyo Univ. of Agri., [3]RIKEN)

【目的】*T. vialis*乾燥子実体より単離されたvialinin類は、抗原抗体反応により刺激したラット好塩基球細胞株RBL-2H3細胞において、強力なTNF-αの産生抑制作用を有することを明らかにした [1)]。本研究では、ヒト好塩基球様細胞株KU812細胞を用いた生理活性試験に供することにより、vialinin類がヒト培養細胞においてもRBL-2H3細胞と同様、TNF-α発現阻害活性を有するのかについて検討した。

【方法･結果】アレルギー症状に対するvialinin類の抑制効果を検討するため、KU812細胞に対し、1時間のA23187/PMAによる非免疫的刺激及びIgE感作による免疫的刺激後、vialinin類で処理を行うことにより脱顆粒に伴い放出されるヒスタミン量の変化を蛍光法により測定した。一方、同様に刺激後、vialinin処理を行った細胞に対し、刺激16時間後に放出された炎症性サイトカインTNF-αに対する発現抑制効果をELISA法により検討した。A23187/PMAによる非免疫的刺激に対し、vialinin類は種の違いに寄らずRBL-2H3細胞と同様KU812細胞でも脱顆粒抑制効果を示さなかった。一方、IgE刺激によるTNF-α発現に対しvialinin類は、RBL-2H3細胞においてと同様、濃度依存的にTNF-α発現を阻害し、陽性対照であるタクロリムス以上に強力な阻害活性を示した。現在、より詳細なKU812細胞での活性発現に対する検討を行っている。

1) Jun-ichi ONOSE et al, *Biol. Pharm. Bull.*, **2008, 31,** pp 831-833

vialinins, KU812 cells, TNF-α

講演番号：2A05p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ A校舎05会場

ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有TNF-α発現阻害物質vialinin Aの蛍光プローブを用いたRBL-2H3細胞における標的分子の探索法の検討

Study on a search method for target molecules of vialinin A, potent inhibitor of TNF-α appearance isolated from *Thelephora vialis*, in RBL-2H3 cells using fluorescent probe

○吉岡泰淳、叶躍奇、矢嶋俊介[1]、矢島新[2]、越野広雪[3]、高橋俊哉[3]、谷口佳代子[2]、岡田潔[1]、菅谷紘一、小野瀬淳一、阿部尚樹（東農大・応生科・栄養、[1]東農大・応生科・バイオサイエンス、[2]東農大・応生科・醸造、[3]理研）

○Yasukiyo Yoshioka, Yue-Qi Ye, Shunsuke Yajima, Arata Yajima, Hiroyuki Koshino[1], Shunya Takahashi[1], Taniguchi Kayoko, Kiyoshi Okada, Kouichi Sugaya, Jun-ichi Onose, Naoki Abe (Dept. of Nutr. Sci., Faculty of Applied Bio.,Tokyo Univ. of Agri., [1]Dept. of Bio. Sci., Faculty of Applied Bio.,Tokyo Univ. of Agri., [2]Dept. of Ferment. Sci., Faculty of Applied Bio.,Tokyo Univ. of Agri., [3]RIKEN)

【目的】*T. vialis*乾燥子実体含有のvialinin Aが、抗原刺激RBL-2H3細胞において強力な炎症性サイトカインTNF-α発現阻害活性を持つことを見出した。Vialiin Aの細胞中での活性発現メカニズムを解明するため、新たに開発した蛍光プローブを用いる方法によりvialinin Aの細胞内の挙動及び細胞内標的分子を明らかにすることを目的とした。

【方法】Vialinin Aの基本骨格であるポリハイドロキシパラテルフェニル基にクマリニル基(Ex/Em 360/420 nm)を蛍光発色団とした複数の蛍光プローブを合成した。それぞれの蛍光プローブを細胞培養液中に添加し、細胞内への取り込み並びに細胞内の局在性を確認した。さらに、細胞内標的分子と結合させ、これを抽出した。電気泳動を行い、360 nmの光により励起して蛍光を発するプローブの結合した分子を特定し、PMF方法により標的分子の同定を行う。

【結果】培養液中でもintactな状態で存在することの出来る蛍光プローブを開発し、蛍光顕微鏡観察により、細胞内への取り込み及び蛍光プローブの局在化を確認した。この結果はvialinin Aの標的分子が細胞内の局所に存在することを示唆した。さらに、蛍光プローブ処理細胞から細胞内分子を抽出し、SDS-PAGEで分画したところ、蛍光を発する複数のスポットが検出された。現在、そのスポットを切り出し、MALDI-TOFMSで解析することにより分子の同定を試みている。

vialinin A, TNF-α, *Thelephora vialis*

講演番号：2A05p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ A校舎05会場

中国産食用茸ツブイボタケ(*Thelephora vialis*)含有vialinin類によるT細胞サイトカイン産生制御に関する研究

Regulation of cytokine production by vialinins, isolated from Chinese edible mushroom *Thelephora vialis*, in T cell

○関谷 文葉、矢嶋 俊介[1]、矢島 新[2]、越野 広雪[3]、菅谷 紘一、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東農大応生科・栄養、[1]東農大応生科・バイオ、[2]東農大応生科・醸造、[3]理研）

○Fumiyo Sekiya, Shunsuke Yajima[1], Arata Yajima[2], Hiroyuki Koshino[3], Kouichi Sugaya, Jun-ichi Onose, Naoki Abe (Dept. of Nutr. Sci., Faculty of Applied Bio., Tokyo Univ. of Agri., [1]Dept. of Bio. Sci., Faculty of Applied Bio., Tokyo Univ. of Agri., [2]Dept. of Ferment. Sci., Faculty of Applied Bio., Tokyo Univ. of Agri., [3]RIKEN)

【目的】ツブイボタケ乾燥子実体に含有されるvialinin類は、RBL-2H3細胞において特異的かつ強力なTNF-α発現阻害活性を示したことから、抗炎症作用を有する可能性が示唆された。また、アレルギー性疾患にはT細胞のバランスが関与することが知られている。そこで本研究では、vialinin類がT細胞制御に与える影響についてマウス脾臓細胞を用いて検討するとともに、さらに網羅的な転写レベルにおける発現制御を、DNAマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析により検討することを目的とした。

【方法・結果】OVA感作させたBALB/cマウスの脾臓細胞をvialinin AおよびBで処理し、培養後、フローサイトメトリー解析を行った。染色標識抗体には、Th1およびTh2細胞それぞれの転写因子であるT-betおよびGATA-3を用いた。その結果、vialinin類処理はTh1細胞に対してあまり影響を及ぼさず、Th2細胞のみ減少させる傾向が認められた。過去のELISA法を用いた研究結果においても、vialinin類はTh2由来のサイトカインであるIL-4、IL-5、IL-10の産生抑制を示すものの、Th1由来のサイトカインIL-2、IFN-γに対しては影響を示さず、IL-12に関しては逆に抑制効果を示すという結果が得られている。このことから、vialinin類はTh1/Th2バランスを正常に戻すというよりも、選択的に特定のサイトカインの産生を抑制する作用を持つことが示唆された。

また、マウス脾臓細胞をvialinin類で処理し、RNAを抽出後、DNAマイクロアレイを用いた網羅的解析を行った。スキャッタープロット解析の結果、陽性対象に比べvialinin類処理により、多くのmRNA発現量に変化が見られた。炎症性サイトカイン等を抑制する傾向が見られたことから、現在詳細な解析を行っている。

vialinins, flow cytometry, DNA microarray

講演番号：2A05p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ A校舎05会場

Trichoderma sp. USF-2690産生生理活性物質bisorbicillinolのDNAマイクロアレイを用いたTNF-α発現阻害活性の解析

Analysis of inhibitory activity for TNF-α appearance of bisorbicillinol, a biological compound isolated from *Trichoderma* sp. USF-2690, with a DNA microarray.

○野中 美寿々、中島 希望、原口 菜央、清水 寛之、菅谷 紘一、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東農大応生科・栄養）

○Misuzu Nonaka, Nozomi Nakajima, Nao Haraguchi, Hiroyuki Shimizu, Kouichi Sugaya, Jun-ichi Onose, Naoki Abe (Dept. of Nutr. Sci.,Faculty of Applied Bio.,Tokyo Univ. of Agri.)

【目的】*Trichoderma* sp. USF-2690の産生する主要なビソルビシリノイドであるbisorbicillinolが、強いDPPHラジカル捕捉活性及び抗アレルギー活性を有することを明らかにしてきた。さらに転写レベルにおけるPKCなどのmRNA発現量の解析から、bisorbicillinolは炎症性サイトカインTNF-αの産生を阻害するのではなく放出を阻害する可能性が示唆された[1)]。本研究では遺伝子発現変動をDNAマイクロアレイにより網羅的に解析し、その発現阻害メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】*Trichoderma* sp. USF-2690の培養菌液から各種クロマトグラフィーを用いてbisorbicillinolを要時調製し、一方、RNAサンプルは、抗DNP-IgE抗体によって感作させたRBL-2H3細胞にbisorbicillinolを処理後、DNP-BSAにて刺激しtotal RNAを抽出し調製した。これらを用い逆転写後のcDNAをDNAマイクロアレイに供し、網羅的に遺伝子発現の変動を比較解析した。

【結果】活性化細胞に比べbisorbicillinol添加では、抗原処理30分後においては炎症性サイトカインを含むシグナル伝達因子のmRNA発現の抑制がみられた。抗体処理3時間後においても炎症性サイトカイン類等のmRNA発現の抑制がみられた。これらの結果は、bisorbicillinolによるTNF-α発現阻害は、種々のサイトカインネットワークによるシグナル伝達物質の抑制によることが示唆された。現在、パスウェイ解析によりさらに詳細な検討を行っている。

1) 清水ら、日本農芸化学会2009年度大会要旨集（p.15）

Bisorbicillinol, TNF-α, DNA microarray

講演番号：2A05p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ A校舎05会場

中国産食用茸コウタケ（*Sarcodon aspratus*）に含有される生体機能調節物質

Effective Bioactive Compounds Isolated from *Sarcodon aspratus*.

○柿本 菜月、大橋 薫、清塚 洋美、有里 優、叶 躍奇、越野 広雪[1]、菅谷 紘一、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東農大応生科・栄養、[1]理研）

○Natsuki Kakimoto, Tsutomu Ohashi, Hiromi Kiyozuka, Yu Arisato, Yue-Qi Ye, Hiroyuki Koshino[1], Kouichi Sugaya, Jun-ichi Onose, Naoki Abe (Dept. of Nutr. Sci., Faculty of Applied Bio., Tokyo Univ. of Agri., [1]RIKEN)

【目的】中国産食用茸コウタケ（*Sarcodon aspratus*）より、強いDPPHラジカル捕捉活性を有する複数の紫色物質を単離した。^{1}Hおよび^{13}C-NMRのスペクトルデータを基に文献検索を行った結果、2004年に発見され、2010年に構造訂正されたsarcoviolin類混合物と類似のスペクトルを与えることが示された。本研究では、これらsarcoviolin類縁化合物の構造解析を行うことと共に、それらの生体調節機能について、PC-12細胞を用いて検討することを目的とした。
【方法】中国産食用茸コウタケの乾燥子実体を80%含水アセトンで抽出し、その抽出物を溶媒分画により中・酸性画分を得た。ついで、Sephadex LH-20（メタノール）を用いたクロマトグラフィーにより分画した。DPPHラジカル捕捉活性の見られた画分をODSクロマトグラフィーにより精製し、さらに分取HPLCを用いて紫色4種の物質を単離した。NMRおよびMSスペクトルによる機器分析により構造を検討した。生体調節機能の評価は、過酸化水素による酸化ストレスを指標としたPC-12細胞に対する細胞増殖活性および細胞障害活性により検討した。
【結果】単離された紫色物質のうち2種は、スペクトル解析によりそれぞれsarcoviolin αおよびepisarcoviolin αと同定した。これまでsarcoviolin類はsarcoviolin αおよびepisarcoviolin αの2種類が報告されているのみであることから、今回単離した残り2種の紫色物質は既知のsarcoviolin類とのNMRスペクトルの類似性から、新規化合物である可能性が高いことが示唆された。過酸化水素によるPC-12細胞への酸化ストレスに対するepisarcoviolin αの影響を細胞増殖活性および細胞障害活性により評価した結果、濃度依存的に酸化ストレスより細胞を保護する傾向が認められた。Sarcoviolin類縁化合物によるPC-12細胞に対するさらなる効果についても現在検討中である。

Sarcodon aspratus, sarcoviolins, PC-12 cells

講演番号：2A05p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ A校舎05会場

ツバキ種子エキス由来サポニンによる正常ヒト皮膚繊維芽細胞への影響

Effect of some camelliasaponin components of *Camellia Japonica* on human dermal fibroblasts

○史 文磊、野崎 勉、吉田 祐理子、秋本 亮、船曳 涼子、石原 健夫
（ビーエイチエヌ株式会社）
○Wenlei Shi, Tsutomu Nozaki, Yuriko Yoshida, Ryo Akimoto, Ryoko Funabiki, Ken-o Ishihara
（BHN Co.,Ltd.）

【目的】ツバキ(椿)（学名：*Camellia Japonica*）はツバキ科ツバキ属の日本原産植物で、ツバキ種子から採れるツバキ油は整髪料などの化粧品原料のほか、高級食用油としても利用されてきた。これまでの研究では、ツバキ種子を搾油し、その油粕から抽出したエキス末を紫外線照射マウスへ投与すると、シワを改善することを明らかにしている。そこで、ツバキ種子エキス末およびツバキ種子由来のサポニンであるcamelliasaponin B2,C2を単離し、これらがヒト皮膚繊維芽細胞に与える影響について試験し、しわ改善作用の有効成分の特定を検討した。
【方法】繊維芽細胞に、ツバキ種子エキスおよびcamelliasaponin B2,C2を添加し、48～72時間処置後、MTT法を用いて、細胞増殖能を評価した。またELISA法によるコラーゲン量とヒアルロン酸量の定量を行った。
【結果】ツバキ種子エキスのサポニン成分であるcamelliasaponin B2,C2は、繊維芽細胞の増殖を0.3～12μg/mlの間で濃度依存的に高めた。また、Ⅰ型コラーゲンの産生を高めた。さらに、ヒアルロン酸産生量も1.5倍に高めた。よって、ツバキ種子エキス末のシワ改善作用は、camelliasaponinによるものであると示唆された。

Camellia Japonica, Camelliasaponin, NHDF cell

講演番号：2A05p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ A校舎05会場

アフリカ伝承民間薬止瀉成分 Voacangine は TRPV1 の競合的拮抗薬である
Voacangine, a Component of the Traditional Anti-diarrheal Medicine in Africa, is a Competitive Antagonist for TRPV1

○寺田祐子、堀江俊治[1]、高山廣光[2]、佐藤努、渡辺達夫 (静岡県大院生活健康・食栄、[1]城西国際大・薬、[2]千葉大院・薬)
○Yuko Terada, Syunji Horie[1], Hiromitsu Takayama[2], Tsutomu Sato, Tatsuo Watanabe (University of Shizuoka, [1]Josai International University, [2]Chiba University)

【目的】TRPV1 は、熱・酸・capsaicin（CAP）・炎症メディエーターなど、様々な痛み刺激の作用標的である。腸に発現している TRPV1 は、炎症性腸疾患・過敏性腸症候群の患者において発現が増大しており、下痢や内臓痛覚過敏に関与していると考えられている。これら疾病の治療に、TRPV1 アンタゴニストは有効と考えられ、私たちは食品・伝承民間薬から天然 TRPV1 アンタゴニストを見出すため、スクリーニングを行ってきた。これまでに、天然由来の TRPV1 アンタゴニストはほとんど報告がない。

Voacanga africana はアフリカに自生する樹木で、アフリカの伝承療法において下痢止めに用いられている。私たちは、マウス摘出腸管を用いたマグヌス実験により、*V. africana* に特有のアルカロイド Voacangine（VOA）が、TRPV1 アンタゴニストである可能性を見出した[1)]。

今回の検討では、TRPV1 発現培養細胞株と後根神経節初代培養細胞を用いて、VOA の TRPV1 遮断活性を解析した。

【方法】ヒト TRPV1 を発現させた HEK (HEKhV1) 細胞及び、ラット後根神経節の初代培養細胞を用いた。細胞内 Ca^{2+}濃度の変化を FLEXstation™ Ⅱ（Molecular Devices）にて測定し、検体の受容体に対する作用を評価した。阻害様式の解析は、Schild プロットにより行った。

【結果】HEKhV1 細胞及び、後根神経節細胞において、CAP の TRPV1 活性は VOA 前投与で濃度依存的に有意に抑制された。さらに、Schild プロットによる解析から、VOA は TRPV1 の競合的拮抗薬であることが判明した。一方、VOA は、ATP による細胞内 Ca^{2+}上昇を抑制しなかったことから、カルシウムチャネルを非特異的にブロックする性質はないものと推察した。

【考察】今回、VOA は TRPV1 に対して競合的拮抗作用を有することを見出した。アフリカの伝承療法において、*V. africana* は止瀉薬として用いられており、この薬効と、VOA の TRPV1 遮断作用との関連性に興味が持たれる。

参考文献

1）M. W. Lo et al., *J. Nat. Med.* 2011, *65*, 157-165

TRPV1 antagonist, *Voacanga africana*, voacangine

講演番号：2A05p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ A校舎05会場

渦鞭毛藻ヘテロカプサ･サーキュラリスクアーマの海洋細菌に対する影響

Effects of *Heterocapsa circularisquama* on marine bacteria

○竹下哲史[1]、山口健一[2]、小田達也[2]（[1]長崎大・産連戦略本部、[2]長崎大・水）

○Satoshi Takeshita[1], Kenichi Yamaguchi[2], Tatsuya Oda[2]（[1]CIUGC, Nagasaki Uni. [2]Fac. Fish., Nagasaki Uni.）

【目的】赤潮は沿岸域において、特に夏季に特定の単細胞微細藻類が大量に発生する現象であり、その原因種は多数知られている。赤潮の原因種の最も大きなグループを占めている種として渦鞭毛藻類が知られている。渦鞭毛藻の一種であるヘテロカプサ･サーキュラリスクアーマ(*Heterocapsa circularisquama*)は、広島湾のカキ養殖に対して甚大な被害をもたらした赤潮原因種として知られており、カキの他、アコヤガイやアサリなどの二枚貝の大量へい死を引き起こす一方、魚類に対する毒性や有害な影響は無いという種特異的な毒性を示す事が知られている。これまでの研究により、本種の溶血毒素の存在が示唆されているが、未だにその毒性機構の詳細及び毒性因子の実態は不明である。そこで本研究では、本種の毒性因子解明を目的として*H. circularisquama*の海洋細菌*Vibrio alginolyticus*に対する影響について調べた。

【方法】*H. circularisquama*の培養は、海水を主体とするESM培地を用い、26℃、12時間明暗サイクル条件下で行った。*V. alginolyticus*の培養は、Marine Agarを培地として28℃で行った。*H. circularisquama*の*V. alginolyticus*増殖に及ぼす影響は，コロニー法により調べた。

【結果】*H. circularisquama*は*V. alginolyticus*の増殖を明らかに抑制した。その増殖抑制作用は、細胞濃度依存的であったが、*H. circularisquama*が生細胞であることが必要であり、また、顕著な作用発現には一定以上の細胞数が必要であった。遠心分離により生細胞を除去した培養上清には抑制作用が確認されなかった事から、毒性因子が細胞外へ放出される可能性は無いと推定された。一方、毒性因子を細胞から抽出精製を試みる前段階として、超音波処理によって破壊した細胞浮遊液の作用について調べた結果、ほとんど抑制作用は認められなかった。これらの結果より、*H. circularisquama*は生細胞を介して*V. alginolyticus*細胞に直接的に作用することで、その増殖を抑制していると推定された。溶血活性に関しても本研究結果と同様、生細胞の状態で強い活性を示したが、培養上清や細胞破壊液では著しく低活性であった。おそらく細菌増殖抑制や溶血を引き起こす毒性因子は*H. circularisquama*細胞表層に存在し、細胞破壊によりその作用は消滅する極めて不安定な物質であると推定される。一方、細胞破壊液の一部を生細胞浮遊液に添加するとその溶血活性は低下する事が観察されている。従って、*H. circularisquama*の毒性因子は不安定である可能性に加え、細胞内には自らの毒性因子の作用を中和する解毒剤的な物質も存在していると推定される。*H. circularisquama*は二枚貝の他、動物プランクトンであるワムシに対しても強い致死作用を示す事も見出されている。今後、海洋細菌毒性、ワムシ毒性、溶血活性等についてさらに詳細に検討する事で、毒性因子解明を目指す予定である。

Red tide, dinoflagellate, marine bacteria

講演番号：2A05p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ A校舎05会場

紅藻からの新規プロスタグランジン代謝物の単離、構造決定とマウス組織中での同定

Isolation and structure determination of novel metabolite of prostaglandin from marine red alga and identification in mouse tissues

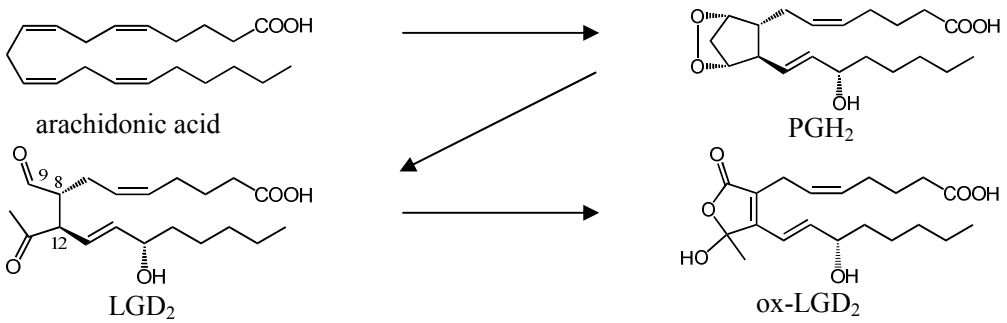
○金井 良和、廣木 禎彦、越野 広雪[1]、此木 敬一、長 由扶子、Cayme Mirriam[2]、福代 康夫[3]、山下 まり（東北大・院農、[1]理研・基幹研、[2]フィリピン国立水産研、[3]東大アジアセ）

○Yoshikazu Kanai, Sadahiko Hiroki, Hiroyuki Koshino[1], Keiichi Konoki, Yuko Cho, Mirriam Cayme[2], Yasuo Fukuyo[3], Mari Yotsu-Yamashita (Tohoku Univ, [1]RIKEN ASI, [2]NFRDI, [3]Univ of Tokyo)

【目的】哺乳類において、アラキドン酸（AA）からシクロオキシゲナーゼ（COX）により、プロスタグランジン(PG)H_2が作られ、PGH_2から、各種PG合成酵素により各種PGが形成される。PGは強力かつ多彩な生理活性を有し、発癌、生殖、炎症との関連から非常に重要な化合物である。PGH_2は各種PG変換酵素によりPGに変換されない場合、非酵素的かつ自発的に、Levuglandin (LG)E_2 とLGD_2に転移する。LGは反応性の高いγ-ケトアルデヒド基を持ち、細胞内で蛋白質やDNAやphosphatidylethanolamineのアミノ基と反応して安定な付加体を形成する。このLGによる生体分子の修飾は機能不全及び異常機能を引き起こし、疾病との関わりが推定されている。

本研究では、PG を生産するフィリピン産紅藻カタオゴノリ *Gracilaria edulis* から、新規 PG 代謝物と考えられる oxidized LGD_2 (ox-LGD_2)を単離した。本発表では、ox-LGD_2の単離、構造決定、及びマウス組織からの同定、およびその存在意義について報告する。

【方法・結果】*G. edulis* (800 g)からPG画分を調製し、未知のPG類縁体としてox-LGD_2 (約0.1 mg)を逆相LCを用いて単離した。各種NMRスペクトルを測定してox-LGD_2の平面構造（下図）を決定した。ox-LGD_2は、LGD_2のC8, C12間に二重結合を有し、LGD_2のC9のアルデヒド基がカルボン酸に酸化されてC11の抱水型ケトンとラクトン環を形成していたので、LGの酸化物と考えられた。これまでLGの酸化物の報告はなかった。ox-LGD_2は、マウス各組織やPMA処理してCOXを発現させたTHP-1 cell lysateとAAをインキュベートしたものからも、LC-MS/MSを用いて同定できたので、動物にも広く存在することが示された。ox-LGD_2は、アルデヒドやケトンを持たないので、LGD_2よりアミンとの反応性が低く、LGD_2の解毒代謝産物と考えられた。[1)]



ox-LGD_2の構造と推定代謝経路

Ref) Kanai et al., *J. Lipid Res.* 52, 2245-2254 (2011).

prostaglandins, levuglandins, *Gracilaria*

講演番号:2A05p15
講演日時、会場:3月23日16:43～ A校舎05会場

放線菌代謝産物から得られた新規プロスタグランジン放出阻害物質sacchathridine Aに関する研究

Study on prostaglandin release inhibitor, sacchathridine A from microbial metabolite

○中栄 功一、倉田 育子、小島 蕗子、五十嵐 雅之、波多野 和樹、澤 竜一、久保田 由美子、安達 勇光、野本 明男（微化研）
○Koichi Nakae, Ikuko Kurata, Fukiko Kojima, Masayuki Igarashi, Masaki Hatano, Ryuichi Sawa, Yumiko Kubota, Hayamitsu Adachi, Akio Nomoto (Institute of Microbial Chemistry)

【目的】
生理活性脂質であるプロスタグランジンＥ$_2$(PGE$_2$)やプロスタグランジンＩ$_2$ (PGI$_2$)は知覚神経の異常亢進を惹起し、過活動膀胱、掻痒、炎症因性疼痛の疾患等に深く関与することが報告されている。我々は既存の作用点とは異なるプロスタグランジン放出阻害活性物質を見出すべく、細胞から放出されるプロスタグランジンの放出阻害活性物質の探索を微生物代謝産物より行った。
【方法】
ヒト滑膜肉腫細胞株SW982細胞より放出されるPGE$_2$の放出阻害活性を指標として一次スクリーニングを行い、その後、他のプロスタグランジン放出阻害活性、シクロオキシゲナーゼ(COX-1, COX-2) 阻害活性等のプロファイリングによりヒットサンプルを選定し、活性物質の単離精製を行った。
【結果】
約二万サンプルよりスクリーニングを行った結果、土壌より分離した一放線菌 *Saccharothrix* sp. MI559-46F5株の培養抽出液に目的とする阻害活性を見出した。そこで大量培養後、各種クロマトグラフィーによる活性物質の単離精製を行い、新規物質sacchathridine Aを単離した。本物質はNMR、MSスペクトルによる構造解析の結果、ナフタレンジオン骨格を有する新規化合物であった。
Sacchathridine AはSW982細胞において、ブラジキニン処理によって誘導されるPGE$_2$の放出を濃度依存的に阻害すると共に、PGI$_2$の安定化代謝産物の産出も阻害した。またsacchathridine Aを高濃度処理しても増殖阻害活性は見られず、サイトカインの産生に影響を及ぼすことはなかった。
一般に各種プロスタグランジンの産生を抑制する薬剤としてはCOX阻害剤が知られている。しかしながらsacchathridine Aはin vitroにおいてのCOX-1およびCOX-2の酵素活性を阻害することはなかった。

prostaglandin

講演番号：2A05p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ A校舎05会場

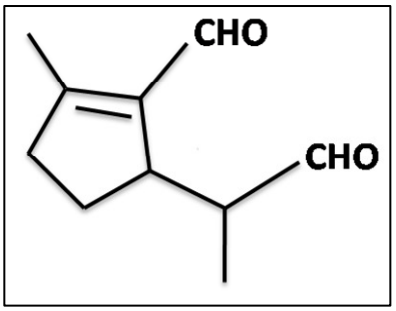
コガタルリハムシ *Gastrophysa atrocyanea* の防御物質によるアリ忌避活性

Ant repellent activity in defensive substance of *Gastrophysa atrocyanea*

○薬丸 亮太、渡邉 良祐[1]、清水 伸泰[1]、桑原 保正[1]、秋野 順治
（京工繊大繊維・応生、[1]京都学園・バイオ環境）
○Ryota Yakumaru, Ryosuke Watanabe[1], Nobuhiro Shimizu[1], Yasumasa Kuwahara[1], Toshiharu Akino (KIT, [1]KGU)

【目的】イリドジアール類は、防御物質として機能することが様々な昆虫種において示唆されている。しかしその機能が詳細にされていない例も多い。例えばある種のササラダニがイリドイドモノテルペンを分泌することが報告されているが、その機能は解明されていない。近年清水らが解析を進めている *Gastrophysa atrocyanea* のイリドイドモノテルペンについても、その機能は明らかではない。そこで、本研究ではそのイリドジアールの機能について、アリに対する忌避活性に着目し、生物検定を行った。

【方法・結果】ギシギシ*Rumex japonicus* の葉から採集したコガタルリハムシ３齢幼虫をヘキサンに浸漬して得た粗抽出物から、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって天然物のイリドイドモノテルペンを単離・精製した。また、シトラールを前駆物質としてラセミ体のイリドイドモノテルペンを合成した。このように調整した天然物およびラセミ体をショ糖結晶に塗布し、トビイロシワアリ*Tetramorium tsushimae* を対象として忌避活性の評価をおこなったところ、いずれの場合においても、2齢幼虫1頭が保有する量に匹敵する量を処理すると、トビイロシワアリ に対する有意な忌避効果が認められた。しかし、それ以下の処理量では忌避効果は認められなかった。したがって1齢幼虫のイリドジアール保有量ではトビイロシワアリに対する忌避効果が見込めないことから、このことが1齢幼虫で集合形成が認められる行動生態的な意義の一つである可能性が伺える。



Defensive substance, Leaf beetle, Iridoid monoterpene

講演番号:2A05p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ A校舎05会場

エラグ酸によるタンパク質SUMO化阻害

Inhibition of protein SUMOylation by ellagic acid

米山　操[1,2]、広浜　美香子[1,3]、木村　賢一[4]、半田　宏[2]、○伊藤　昭博[1,3]、吉田　稔[1,3]
[1]理研・基幹研、[2]東工大院・生命理工、[3]科技機構・CREST、[4]岩手大農・応生
Misao Yoneyama[1,2], Mikako Hirohama[1,3], Ken-ichi Kimura[4], Hiroshi Handa[2], ○Akihiro Ito[1,3], Minoru Yoshida[1,3]
[1]RIKEN ASI, [2]Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Institute of Technol., [3]CREST, JST, [4]Dept. of Biol. Chem. and Food Sci., Iwate Univ.

【目的】ユビキチン様タンパク質であるSUMO (Small Ubiquitin-like Modifier)によるタンパク質修飾は、ユビキチン化反応と同様に複数の酵素群、すなわちSUMO活性化酵素(E1)、SUMO結合酵素(E2)、およびSUMO転移酵素 (E3) によって行われる。SUMOはタンパク質の安定化、細胞内局在、活性などをコントロールすることにより、転写調節、核-細胞質輸送、DNA複製、DNA修復などに関与することが知られている、さらに、がんや神経変性疾患などの疾患にも関与することが最近示唆され、タンパク質SUMO化を制御する酵素群はこれら疾患の標的分子になり得ると考えられている。そこで植物抽出物からタンパク質SUMO化を阻害する活性成分を探索することを目的した。

【結果と考察】ハンカチノキ(*Davidia involucrata*)の葉の抽出物からSUMO化を阻害する活性成分を単離精製する過程で、ポリフェノール類であるエラグ酸がSUMO化を阻害する可能性が示唆された。そこでエラグ酸による*in vitro* SUMO化阻害活性を、RanGAP1を基質とした*in vitro* SUMO化反応系を用いて検討した。その結果、エラグ酸は*in vitro* SUMO化反応を阻害し、そのIC50値は0.96 μMであった。さらに、*in vivo* SUMO化も阻害することを見出し、エラグ酸の新規生理活性としてタンパク質SUMO化阻害を明らかにした。

エラグ酸によるタンパク質SUMO化阻害機構を検討するために、エラグ酸固定化ビーズを用いたpull down実験を行ったところ、エラグ酸はSUMO E2と選択的に結合することが示された。実際、E1-SUMO中間体には影響を与えず、E2-SUMO中間体形成のみを阻害したことから、エラグ酸はE2と直接結合し、E2の活性を抑えることにより、タンパク質SUMO化反応を阻害していることが示唆された。エラグ酸は抗がん活性を有していることが知られていることから、エラグ酸のタンパク質SUMO化阻害活性と抗がん活性の関係について現在検討を行っている。

ellagic acid, SUMO, E2

講演番号：2A05p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ A校舎05会場

加水分解デラウエア果皮エキスのDNA修復促進作用

Effects of hydrolyzed *Vitis Labrusca* L. cv. delaware skin extract on DNA repair

萩野 輝[1]，田畑光正[2]，池田英史[1]，○西浦英樹[1] ([1]日本コルマー（株），[2]島根県産業技術センター)
Akira Hagino[1], Hiromasa Tabata[2], Hidefumi Ikeda[1], ○Hideki Nishiura[1] ([1]NIHON KOLMAR CO., LTD，[2]Shimane Institute for Industrial Technology)

【目的】生体の最外層に位置している皮膚は紫外線（UV）により様々な影響を受けるが，その中でも DNA 損傷は最も有害である。皮膚の表皮および真皮上層にまで達する UVB は，細胞中の DNA に直接吸収されることで cyclobutane pyrimidine dimer（CPD）などの損傷を与えることがよく知られている。細胞には本来これらの DNA 損傷を修復する機能が備わっているが，修復しきれないほどの DNA 損傷が生じた場合，細胞は死に至る。また，皮膚では加齢に伴う DNA 修復機能の低下が報告されており，光老化症状の一因として考えられている。我々は UVB による DNA 損傷の修復を促進する素材の探索を行った結果，ブドウの一種であるデラウエアの果皮にその作用を見出したので報告する。【方法】培養した正常ヒト胎児皮膚由来線維芽細胞（NB1RGB）および正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）にそれぞれ 10 あるいは 15 mJ/cm^2 の UVB を照射した。照射後，それぞれの細胞を加水分解デラウエア果皮エキス添加あるいは無添加培地中で培養し，培養後の細胞から DNA を抽出したのち，ドットブロッティング法にて CPD を検出した。また，培養後の細胞生存率を 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide（MTT）染色法により測定した。表皮および真皮を含む三次元皮膚モデル（EFT-412）は所定のプロトコールにて順化したのち，UVB（100 mJ/cm^2）を照射した。照射後，加水分解デラウエア果皮エキス添加あるいは無添加の EFT-412 を 48 時間培養し，培養後，切片を作成し，免疫組織染色法にて CPD を検出した。【結果】NB1RGB および NHEK の両細胞において，培養後の CPD レベルは加水分解デラウエア果皮エキス処理した細胞の方が無処理の細胞に比べ有意に低下しており，また，細胞生存率は有意に高かった。さらに，EFT-412 においても UVB 照射後，加水分解デラウエア果皮エキスを添加し培養することで無添加区に比べ CPD レベルが減少した。以上の結果から，加水分解デラウエア果皮エキスは DNA 修復を促進することで UVB による皮膚へのダメージを抑制する可能性が示唆された。

Keyword1 skin, Keyword2 dna repair, Keyword3 cyclobutane pyrimidine dimer

講演番号：2A05p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ A校舎05会場

微生物由来低分子化合物SMTP-7による脳梗塞治療効果発現の分子基盤解析

Evaluation of molecular mechanism of SMTP-7 mediated therapeutic effect against stroke

○鈴木絵里子、松本直欣、蓮見恵司（東農工大・農）
○Eriko Suzuki, Naoki Matsumoto, Keiji Hasumi(Tokyo Noko Univ.)

【目的】脳梗塞は、世界的に死因の上位を占める疾患である。しかしながら、急性期脳梗塞治療薬の開発は未だ発展途上であるといってよく、既存薬よりも安全性が高く、より有効な治療薬の開発は急務である。SMTPは、糸状菌*Stachybotrys microspora*により生産される新規脳梗塞治療薬の候補化合物である。50種類余りの類縁体の中でも、特にSMTP-7には、ラットやサルを用いた脳梗塞モデルにおいて、優れた脳梗塞改善作用が見出されている。これには線溶系における、SMTPのplasminogen modulatorとしての作用のほか、未知の分子を介した、脳保護作用・神経保護作用を含む抗炎症作用が関与していると考えられた。そこで、本研究においては、SMTPの未知の標的分子の同定を行い、SMTP-7の薬理作用発現の作用機序を詳細に解明することを目的とした。

【方法】マウス肝臓ホモジネートより、SMTPカラムによるアフィニティー解析からSMTPの標的分子としてsoluble epoxide hydrolase (sEH)を同定した。sEHはN末側にphosphatase活性を、C末側にepoxide hydrolase活性を有するハイブリッド分子である。我々は両酵素活性に対するSMTP-7の阻害活性を*in vitro*で測定した。さらに、ヒト肝癌由来HepG2細胞において、LC-MSにより内在性のsEHに対する阻害活性を定量的に評価した。

【結果】

マウスの肝臓ホモジネートよりSMTPの新たな標的分子として可溶性エポキシド加水分解酵素(sEH)を同定した。さらにSMTP-7が*in vitro*でsEHのhydrolase活性、phosphatase活性を共に阻害することを明らかにした。また、ヒト肝癌細胞HepG2細胞においては、SMTP-7がsEHを阻害することにより、基質であり、抗炎症作用を有することで知られるEETの代謝が抑制され、細胞内で安定化することを見出した。即ち、本研究より、SMTP-7の優れた脳梗塞治療効果の発現には、plasiminogen modulatorとしての血液線溶活性と、sEH阻害を介した抗炎症作用の少なくとも二つが相乗的に寄与していることが示唆された。

stroke, SMTP, sEH

講演番号：2A05p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ A校舎05会場

原核生物Hsp90の機能に影響を与える天然小分子化合物の解析

Modulation of the prokaryotic Hsp90 function by naturally occurring small molecules

横山　雄平、Jantan Ibrahim[1]、○仲本　準（埼玉大・理、[1]Kebangsaan Malaysia大・薬）
Yuhei Yokoyama, Ibrahim Jantan[1], ○Hitoshi Nakamoto (Saitama Univ., [1]Univ. Kebangsaan Malaysia)

【目的】Goniothalaminは、癌細胞に対する毒性を示す天然小分子化合物である。真核細胞のHsp90は、多くのシグナル伝達キナーゼや転写因子等と複合体を形成することで、これらの機能や安定性を維持する。変異したシグナル伝達タンパク質にも同様に作用するために、Hsp90は癌細胞で必須の役割を果たす。Hsp90の機能を特異的に阻害するゲルダナマイシンなどの薬剤やその誘導体は、癌の増殖を阻害することが明らかにされ、抗癌剤として臨床試験も行われている。我々は、Goniothalaminが抗癌作用を示すことから、Hsp90の機能を調節するのではないかと考えて、その分子シャペロン活性に与える影響を解析した。
【方法】*Goniothalamus tapis* の樹皮から抽出された(+)-Goniothalaminが、シアノバクテリアのHsp90（HtpG）のATP加水分解活性と変性タンパク質の凝集阻止活性に及ぼす影響を調べた。抗Hsp90抗体を用いた免疫沈降法により、Hsp90と変性基質との相互作用を解析した。
【結果】良く知られている抗癌剤であるゲルダナマイシンやラディシコールはHsp90の活性を阻害するが、Goniothalaminは、Hsp90の活性を増大させた。反応速度論的解析により、GoniothalaminはHsp90のK_m及びk_{cat}の両方を約1.5倍増大させた。Hsp90を活性化する小分子化合物は、抗エストロゲン薬であるタモキシフェンが知られているだけである。Hsp90は変性タンパク質と相互作用して、その凝集を抑制する活性を示すが、Goniothalaminは変性タンパク質凝集抑制活性には影響を与えなかった。

Hsp90, Chemical biology, Cancer

講演番号:2A05p21
講演日時、会場:3月23日17:59～ A校舎05会場

ヤセウツボ(*Orobanche minor*)由来化合物のアミロイドβ凝集阻害活性に関する研究

Bioactive compounds from *Orobanche minor* inhibit aggregation of amyloid β

○栗栖　真奈美[1]、宮前　友策[1,3]、村上　一馬[4]、Han Junkyu[1,2]、礒田　博子[1,2]、入江　一浩[4]、繁森　英幸[1]([1]筑波大院生命環境、[2]筑波大ARENA、[3]京大生命統合生命、[4]京大院農食品生物)

○Manami Kurisu[1], Yusaku Miyamae[1,3], Kazuma Murakami[4], Junkyu Han[1,2], Hiroko Isoda[1,2], Kazuhiro Irie[4], Hideyuki Shigemori[1] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]The Alliance for Research on North Africa, University of Tsukuba, [3]Graduate School of Biostudies, Kyoto University, [4]Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】アルツハイマー症は世界的に最も多い神経変性疾患であり、高齢者における認知症の主な原因の一つである。近年の研究では、その発症にアミロイドβタンパク質(以下Aβ)が関与していることが示唆されている。凝集したAβが中枢神経系に蓄積すると、強い神経細胞毒性が引き起こされ、神経系の機能低下が起こり、アルツハイマー症を発症すると考えられている。

最近、寄生植物であるヤセウツボ(*Orobanche minor*)から単離したフェニルエタノイド配糖体(PHEG)に、Aβの凝集を阻害する効果があることを見出した。そこで本研究では、PHEG及びその類縁化合物によるAβ凝集阻害メカニズムの解明を目的として研究を行った。

【方法】<i>実験に使用したPHEGの単離・精製及び類縁体の合成；ヤセウツボ(*O. minor*)の根を粉砕後、メタノール抽出し、各種クロマトグラフィーを用いて分離、精製したPHEG類、及びそれらの誘導反応により得た類縁体を用いた。<ii>Aβ凝集阻害活性試験；PHEGのAβ凝集阻害活性の評価のため、固相合成により得られた$A\beta_{42}$をPBS中37℃の条件でインキュベーションし、各種実験に用いた。まず、チオフラビンT(Th-T)アッセイを用いて$A\beta_{42}$の凝集度合いを評価した。さらに透過型電子顕微鏡(TEM)によるAβ凝集形態の観察及びCDスペクトルによる$A\beta_{42}$の二次構造の変化の測定を行った。また、$A\beta_{42}$からの神経細胞保護作用を調べるため、ヒト神経芽細胞腫(SH-SY5Y)を使用したMTTアッセイを行い、細胞生存率を測定した。

【結果】Th-Tアッセイでは、$A\beta_{42}$のみで培養した場合、時間経過と共に凝集による蛍光量の増大が見られたがPHEGを加えることで$A\beta_{42}$の凝集が濃度依存的に抑えられることが明らかになった。一方、PHEGのフェノール性水酸基をメチル化した化合物には活性が見られなかったことから、フェノール性水酸基の存在が活性に重要であることが示唆された。また、TEMによる$A\beta_{42}$の凝集形態の観察を行った結果、$A\beta_{42}$のみで培養した場合は8時間後には$A\beta_{42}$線維の形成が見られたが、PHEGを加えた場合は24時間後でも$A\beta_{42}$線維の形成はほとんど認められなかった。CDスペクトルの測定により、$A\beta_{42}$のみではβシート構造を持つタンパク質に特徴的に見られる220 nm付近の負の吸収が、PHEGを加えることで小さくなり、βシート構造の形成が抑制されていることが示された。さらに、SH-SY5Y細胞を用いたMTTアッセイより、PHEGが$A\beta_{42}$からの神経細胞保護作用を有することが示された。以上の結果より、PHEGにAβ凝集阻害活性を有することが明らかになった。今後はAβとPHEGの相互作用の観点から解析していく予定である。

phenylethanoid glycoside, Amyloid β, Alzheimer's disease

講演番号：2A06a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ A校舎06会場

糸状菌*Phomopsis amygdali*が生産するフシコクシン（FC）生合成マシナリーの機能解明-3-

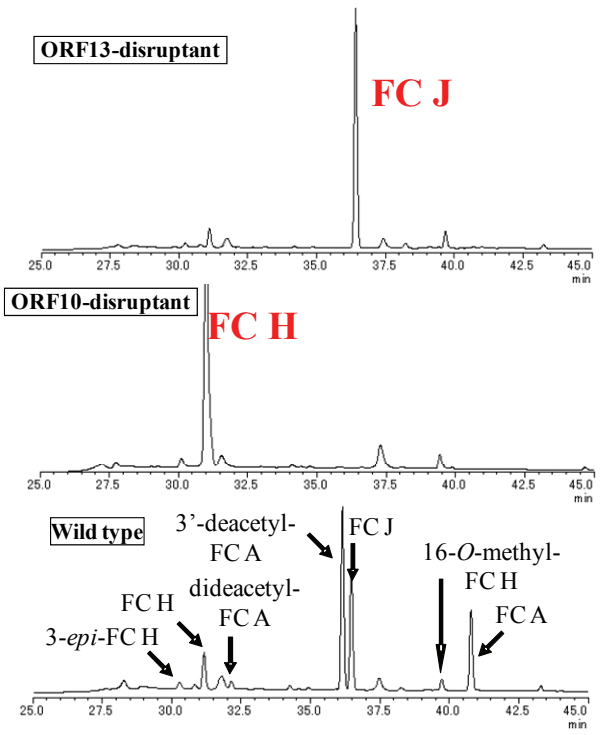
Analysis of biosynthetic machinery of fusicoccin A produced by *Phomopsis amygdali* -3-

野池基義、小野裕介、○長野竜郎、濱野吉十[1]、樋口雄介[2]、豊増知伸[3]、佐々武史[3]、加藤修雄[2]、大利　徹（北大・院工、[1]福井県大・生物資源、[2]阪大・産研、[3]山形大・農）

Motoyoshi Noike, Yusuke Ono, Tatsurou Nagano, Yoshimitsu Hamano[1], Yusuke Higuchi[2], Tomonobu Toyomasu[3], Takeshi Sassa[3], Nobuo Kato[2], Tohru Dairi (Hokkaido Univ., [1]Fukui Prefect. Univ., [2]Osaka Univ., [3]Yamagata Univ.)

【目的】FC生合成遺伝子クラスターに存在するP450の機能解析とそれらの破壊による半合成に有利な生合成中間体蓄積株の分子育種を行う。

【方法と結果】クラスター内には 5 つの P450 遺伝子（ORF3, ORF5, ORF7, ORF10, ORF13）が存在した。ORF5 遺伝子は出芽酵母を宿主とし、フシコッカジエン合成酵素遺伝子および *P. amygdali* から取得した P450 還元酵素遺伝子と共発現させた結果、8 位が水酸化されたモノオール体の生産を確認できたことから、ORF5 遺伝子は 8 位水酸化遺伝子と結論付けた。ORF3 は以前ブラシッシセン生産菌 *Alternaria brassicicola* から取得、証明した 16 位水酸化遺伝子と高い相同性（48% identity）を有していることから、同様の反応を触媒すると考えられた。ORF7 遺伝子は出芽酵母に導入後、ミクロソーム画分を調製し、8, 16 位が水酸化されたジオール体を基質に用いて反応させた結果、9 位が水酸化されたトリオール体を生産することを確認した。



ORF10 と ORF13 に関しては、各々相同組換えによる破壊株を作成した。前者の破壊株は、FC H のみを生産し他の FC 関連化合物の副生はほとんど見られなかった。後者の破壊株も FC J のみを生産した。したがって、ORF10 が 12 位水酸化を、ORF13 が 19 位水酸化を行うことが分かった。なお、何れの生産性も野生株が生産する FC A と同程度かそれ以上であった。

FC が抗ガン活性を示すには、12 位の水酸基の除去が必須であることが判明している。12 位に水酸基の無い FC H からは高活性の抗がん剤が容易に合成可能である。今回、FC H 生産株の育種に成功したことから、今後の医薬候補化合物の創製に新たな展開が期待できる。

fusicoccin A, P450, biosynthesis

講演番号:2A06a02
講演日時、会場:3月23日09:11～ A校舎06会場

フタロシン（FL）経路の解析

Studies on futalosine (FL) pathway

○池田駿介、柏崎恭平、小野裕介、池田安由美、佐藤康治、矢島　新[1]、瀬戸治男[1]、大利 徹（北大院･工、[1]東農大･応生科）

○Shunsuke Ikeda, Kyohei Kashiwazaki, Yusuke Ono, Ayumi Ikeda, Yasuharu Satoh, Arata Yajima[1], Haruo Seto[1], Tohru Dairi (Hokkaido Univ., Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】これまでに我々は、メナキノン新規生合成経路であるFL経路の概略を明らかにしたが、個々の生合成反応の詳細については不明な点が多い。今回、①MqnA（FLが生成する反応）と②MqnD（cyclic DHFL →1,4-naphtoquinone-6-carboxylic acid (NQCA)）が触媒する反応について解析した。

【方法と結果】

①これまで遺伝子破壊によりMqnAがFL生成に必須であることを証明したが、*in vitro*での活性検出に至っていない。そこで、MqnAに加え更なる酵素がFL生成に関与する可能性を考え、ゲノム解析された微生物にMqn遺伝子群がクラスターを成す株を検索した。高度好熱放線菌である*Acidothermus cellulolyticus*では、Mqn遺伝子群が染色体上二か所にクラスターを成していると考えられた。本クラスター内には複数の機能未知遺伝子が存在したことから、これらがFL生成に関与する可能性を、MqnAと共に大腸菌で発現させFLが生産されるかを指標に検討した。また、遺伝子破壊が容易な*Thermus thermophilus*を用いて、それらのオーソログ遺伝子を破壊しメナキノン要求性となるか検討した。その結果、機能未知とされる1つの遺伝子がFL生成に関与すると推定された。

さらに以下の検討も行った。FLの特徴の1つはイノシンの5’位の炭素が炭素-炭素結合を形成することである。最近、本骨格を有するヌクレオシド系抗生物質であるA-90289では、α-KG依存ジオキシゲナーゼによる5’-OHの酸化とSHMT様酵素（PLP酵素）によるグリシン付加により生成することが報告された。そこでFL生合成にも同様の酵素が関与するか検討した。放線菌*Streptomyces coelicolor*が持つ4つのα-KG依存ジオキシゲナーゼのオーソログを組換え酵素として発現後、予想される基質と反応させたが特異的生成物は認められなかった。したがって、異なるタイプの酵素が炭素-炭素結合に関与すると推定された。

②以前我々は、MqnD破壊株から調製したcyclic DHFLを基質に用い、組換えMqnD酵素と反応させNQCAが生成することを明らかにした。今回、合成したラセミ体のcyclic DHFLを基質に用いMqnD酵素と反応させ、NQCAと共に生成するC3化合物の同定を試みた。その結果、特異的生成物が検出できたことから、現在、構造解析を試みている。

menaquinone, biosynthesis, futalosine

講演番号：2A06a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ A校舎06会場

バクテリアにおける新規葉酸生合成経路の解明

Studies on an alternative folate biosynthesis pathway in bacteria.

○佐藤 康治、大利 徹（北大院・工）
○Yasuharu Satoh, Tohru Dairi (Hokkaido Univ.)

【目的】多種多様な生物のゲノム配列が決定されるにつれ、核酸、アミノ酸、補酵素など生物個体の維持・増殖に必須で普遍的に存在していると考えられてきた一次代謝経路の欠落した生物の存在が認知されるようになった。我々は詳細なゲノム解析とsingle omission testにより、葉酸の構成化合物である*p*-アミノ安息香酸（pABA）の生合成関連遺伝子（*pabABC* 遺伝子）全てが欠落したバクテリアが存在していることを見出した（Appl. Environ. Microbiol., 76, 7299-7301 (2010)）。これらバクテリアは原栄養性（prototrophy）と考えられることから、新規生合成経路の存在が予想された。そこで本研究ではその解明を試みた。

【方法・結果】既知pABA生合成遺伝子が見出されなかった亜硝酸細菌*Nitrosomonas europaea*を用いて、新規pABA生合成遺伝子のクローニングを試みた。スクリーニングにはpABA生合成遺伝子全てを破壊した大腸菌(pABA要求株)を宿主に用い、最少培地での増殖能回復を指標にショットガンクローニングを行った。*N. europaea*ゲノムを*Sau*3AIで消化した約7kbp断片を調製し、ベクターと連結後、pABA要求株を形質転換した。その結果、最少培地にて増殖可能なクローンの取得に成功した。シーケンス解析の結果、NE1430～NE1435遺伝子が含まれていることが分かった。更なる解析の結果、NE1434遺伝子がpABA合成に関与していることを突き止めた。NE1434遺伝子のオーソログを探索した結果、同様に既知pABA生合成遺伝子全てを欠落した*Chlamydia trachomatis*にそのオーソログCT610遺伝子を見出した。このCT610遺伝子は染色体上で、他の葉酸生合成関連遺伝子の下流に同じ方向で配置されてしていた。したがって、NE1434遺伝子とCT610遺伝子はpABAの生合成に関与している可能性が高いと考えられた。現在、組換え酵素を用いて詳細な生合成経路・機構について解析している。

biosynthesis, para-aminobenzoate, *Nitrosomonas*

講演番号：2A06a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ A校舎06会場

糸状菌*Phomopsis amygdali*が生産するフシコクシン（FC）生合成マシナリーの機能解明-1-

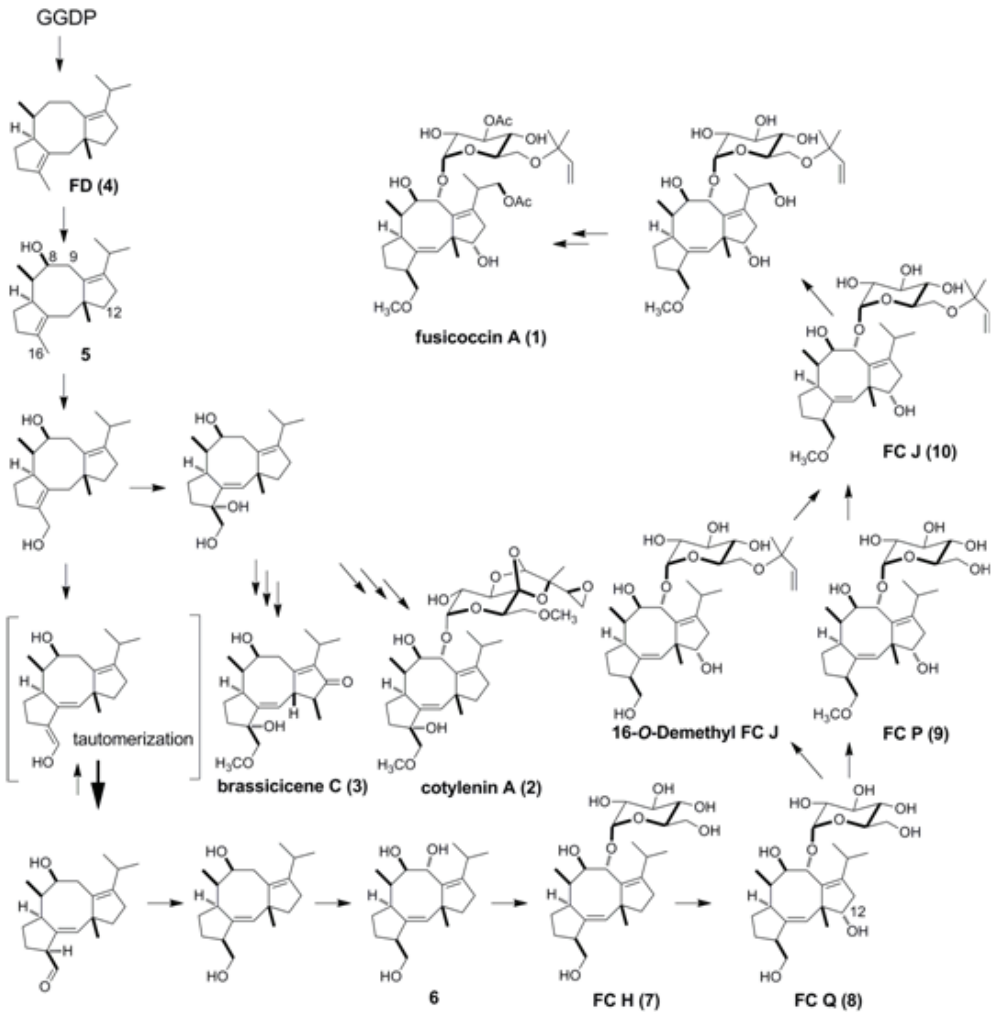
Analysis of biosynthetic machinery of fusicoccin A produced by *Phomopsis amygdali* -1-

○野池基義、小野裕介、谷尾　亮、豊増知伸[2]、佐々武史[2]、加藤修雄[3]、大利　徹（北大院・工、[2]山形大・農、[3]阪大・産研）

Motoyoshi Noike, Yusuke Ono, Ryo Tanio, Tomonobu Toyomasu[1], Takeshi Sassa[1], Nobuo Kato[2], Tohru Dairi (Hokkaido Univ., [1]Yamagata Univ., [2]Osaka Univ.)

【目的】フシコクシンA（FC）(1)やコチレニンA（CN）(2)は糸状菌によって生産されるジテルペン配糖体であり極めて類似した構造を持つ。両者とも植物ホルモン様活性を示すが、興味深いことに、(2)のみが抗ガン活性を有する。しかし、(2)生産菌は長期保存の間に増殖能を失い、現在(2)の新規調製は不可能な状況である。そこで我々は構造類縁体である(1)の生合成を解明し、生合成工学による(2)と同等か、それ以上の活性を有する新規FC/CN類縁体の創製を目指し研究を行っている。

【方法と結果】以前我々は*P. amygdali*からFCアグリコンであるフシコッカジエン（FD）の生合成遺伝子を含む4つの遺伝子を見出し、3つについては機能解析を終えた。今回、ドラフトゲノム解析を行い染色体上分かれて存在する9個からなる遺伝子クラスターを見出した。本クラスターには、FCの推定生合成経路の反応に合致するP450、糖転移酵素、メチル基転移酵素、アセチル基転移酵素、プレニル基転移酵素遺伝子等が存在した。これらの内、P450-3（ORF 5）とアセチル基転移酵素（ORF 12）を解析した結果、予想される活性が検出できたことから、本クラスターは実際にFC生合成に関与すると考えられた。



fusicoccin A, diterpene, biosynthesis

講演番号：2A06a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ A校舎06会場

糸状菌*Phomopsis amygdali*が生産するフシコクシン（FC）生合成マシナリーの機能解明-2-

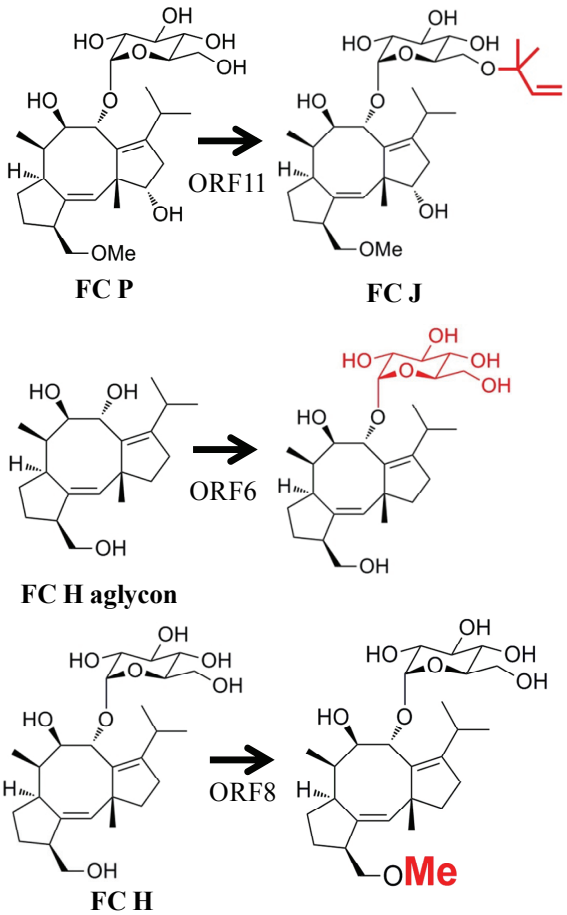
Analysis of biosynthetic machinery of fusicoccin A produced by *Phomopsis amygdali* -2-

野池基義、荒木祐治、○劉　成偉、小野裕介、濱野吉十[1]、樋口雄介[2]、豊増知伸[3]、佐々武史[3]、加藤修雄[2]、大利　徹（北大院・工、[1]福井県大・生物資源、[2]阪大・産研、[3]山形大・農）

Motoyoshi Noike, Yuji Araki, ○Chengwei Liu, Yusuke Ono, Yoshimitsu Hamano[1], Yusuke Higuchi[2], Tomonobu Toyomasu[3], Takeshi Sassa[3], Nobuo Kato[2], Tohru Dairi (Hokkaido Univ., [1]Fukui Prefect. Univ., [2]Yamagata Univ., [3]Osaka Univ.)

【目的】ジテルペン配糖体であるFCの生産菌に見出した13個からなる生合成遺伝子クラスターの内、プレニル基転移酵素、糖転移酵素、メチル基転移酵素遺伝子について、組換え酵素を用いて詳細な酵素学的諸性質を解析する。

【方法と結果】プレニル基転移酵素（ORF11）は、生合成中間体であるFC Pのグルコースの6’位にジメチルアリル二リン酸を付加した。さらに微弱ながらゲラニル二リン酸の転移活性も認められた。本酵素は糖へのプレニル基転移の初めての例である。受容体に関しては、FC Hも基質となったが、多くの糸状菌由来プレニル基転移酵素が基質とするTrpなどのアミノ酸やその誘導体は基質とならなかった。



糖転移酵素（ORF6）に関しては、FC Hアグリコンと UDP-グルコースを基質としてグルコース転移活性を検出できた。またTDP-グルコースも用いた場合も同等の活性を示した。

メチル基転移酵素（ORF8）に関しては、FC H と *S*-adenosyl-L-methionineを基質として酵素反応を行い、16-*O*-methyl-FC Hが生成することを確認した。興味深いことに、*epi*体の3-*epi*-FC H には作用しなかったことから、本酵素は基質の立体を認識していることが分かった。

また、これら3つの酵素の詳細な酵素学的諸性質も検討したので合わせて報告する。

fusicoccin, biosynthesis, fungi

講演番号：2A06a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ A校舎06会場

糸状菌由来休眠型生合成遺伝子の活性化によるペプチド系天然物合成システムの構築

Activating a silenced biosynthetic pathway to produce novel peptide in *Chaetomium globosum*

○佐藤道大、中沢威人、野口博司、守屋央朗[1]、渡辺賢二（静岡県大・薬、[1]岡山大学異分野融合先端研究コア）
○Michio Sato, Takehito Nakazawa, Hiroshi Noguchi, Hisao Moriya[1], Kenji Watanabe (University of Shizuoka, [1]Okayama University)

【目的】微生物が生産する二次代謝産物の中から多くの有用な天然物が見出されてきた。しかし、これまでの糸状菌に関する分子生物学的研究結果から、実験室における一般的な糸状菌の培養法では糸状菌の二次代謝産物生合成遺伝子の転写活性は低いことが明らかとなっている。つまり、糸状菌のゲノム上に生合成遺伝子はコードされているが天然物として生産を確認できない化合物が多数存在すると考えられる。とりわけ転写活性が極めて低い場合、その生合成遺伝子の mRNA を単離し cDNA を取得することは困難である。従って、異種発現による生合成産物の獲得も難しくなる。そこで本発表では、機能不明となっている休眠型生合成遺伝子を活性化し、ペプチド系天然物の生産を試みたので報告する。
【方法・結果】実験に用いた糸状菌 *Chaetomium globosum* は、二次代謝生合成クラスター遺伝子が他の糸状菌と比較しても多く存在し、また多様な二次代謝産物を生産することで知られている。この *C. globosum* のゲノム解析と RT-PCR による mRNA の転写量を調べた実験結果から、非リボソーム依存性ペプチド合成酵素（nonribosomal peptide synthetase, NRPS）コードしていると推定されるが極めて転写活性の低い全長 23kb の遺伝子を見出した。本遺伝子を *C. globosum* 内で機能するアクチンプロモーターの下流に連結し、目的遺伝子の転写活性を増大させることができる発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを用いてプロトプラスト-PEG 法により *C. globosum* を形質転換し、目的の遺伝子を過剰発現させることによって化合物の生合成を可能とする *de novo* 合成系を構築した。その結果、得られた変異株において目的遺伝子の転写が増大していることが明らかとなり、また本 de novo 合成系を用いた変異株培養液抽出物の HPLC 分析から、野生株 *C. globosum* では見出すことのできない化合物の生合成が確認された。現在、本化合物の単離・構造決定を行っている。

Keyword1, biosynthesis; Keyword2, NRPS; Keyword3, fungus

講演番号：2A06a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ A校舎06会場

糸状菌ゲノムの酵母を宿主とした発現によるペプチド系抗生物質の合成

Genetic indoctrination of yeast for innovative drug discovery

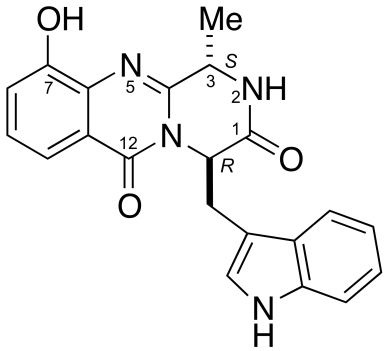
○ 石川格靖、恒松雄太、杉本覚、石内勘一郎、守屋央朗[1]、野口博司、渡辺賢二（静岡県大・薬、[1]岡山大学・コア）

○ Noriyasu Ishikawa, Yuta Tsunematsu, Satoru Sugimoto, Ishiuchi Kan'ichirou, Hisao Moriya[1], Hiroshi Noguchi, Kenji Watanabe (School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [1]Research core for interdisciplinary sciences, Okayama University)

【目的】糸状菌が生産する二次代謝産物にはpenicillinやcyclosporineのように臨床的に重要な化合物が多い。糸状菌由来天然物は依然有力な生物活性物質候補であるが、最近では単離容易な化合物はほぼ取り尽くされ、新規化合物の獲得が困難になってきている。しかし、糸状菌のゲノム上には、天然物の生合成酵素はコードされているが合成産物を確認することのできない遺伝子群が多数存在すると考えられている。そこで本研究では、糸状菌が持つ潜在的な二次代謝産物の生合成能力を異種発現させ、これまでに単離されていない分子の創製法を確立することを試みた。

【方法】糸状菌由来の非リボソーム依存型ペプチド合成酵素（nonribosomal peptide synthase, NRPS）は巨大な酵素であるため完全長cDNAを自由に発現するシステムの構築には困難を伴う。そこで、非翻訳領域であるイントロンを効率よく削除する方法を開発した。まず、糸状菌である*Aspergillus fumigatus*のゲノム上においてNRPSをコードしているAfu6g12080[1)] の全エクソン配列をPCR法によって増幅した。得られたエクソン配列とベクターを酵母に導入すると、相同組換えによって目的のエクソン配列が挿入された発現ベクターが一挙に構築された。これはスプライソソームに依存すること無く、効率的にイントロンを取り除き読み枠を構築するものであった。続いて作成したベクターをNRPSの活性化に必要な*Aspergillus nidulans*由来*npgA*を導入した酵母細胞中で発現誘導を行うと培養液から新規代謝産物の生産を確認した。各種クロマトグラフィーを用いて合成産物を単離し、化合物の化学構造を決定した。

【結果】酵母に導入されたNRPS遺伝子を発現させた後、ウエスタンブロッティングによって酵素へ翻訳されていることを確認した。さらに、得られた化合物について各種スペクトル解析および分解反応を行いて化学構造を決定した。また、２つある不斉点に関してはMarfey法により絶対立体配置を決定した。その結果、抗腫瘍性抗生物質fumiquinazoline Fと類似の骨格構造を有した新規化合物7-hydroxyfumiquinazoline Fであると決定した。



【考察】本方法では一般的な培養では発現しない遺伝子を強制的に発現させて化合物を獲得する。新規骨格を形成するNRPS遺伝子やポリケタイド合成酵素遺伝子の他に、様々な修飾遺伝子を導入することで種々の新規化合物の生産を期待できる。

【文献】1) Ames, B. D. *et al. Biochemistry*. **2010**, *49*, 8564.

Nonribosomal peptide synthase, Biosynthesis, Yeast

講演番号：2A06a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ A校舎06会場

二次代謝研究を指向した糸状菌*Chaetomium globosum*の分子遺伝学実験システムの整備

Development of Gene Manipulation System for Biosynthetic Studies in *Chaetomium globosum*

○中沢　威人、杉本　覚、五反田　康考、野口　博司、渡辺　賢二（静岡県大・薬）
○Takehito Nakazawa, Satoru Sugimoto, Yasutaka Gotanda, Hiroshi Noguchi, Kenji Watanabe (Univ. of Shizuoka)

過去の天然物化学研究によって、病原性糸状菌*Chaetomium globosum*から多くの天然物が単離・構造決定されてきた。その中にはケトグロボシン類という、生合成の観点から興味深いものも存在する。一方、近年のゲノム解析の結果より、本菌のゲノム上には非常に多く（５０種類）の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在していることが明らかとなった。この数は今まで本菌から単離されてきた化合物の種類より遥かに多い。このことは他の糸状菌類種での報告と同様に、通常の実験室における培養条件では多くの二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの転写発現が不活性化されていることを示唆する。実際、当研究室において本菌の遺伝子発現解析を行った結果、６５％のクラスターが不活性化状態にあることが分かった。以上より、近年*Aspergillus*属で行われているような、分子遺伝学を利用した天然物化学・生合成研究を本菌で行うことで、興味深い研究知見が得られると考えられる。しかし、本菌における遺伝子研究は現在まで行われておらず、形質転換法すら報告されていない。そこで本菌における形質転換法の確立と、その天然物化学・生合成研究への応用を指向した分子遺伝学実験システムの整備を行ったので、それらに関して発表する。

まずPEG-プロトプラスト法によって、１プレート・10^7個のプロトプラストから５ー１０株の形質転換体を安定的に取得できる形質転換法を確立した。次に（１）高頻度遺伝子ターゲティング（２）誘導型プロモーターを用いた遺伝子発現を可能とした。（１）に関して、非相同末端再結合による非相同組み換えDNA修復経路に関わる遺伝子を破壊することで、相同組み換えによる外来DNA取り込みが優先的に発生する現象を利用した。DNA ligas IV をコードする遺伝子*Cg.lig4*の破壊を試み、6%程度の頻度（２破壊株／３５形質転換体）でホモ破壊株の取得に成功した。この遺伝子破壊株では、様々な糸状菌で７０−１００％の確率で相同組み換え形質転換体が得られるという報告がある。現在、高頻度相同組み換えを利用したマーカーリサイクルによって、多重形質転換を可能にするため、ウリジン・ウラシル要求性と5-FOA耐性の形質を支配する*pyrG*遺伝子の破壊を試みている。（２）に関して、エタノール存在下において発現が誘導されるアルコール脱水素酵素をコードする遺伝子を同定した。この遺伝子のプロモーター配列を用いることで、エタノールを用いた誘導発現が可能となる。以前、我々は出芽酵母を宿主とした異種発現によって、CHGG_010128がコードする*C. globosum*由来ポリケタイド合成酵素から合成される化合物を同定していた。上記プロモーターを用いた当該遺伝子の発現誘導により、同一化合物が生産されることが確認できた。現在、最適な化合物生産のための培養条件検討を行っている。

secondary metabolism, transformation

講演番号：2A06a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ A校舎06会場

サフラマイシン生合成酵素の機能解析

Functional reconstitution of saframycin biosynthetic enzymes using an *E.coli* expression system

○鰐渕 清史[1]、猿渡 隆佳[1]、北野 達也[1]、野口 博司[1]、守屋 央朗[2]、渡辺 賢二[1]（[1]静岡県立大学薬、[2]岡山大学異分野コア）

○Kiyofumi Wanibuchi[1], Takayoshi Saruwatari[1], Tatsuya Kitano[1], Hiroshi Noguchi[1], Hisao Moriya[2], Kenji Watanabe[1] ([1]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [2]Research core for interdisciplinary sciences, Okayama University)

【目的】テトラヒドロイソキノリン骨格を持つサフラマイシンは放線菌より単離された抗腫瘍性生物活性物質である。サフラマイシン生合成遺伝子クラスターに存在する３種の非リボソーム依存性ペプチド合成酵素（nonribosomal peptide synthetase, NRPS）の一つである SfmC により脂肪酸ジペプチド還元体である myristoyl-alanyl-glycinal およびチロシン誘導体を基質として多段階反応が進行し、一挙に複雑なペプチド骨格が構築されることが示された [1)]。３種の NRPS のうち、*sfmC* を除く残り２種の NRPS 遺伝子（*sfmA*、*sfmB*）は SfmC の基質である myristoyl-alanyl-glycinal の合成に関与していると考えられた。そこで今回この２種の NRPS の *sfmA*、*sfmB* 遺伝子について大腸菌異種発現系を用いた機能解析を試みた。

【方法】サフラマイシン全生合成遺伝子は放線菌から単離され、全長約 50kb と巨大なクラスター構造をとることが明らかにされた。そのクラスターの中にはテトラヒドロイソキノリン骨格を構築する３種の NRPS（*sfmA,sfmB,sfmC*）の存在が示された。*sfmC* に関しては大腸菌発現による組換え酵素を用いた解析がなされた。そこで *sfmA* および *sfmB* についても同様に大腸菌発現を試みるため、大腸菌を宿主とする発現プラスミドを構築した。*sfmA* は脂肪酸である myristic acid を基質とするドメインと *L*-alanine を基質とするドメインが 1 種のモジュール内に存在することが示唆された。このモジュールを myristic acid を基質とするドメインと L-alanine を基質とするドメインの２つの酵素に分割し、発現プラスミドを構築した。得られた発現プラスミドでそれぞれ *sfp* 遺伝子が染色体上に導入された大腸菌 BAP1 を形質転換し IPTG を用い発現誘導した。得られた組換え酵素を用いて、myristic acid、myristoyl-CoA、L-alanine、glycine および有機合成した myristoyl-alanine の *N*-acetylcysteamine 誘導体を基質として pH 7 のリン酸の緩衝液中で ATP 存在下、酵素反応を行った。アルカリ加水分解により酵素から酵素反応生成物を切り出した後、酸性条件下、酢酸エチルによって抽出した。その抽出物を LC-MS を用いて分析した。

【結果】SfmA は myristic acid 及び L-alanine から myristoyl-alanine を SfmB は myristoyl-alanine の *N*-acetylcysteamine 誘導体と glycine から myristoyl-alanyl-glycine をそれぞれ合成することが明らかとなった。サフラマイシン骨格合成に必要な脂肪酸ジペプチドが SfmA および SfmB によって合成されることが証明された。現在、SfmA、SfmB、SfmC によるテトラヒドロイソキノリン骨格構築によるプレサフラマイシンの合成およびその誘導体合成に関して検討中である。

【文献】1) Koketsu, K.*et al*. *Nat. Chem. Biol*. **2010**, *6*, 408.　2) Li, L.*et al*. *J. Bacteriol*. **2008**, *190*, 251.

Nonribosomal peptide synthetase, Biosynthesis, Anticancer agent

講演番号：2A06a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ A校舎06会場

生合成遺伝子の異種発現による抗腫瘍性生物活性物質サフラマイシンの合成

Engineered biosynthesis of saframycin in *Saccharomyces cerevisiae*

○猿渡隆佳[1]，鰐渕清史[1]，北野達也[1]，野口博司[1]，守屋央朗[2]，渡辺賢二[1]（[1]静岡県立大薬，[2]岡山大学異分野融合先端研究コア）

○Takayoshi Saruwatari[1], Kiyofumi Wanibuchi[1], Tatsuya Kitano[1], Hiroshi Noguchi[1], Hisao Moriya[2], Kenji Watanabe[1] ([1]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [2]Research core for interdisciplinary sciences, Okayama University)

【目的】テトラヒドロイソキノリン骨格を持つサフラマイシン類を始め、この構造類縁体には抗腫瘍性活性が報告されており、中でもホヤ*Ecteinascidia turbinate*由来ecteinascidin 743は現在臨床応用が強く期待されている。こうした天然物は、生産起源からの生産量が極めて低く安価な生産系の確立が早期に望まれる。そこで抗腫瘍活性物質サフラマイシンの生合成遺伝子をプラスミドベースの生合成経路として再構築することでサフラマイシン類の効率的合成を目的とした。
【方法】サフラマイシン全生合成遺伝子は放線菌*Streptomyces lavendulae*から単離され、全長約50 kbと巨大なクラスター構造をとることが明らかにされている[1)]。そして大腸菌発現によって得たSfmCを用いた *in vitro*合成系でサフラマイシン骨格が構築されることが示されており[1)]、本クラスターがサフラマイシン生合成に関与していることが改めて証明された。そこで酵母*Saccharomyces cerevisiae*を宿主としたサフラマイシン類合成を試みた。酵母を宿主とした合成システムの構築に関して、目的化合物のテトラヒドロイソキノリン骨格を生合成すると予測され、基本骨格構築に関わる分子量約150 kDaの3個の非リボソーム依存性ペプチド合成酵素（nonribosomal peptide synthetase, NRPS）*sfmA*、*sfmB*、*sfmC*と修飾酵素遺伝子*sfmD*、*sfmM1*、*sfmM2*、*sfmM3*、*sfmO2*の合計8個の生合成遺伝子群を4種類の異なる栄養要求性マーカー（*LEU2*、*HIS3*、*TRP1*、*URA3*）を持つ発現ベクターへ導入した。さらに、NRPSを効率的にホロ化するためにホスホパンテテニル基転位酵素遺伝子*sfp*を宿主染色体上へ導入した。合計8個の生合成酵素をウエスタンブロッティングによって確認した後、サフラマイシン類の生産確認を行った。
【結果】酵母染色体に導入した*sfp*およびプラスミド上の8個の生合成遺伝子を発現させた後、ウエスタンブロッティングによって酵素へ翻訳されていることを確認した。導入した全ての酵素の存在が確認されたため、続いてサフラマイシン類生産検討を行った。プラスミドのコピー数の調整および各プラスミドへと導入する遺伝子の数およびそれらの組み合わせにより、サフラマイシン類の生産量に違いが見られることが明らかとなった。その結果、8個の生合成遺伝子群を導入した酵母をYPD液体培地で培養したところ、微量ながらサフラマイシン類の合成が示唆された。現在これら条件を最適化し、高収率なサフラマイシン合成系の構築を目指している。
【文献】1) Li, L.*et al*. *J. Bacteriol*. **2008**, *190*, 251-263. 2) Koketsu, K.*et al*. *Nat. Chem. Biol*. **2010**, *6*, 408-410.

Biosynthesis, Nonribosomal peptide synthetase , Anti-cancer agent

講演番号:2A06a11
講演日時、会場:3月23日11:10～ A校舎06会場

タイトル　生合成遺伝子群の転写因子発現によるazaphilone系天然物の合成

Title　Overexpressing transcriptional regulator in *Chaetomium globosum* activates a silent biosynthetic pathway : evaluation of azaphilone biosynthesis

○杉本 覚、石内 勘一郎、中沢 威人、恒松 雄太、石川 格靖、野口 博司、守屋 央朗[1]、渡辺 賢二
（静岡県大・薬、[1]岡山大・異分野コア）

○ Satoru Sugimoto,Kan'ichiro Ishiuchi, Takehito Nakazawa,Yuta Tsunematsu, Noriyasu Ishikawa,Hirosi Noguchi,Hisao Moriya[1],Kenji Watanabe (School of Pharmaceutial Sciences,University of Shizuoka, RCSI,Okayama University[1])

【目的】これまでに多数の糸状菌ゲノムが解読されてきた。それらの解析結果から糸状菌のゲノム上には非常に多くの二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在していることが示唆された。それら生合成遺伝子クラスターの中で、生合成産物の化学構造が決定されてないものが多数含まれていることもあわせて推定された。さらに、トランスクリプトーム解析の結果から、多数のクラスターが不活性化されており、通常の研究室における培養条件化では発現していないことが予測されている。我々は何種類かの糸状菌種を用いて、このような不活性型の遺伝子クラスターを活性化させ、新規化合物獲得をすることを目的として研究に着手した。本発表では生合成遺伝子クラスターを多数コードし、有用二次代謝産物が複数単離されてきた糸状菌*Chaetomium globosum* を用いてゲノム上にコードされた生合成遺伝子クラスターを分子遺伝学的手法により活性化させ、これら遺伝子群が生合成する天然物を同定することに成功したので報告する。
【方法】*C.globosum* 由来ポリケタイド系およびペプチド系天然物の生合成遺伝子クラスターの近傍にはDNA結合性タンパク質をコードする遺伝子をしばしば見いだすことができる。これらタンパク質の機能に関して、遺伝子クラスターの中に存在しているものは正の転写因子であると示唆されている。そこで転写因子と推定された遺伝子をアクチンプロモーターの下流に連結し、強制発現可能な発現ベクターを構築した後、得られたベクターを用いてプロトプラスト-PEG法を用いて*C.globosum* を形質転換した。
【結果】本形質転換体からRT-PCRにより得られた形質転換体および野生株のクラスターの遺伝子発現を比較したところ、ポリケタイド合成酵素を含む遺伝子クラスターの転写が活性化された。さらに、培地抽出物のLC-MSによる解析の結果、特定の二次代謝物質の生産が顕著に増加していることが確認できた。本化合物は、各種スペクトル解析の結果、chaetoviridin B と同一の化学構造であることが明らかとなった。本結果から不活性型遺伝子クラスターの活性化による物質生産が可能であると示された。さらに、本ポリケタイド合成酵素を用いた異種発現による*in vitro* 反応の結果から、これら化合物の生合成経路の詳細を明らかにすることができた。

fungi, polyketide, transcriptional factor

講演番号：2A06a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ A校舎06会場

Spirotryprostatin類の生合成研究

Biosynthetic study of spirotryprostatins

○恒松 雄太、石川 格靖、野口 博司、守屋 央朗[1]、渡辺 賢二（静岡県大・薬、[1]岡山大・異分野コア）

○Yuta Tsunematsu, Noriyasu Ishikawa, Hiroshi Noguchi, Hisao Moriya[1], Kenji Watanabe (Univ. Shizuoka, [1]Okayama Univ.)

[背景・目的]

spirotryprostatin 類は静岡県大井沖海底土壌より分離された糸状菌 *Aspergillus fumigatus* BM939 株より発見された化合物である。本化合物はほ乳類動物細胞株に対し G2/M 期にて細胞周期の停止を促すことから、新たな抗がん剤のリード化合物として期待されている。ところが、*A. fumigatus* の培養液 400 L からわずか数 mg ほどしか得られない超微量成分であることが障害となり、その分子標的や作用機序についての解析や臨床応用への道が閉ざされている。ところで、本化合物は 5 つもの環が連続して縮環した特異な化学構造を持つ。なかでも、オキシインドール環とジケトピペラジン環がスピロ炭素を介して連なる点は非常に興味深いが、その生成機構は不明である。我々は、その化学構造に含まれる特異なスピロ環構造の構築機構の解明を目指すとともに、本化合物の量的供給を達成するため研究を開始した。

[方法・結果]

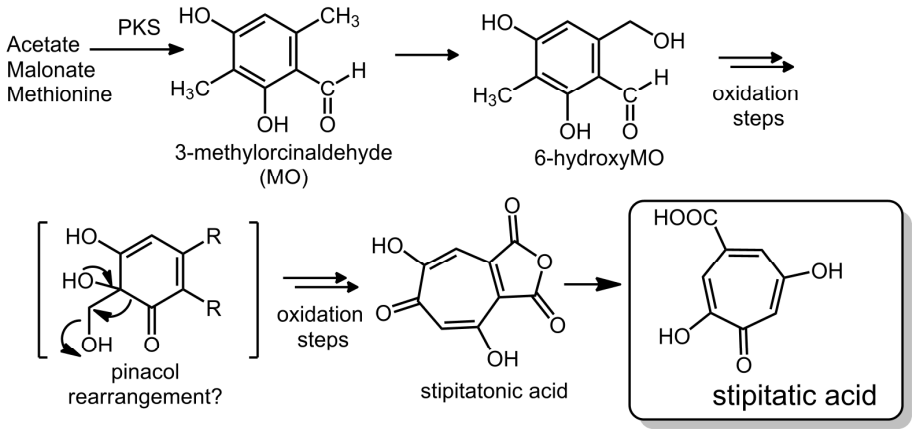
spirotryprostatin 類を生合成するために必要な全ての遺伝子について、出芽酵母の遺伝子強制発現システムを利用することで、*in vivo* 合成系にて spirotryprostatin 類を生合成させることを試みた。*A. fumigatus* より調製したゲノム DNA または cDNA をもとに、NRPS(FtmA)、プレニル基転移酵素(FtmB)、シトクロム P450 酵素(FtmE)の各遺伝子をガラクトース誘導にて発現可能な自立複製型プラスミドへと導入した。一方で、出芽酵母のゲノムを改変することで効率的に二次代謝産物を産生させることを目指した。例えば、*Aspergillus nidulans* 由来ホスホパンテテニル基転移酵素 NpgA やマロニル CoA 合成酵素 MatB などの遺伝子を特定の遺伝子座に導入した出芽酵母株 SCKW5 を作成した。本株を形質転換することで先述したプラスミドを導入し、プラスミドコピー数を上昇させた後、ガラクトース存在下で培養を行い、LC-MS ならびに NMR により代謝産物を解析した。その結果、spirotryprostatin 類の予想生合成中間体である brevianamide F、tryprostatin B および demethoxyfumitremorgin C の産生を確認することができた。なかでも、brevianamide F は 25 mg/L という高収量にて化合物を得ることに成功し、量的供給への道が拓けたと言える。一方、スピロ環化に関与する遺伝子をバイオインフォマティクス解析により推定し、出芽酵母に遺伝子導入したところ、特徴的なスピロ環の形成を確認することができた。本酵素について大腸菌を用いた大量発現にて調製し、tryprostatin B を基質として *in vitro* 反応に供したところ、スピロ環を形成した化合物への変換が確認され、本酵素がスピロ環構築を担うことを証明した。

synthetic biology, metabolic engineering, biosynthesis,

講演番号：2A06a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ A校舎06会場

タイトル *Talaromyces stipitatus* 由来スチピタチン酸生合成経路の解析
Title　Stipitatic acid biosynthetic gene cluster in *Talaromyces stipitatus*
○橋元　誠、上田未希、藤井　勲（岩手医大・薬）
○Makoto Hashimoto, Miki Ueda, Isao Fujii (Iwate Med Univ, Pharm)

【目的】
糸状菌*Talaromyces stipitatus*はポリケタイド化合物のスチピタチン酸を生産する。本化合物は3-methylorcinaldehyde（MO）から数段階の酸化反応を経て生合成されると考えられているが、生合成途中の経路や関連遺伝子は不明である。我々は、*T. stipitatus* のゲノム情報の探索により見出した候補遺伝子クラスター中のポリケタイド合成酵素（PKS）遺伝子がMO生成に関与することを明らかにしている[1)]。さらにこの遺伝子クラスター中にMOの6位メチル基を水酸化する酵素遺伝子を見出し、その機能も同定している。今回、本遺伝子クラスター中の6-hydroxy MOを変換する酵素遺伝子の探索を行ったので報告する。
【方法と結果】
本遺伝子クラスター中にある3つの脱水素酵素遺伝子を6-hydroxy MO変換酵素遺伝子の候補として、それぞれを糸状菌発現用ベクターpTAex3Rにクローニングし、プロトプラスト-PEG法により*Aspergillus oryzae* M-2-3形質転換体を作製した。この形質転換体へ6-hydroxyMOを投与し、得られた培養抽出物をHPLC分析した。その結果、候補遺伝子とした脱水素酵素遺伝子の１つを発現させた形質転換体で新たなピークの生成を確認した。現在、この変換化合物の単離と構造解析を行うとともに、共発現系による生産確認のため、その構築を試みている。



スチピタチン酸の推定生合成経路

1)橋元ら、2011年度農芸化学会大会講演要旨集、p187

polyketide, biosynthesis, Stipitatic acid

講演番号：2A06a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ A校舎06会場

糸状菌の二成分情報伝達系攪乱による二次代謝産物生産誘導

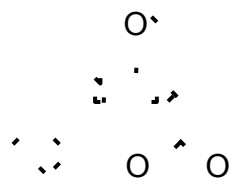
Induction of secondary metabolite production by disturbance of the two-component signal transduction system in a filamentous fungus

○本山 高幸、林 敏明、廣田 洋、長田 裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）
○Takayuki Motoyama, Toshiaki Hayashi, Hiroshi Hirota, Hiroyuki Osada
(Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】糸状菌は二次代謝産物の宝庫であり、医薬などのソースとして利用されてきた。最近のゲノム解析の進展により、糸状菌ゲノム中には予想以上に膨大な数の二次代謝遺伝子が存在することが明らかになってきたが、ほとんどが実験室条件では休眠状態にあるため利用することができない。二次代謝遺伝子が休眠状態にある原因として、ある特定の環境でのみ発現するように厳密な制御を受けていることが想定されている。それならば、環境応答を攪乱することにより、休眠遺伝子覚醒が可能なはずである。今回、モデル植物病原糸状菌であるイネいもち病菌*Magnaporthe oryzae*を用いて、環境応答に関与する二成分情報伝達系因子の遺伝子破壊株を作製して、環境応答攪乱による二次代謝産物生産誘導が可能かどうかを検討した。

【方法】真核生物の二成分情報伝達系はレセプターであるヒスチジンキナーゼ(HK)、リン酸リレーを仲介するタンパク質（HPt)、下流にシグナルを伝えるレスポンスレギュレーター（RR）の３成分からなる。イネいもち病菌ゲノム中にはHK遺伝子が10個、HPt遺伝子が1個、RR遺伝子が2個存在する。HPt遺伝子*MoYPD1*を破壊することにより二成分情報伝達系を攪乱して、二次代謝産物生産の変化を解析することにした。ただし、HPt遺伝子破壊により下流のp38 MAPキナーゼOsm1が常時活性化されて致死的になることが予想されたため、Osm1の遺伝子破壊株Δ*osm1*を作製した後に、HPt遺伝子破壊を行い、二重遺伝子破壊株Δ*osm1* Δ*MoYPD1*を作製した。このHPt遺伝子破壊株を用いて、二次代謝産物の解析を行った。

【結果】HPt遺伝子破壊株の培養液中で二つの代謝産物の生産が誘導されていることを見出した。これら二つの代謝産物は質量が16違いで同様のUV吸収パターンを示すことから、類縁体であると予想された。これらの代謝産物を精製して、質量分析及びNMRによる構造決定を行った。一つは、イネいもち病菌と近縁の植物内共生菌（エンドファイト）などでの生産が報告されているポリケタイド化合物nectriapyroneであり、もう一つはその水酸化類縁体で新規物質であるhydroxynectriapyroneであることが明らかとなった。nectriapyroneの生産をイネいもち病菌で確認したのは初めてである。nectriapyroneに関しては*Staphylococcus aureus*に対する抗菌効果が報告されている。以上の結果から、環境応答攪乱による二次代謝産物生産誘導が可能であることが明らかとなった。



nectriapyrone

本研究の一部は、生研センターイノベーション創出事業による支援を受けた。

Magnaporthe oryzae, secondary metabolism, silent gene cluster activation

講演番号：2A06a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ A校舎06会場

機能未知生合成遺伝子を活用したポリケタイド系天然物の合成

Establishing a New Methodology for Genome Mining and Biosynthesis of Natural Products

○石内勘一郎[1]、中沢威人[1]、大熊貴士[1]、野口博司[1]、守屋央朗[2]、渡辺賢二[1]（[1]静岡県大・薬、[2]岡山大学異分野融合先端研究コア）

○Kan'ichiro Ishiuchi[1], Takehito Nakazawa[1], Takashi Ookuma[1], Hiroshi Noguchi[1], Hisao Moriya[2], Kenji Watanabe[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Okayama University)

【目的】真菌のゲノム上には、生合成遺伝子はコードされているが天然物として生産を確認できない化合物が多数存在する。本研究の目的は、真菌が持つ潜在的なポリケタイド系天然物の生合成能力を酵母および糸状菌を宿主として発現させ、新規化合物獲得の方法論を確立することにある。
【方法】ポリケタイド系天然物を*de novo*合成する目的で、ポリケタイド合成酵素(polyketide synthase, PKS)をコードしていると推定された生合成遺伝子をそれぞれ出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*へ導入し、目的化合物を合成する発現システムを構築した。それぞれ生合成遺伝子は、糸状菌から単離されたmRNAを用いてcDNAを合成し、完全長読み枠とした。得られた遺伝子を自己複製可能なプラスミドpTOWug2-836へ導入し目的の発現ベクターを構築した。pTOWug2-836はアミノ酸栄養要求性選択マーカーとして、L-ロイシン生合成遺伝子の一つである*LEU2*を持つ。この*LEU2*遺伝子のプロモーター配列を改変し、ロイシン欠損培地を用い目的のプラスミドのコピー数を増加させることによって、目的の遺伝子を高発現させることを可能とした。宿主とする出芽酵母には、目的の合成酵素をホロ化する酵素遺伝子である*npgA*と開始基質であるmalonyl-CoAを供給する遺伝子*matB*を導入したものを用いた。*npgA*と*matB*のプロモーターには双方向転写活性をもつGAL1-10プロモーターを用い、ガラクトースを添加することで目的の遺伝子を発現させる。また、PKSをコードしていると推定されるが極めて転写活性の低い生合成遺伝子については、エタノールを用い転写誘導することができる遺伝子発現ベクターを構築した後、これを糸状菌のゲノムへ導入し過剰発現させることによって目的化合物を獲得することができるシステムへと導いた。
【結果】酵母を宿主とした生合成遺伝子の異種発現システムにおいては、７種のポリケタイド系天然物の*de novo*合成に成功した。得られた化合物の構造をNMRおよび誘導化等の有機化学的手法により帰属した。糸状菌を宿主とした過剰発現型の化合物生産システムに関しては、エタノール誘導後、RT-PCRによってmRNAの転写活性を確認した。その結果、抑制されていた生合成遺伝子の転写が活性化されていることが明らかとなった。現在、目的化合物の生産条件について検討中である。

biosynthesis, PKS, putative gene cluster

講演番号：2A06p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ A校舎06会場

タイトル Quinocarcin 生合成における tetrahydroisoquinoline 骨格構築機構の解明：第一報

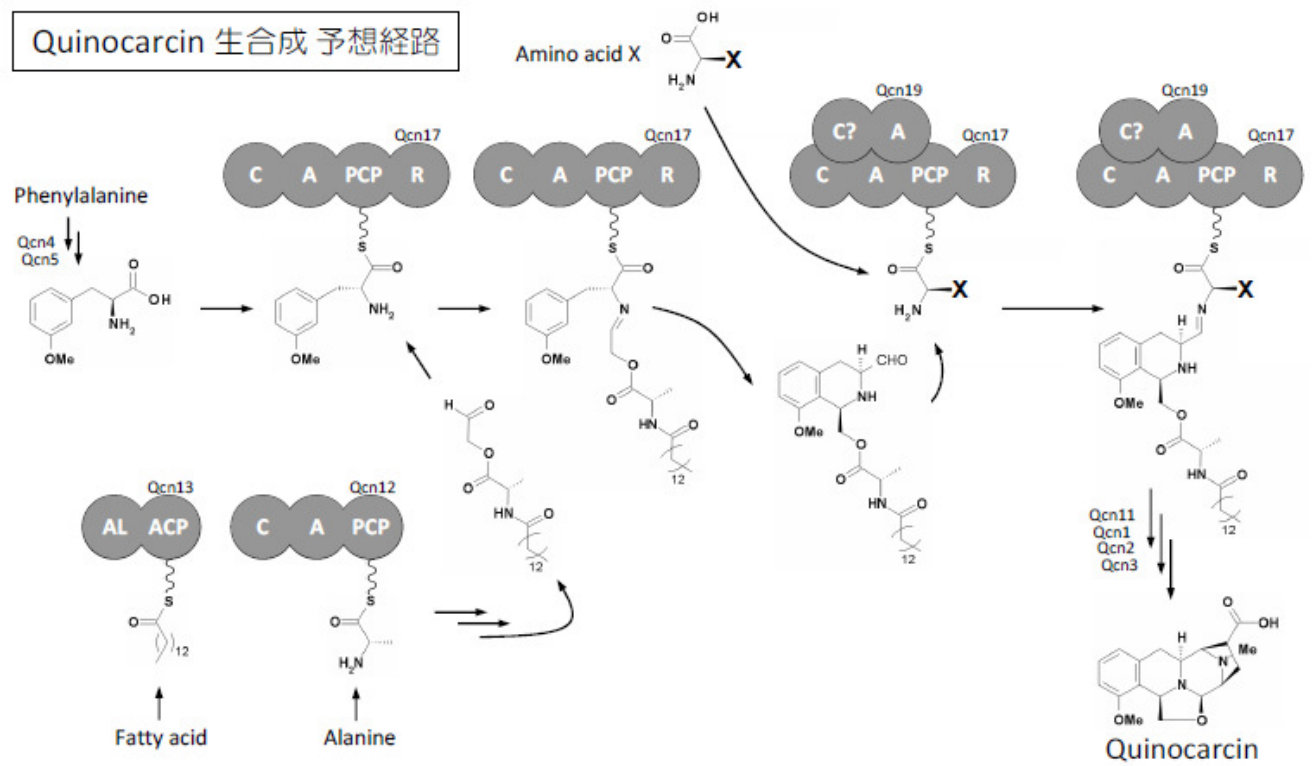
Title Biosynthetic studies of the tetrahydroisoquinoline skeleton in quinocarcin biosynthesis

○平塚 知成、金子 峻輔、纐纈 健人、南 篤志、大栗 博毅、及川 英秋（北大院理）

○Tomoshige Hiratsuka, Shunsuke Kaneko, Kento Koketsu, Atsushi Minami, Hiroki Oguri, Hideaki Oikawa (Hokkaido Univ.)

【目的】 *S. melanovinaceus* DO52 の NRPS により生合成される quinocarcin は tetrahydroisoquinoline を骨格に持つ saframycin系の抗腫瘍性化合物である。 本研究では quinocarcin 生合成遺伝子群を決定し、その生合成経路を明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】 *S. melanovinaceus* DO52 のゲノム配列上に saframycin の tetrahydroisoquinoline 骨格生合成遺伝子である *sfmC* と相同性を持つ配列を探索した結果、*sfmC* に相同性を示す遺伝子(*qcn17*)を含む、quinocarcin 生合成遺伝子群と考えられる 23 の ORF からなる遺伝子クラスターが見出された。また、そのクラスター内の遺伝子と saframycin 生合成遺伝子を比較し quinocarcin 生合成経路を推定した結果、一つの NRPS (Qcn17) が二種類のアミノ酸をチャージする特異な二段階の反応を行なうと予想された。さらに、そのクラスター内の遺伝子を破壊した結果、破壊株培養液中において quinocarcin 生産量の減少および quinocarcin 中間体関連化合物の蓄積が確認された。



Quinocarcin, Tetrahydroisoquinoline, biosynthesis

講演番号：2A06p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ A校舎06会場

糸状菌発現系を用いた糸状菌由来生物活性天然物の汎用的物質生産法の開発

Development of versatile production method of bioactive metabolites using fungal expression system

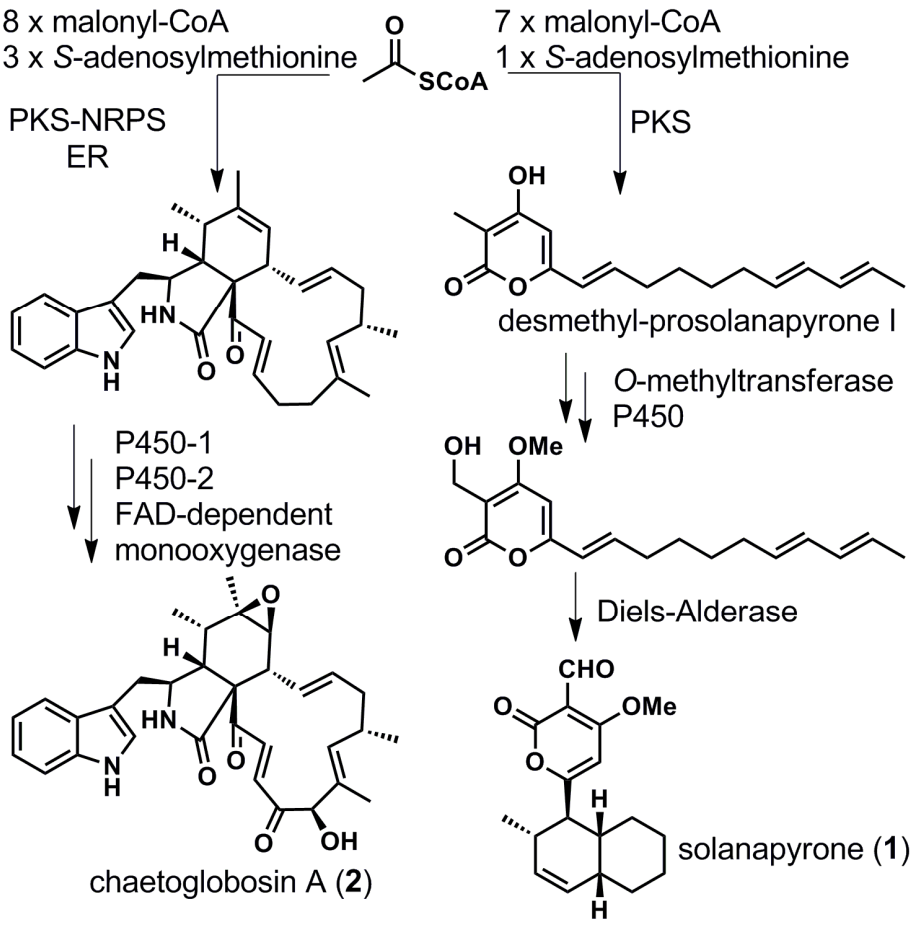
○藤居瑠彌[1]、南篤志[1]、藤田悠太[1]、五味勝也[2]、及川英秋[1]（北大院理[1]・東北大院農[2]）

○Ryuya Fujii, Atsushi Minami, Yuta Fujita, Katsuya Gomi, Hideaki Oikawa (Hokkaido Univ., Tohoku Univ.)

【目的】本研究は糸状菌代謝産物の汎用生産法開発の一環として、**i)**麹菌を宿主とした複数遺伝子同時発現系の検証、**ii)**有機合成が困難な天然物の短段階全生合成、**iii)**生合成遺伝子クラスターの機能解析を目的としている。標的化合物に、ポリケタイドを選択し、solanapyrone A（**1**）、chaetoglobosin A（**2**）の酵素的全合成を検討する。

【方法と結果】我々は、*Alternaria solani*から単離された**1**は4種、*Chaetomium globosum*から単離された**2**は5種の酵素によって生合成されると予想した。すなわち、これらの酵素遺伝子を麹菌に導入することで、天然物が得られると期待できる。宿主に用いた*A. oryzae* NSAR1株は栄養要求性の4重変異株であり、変異を相補する遺伝子をもつベクター(pTAex3, pAdeA, pUSA, pUNA)および、薬剤耐性遺伝子をもつベクター(pPTRI)の計5つを用いて形質転換することで、複数の遺伝子の導入が可能である。

初めに**1**の骨格合成に重要なポリケタイド合成酵素遺伝子をpTAex3に組み込み、宿主に導入した。形質転換に成功した株を選抜し、誘導剤を添加した培地で培養した。これにより、生合成中間体desmethyl-prosolanapyrone Iが米培地100 gあたり12 mgの収量で得られた。現在、全ての遺伝子導入用プラスミドの構築に成功したため、順次形質転換を行い、**1**および**2**の酵素的全合成を検討している。



Heterologous expression, Polyketide, Aspergillus oryzae

講演番号：2A06p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ A校舎06会場

インドールジテルペン・パキシリンの生合成研究；生合成遺伝子の異種発現による生産検討

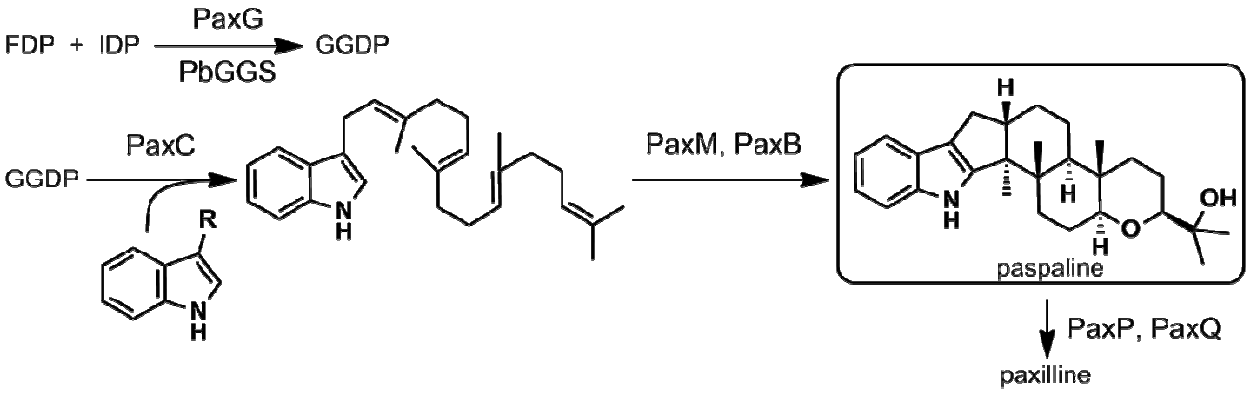
Biosynthetic study of indole-diterpene paxilline ; production study by using heterologous-expression of biosynthetic genes

○田上紘一[1]、南篤志[2]、笛木周平[2]、七條好宏[2]、及川英秋[2]（北大理[1]・北大院理[2]）
○Koichi Tagami, Atsushi Minami, Shuhei Fueki, Yoshihiro Shichijo, Hideaki Oikawa (Hokkaido Univ.)

【目的】糸状菌*Penicillium paxilli*から単離されたパキシリンは、インドール骨格とテルペノイド骨格が融合したメロテルペノイドである。本化合物はマイコトキシンであり、その生産機構について興味が持たれ、研究が進められている。これまでに行われた生合成遺伝子クラスターの解析と遺伝子破壊実験などから、パキシリンはわずか６種の酵素により生合成されることが明らかにされている(*Mycolo. Res.* **2008**, *112*, 184.)。しかしながら、コア構造にあたるパスパリンの構築を担う４種の酵素機能については不明な点が数多く残っている。そこで本研究では、麹菌を利用した異種発現系を利用し、各酵素機能の解析を目的とした。

【方法】麹菌*Aspergillus oryzae NSAR1*株は、異種発現に利用される汎用宿主であり、４つの遺伝子が欠損または変異している(*ΔargB*, *sC*$^-$, *adeA*$^-$, *niaD*$^-$) (*FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *239*, 74.)。変異を相補するベクター(pTAex3, pUSA, pAdeA, pUNA)にパスパリン生合成遺伝子を導入し、プラスミドを構築することで、目的遺伝子の異種発現が可能になる。実際、我々はすでに麹菌内で複数の遺伝子を同時に発現することで、ジテルペン化合物アフィディコリンの異種株生産に成功している(*Biosci. Biotech. Biochem.* **2011**, *75*, 1813.)。本研究では、パスパリン生合成に関与する４つの遺伝子を順次導入し、各形質転換体の代謝産物を解析することで各酵素の機能解析を行った。

【結果】我々はまず、パスパリン生合成に関与する３つの遺伝子(*paxC*, *paxM*, *paxB*)を３種のベクター(pTAex3, pUSA, pAde)に組み込んだ。構築したプラスミドを、PaxG ホモログである PbGGS を発現する *A. oryzae* NSAR1 株に導入した。また、*paxC* を導入した２重形質転換体、さらに *paxM* を導入した３重形質転換体を作製した。これらの培養を行い、複数の新規化合物の標品と代謝産物との比較により、同定を行っている。（予想される酵素機能 : PaxG ; GGDP synthase, PaxC ; prenyltransferase, PaxM ; FAD-dependent monooxygenase, PaxB ; cyclase, PaxP ; cytochrome P450 monooxygenase, PaxQ ; cytochrome P450 monooxygenase）



indole-diterpene, paxilline, biosynthesis

講演番号：2A06p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ A校舎06会場

リベロマイシン生合成における多段階酵素反応の再構築

Reconstruction of multiple enzyme reaction on Reveromycin biosynthesis.

○熊野 匠人、高橋 俊二、長田 裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）
○Takuto Kumano, Shunji Takahashi and Hiroyuki Osada (Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】リベロマイシン A (RM-A) は放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* が生産する I 型ポリケタイド化合物であり [1]、破骨細胞選択的アポトーシス誘導活性 [2]、癌細胞の骨転移抑制活性 [3]を有する。また、その生合成については、RM-A 構造で特徴的なスピロアセタール環の立体特異的環化反応を触媒する RevJ[4]やバイヤー・ビリガー酸化酵素 RevH とエステラーゼ RevN により側鎖の末端が切断されるユニークな PKS 修飾反応を明らかにしている。本研究では、ポスト PKS 修飾反応を *in vitro* で再構築し、RM 生合成機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】I 型 PKS によって生合成された RM-A1a は RevG によって 25 位水酸基が脱水素されてケトンを生じ RM-A2a となる。RM-A2a を基質とする酵素反応は、バイヤー・ビリガー酸化酵素 RevH によりカルボン酸エステル RM-A4a を生成する反応と RevG による連続した 15 位水酸基の脱水素反応の 2 つの分岐経路が予測された。そこで、両酵素の RM-A2a に対する Kinetic parameter を算出したところ RevH は K_m=4.1 nM, k_{cat}=11.4 (min^{-1})、RevG は K_m=13.6 μM, k_{cat}=1.19 (min^{-1}) であり、生理的には RevH が RM-A2a の変換に関わることが強く示唆された。次に、RevH、RevN によるプロピオン酸ユニット切断の有無がスピロアセタール環の形成効率に与える影響について評価するために、RM-A2a と RM-A5a を基質として用いて RevG-RevJ カップリング反応による環化活性を測定した。まず、RevG による環化前駆体 (C15-dehydro 体) の合成に関しては両基質に対する K_m 値は変わらないものの、k_{cat} 値は RM-A5a に対して約 5 倍高くなっていた。さらに、RevJ は上記の反応産物である C15-dehydro-RM-A5a を最も効率的に環化することを見出した。以上の反応を踏まえ、One-Pot 合成による RM-T 生合成反応の再構築を試みた。RevG, RevH, RevN, RevJ に加えて、24 位水酸基をカルボン酸に変換する RevE、RevF の計 6 酵素を RM-A1a と混合し反応産物を HPLC で経時的に解析した。その結果、酵素動力学定数から予想された順序で RM-T を合成することができた。

(1) Osada H., *et al. J Antibiot.* 1991. (2) Woo J.T., *et al. PNAS* 2006. (3)Yano A., *et al. PNAS* 2008. (4) Takahashi S., *et al. Nat. Chem. Biol.* 2011.

Reveromycin, Polyketide, Baeyer-Villiger

講演番号：2A06p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ A校舎06会場

サクシニル化に関わるリベロマイシン生合成遺伝子の機能解析

Analysis of reveromycin biosynthetic genes involved in succinylation

○高橋 俊二、熊野 匠人、大輪田 恵利、高木 海、浦本 昌和、長田 裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー）

○Shunji Takahashi, Takuto Kumano, Eri Oowada, Hiroshi Takagi, Masakazu Uramoto, and Hiroyuki Osada (Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】リベロマイシンA(RM-A)は、ポリケチド合成酵素により炭素鎖を伸長させた後に、バイヤー・ビリガー酸化反応とエステル加水分解によるポリケチド鎖の切断、立体選択的なスピロアセタール環形成[1)]とサクシニル化により生合成される。最終段階の反応は、3級水酸基のエステル化反応と予想されるが、合成化学的アプローチでは1.5 GPa (15,000気圧)という超高圧反応が必要である[2)]。一方、RM-A生産菌は常温・常圧下で容易に反応を行うことができる。そこで、本研究では、生合成遺伝子の同定と有機化学的に困難な反応に関わる酵素の機能解析を目的とした。

【方法及び結果】RM-A生合成クラスター(91 kb)に存在する全遺伝子の破壊株を作製し、それらに蓄積する中間代謝産物の解析を行った。その結果、RevI遺伝子破壊株は、RM-Tを蓄積し、RevI遺伝子を相補することでRM-A生産を回復した。RevI (P450)と基質RM-Tの酵素反応を解析したところC18位が水酸化されたRM-T(RM-T1)の生成を確認した。RevIとRM-Tを用いた共結晶構造解析から、C18位の水酸化に関わる構造基盤が明らかとなった。更に、RevK及びRevL遺伝子破壊株を解析したところ、両者はともにRM-T1を蓄積し、それぞれの遺伝子を再導入することでRM-A生産を回復したことから、RevK、RevLが同時に発現する事が生合成反応の進行に必須である事が判明した。また、RevM遺伝子破壊株では、フマル化したRM-Hが蓄積し、RevM遺伝子を相補することでRM-A生産が回復することが明らかになった。以上の結果から、RevK, RevLの複合酵素反応の基質はフマル酸であること、RevLのAMP結合モチーフから、基質にATPが必要である事を予想した。そこで、大腸菌 BL21(DE3)を用いてRevK、RevLを異種発現し、RM-T1、フマル酸、ATPを基質として用いて酵素反応をLC-MSで解析したところ、RM-Hの生成を確認することができた。

(1) Takahashi S., *et al. Nat. Chem. Biol.* 2011. (2) Shimizu T., *et al. Synthesis* 2001.

succinylation, reveromycin, post-PKS modification

講演番号:2A06p07
講演日時、会場:3月23日15:05～ A校舎06会場

2-アルキルマロニル-CoA生合成機構の解析

Analysis of 2-alkylmalonyl-CoA biosynthesis

○宮澤　岳[1,2]、高橋　俊二[1]、大輪田　恵利[1]、林　輝雄[1]、清水　猛[1]、野川　俊彦[1]、松本　幸次[2]、長田　裕之[1,2]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー、[2]埼玉大院・理工学）

○Takeshi Miyazawa[1,2], Shunji Takahashi[1], Eri Oowada[1], Teruo Hayashi[1], Takeshi Shimizu[1], Toshihiko Nogawa[1], Kouji Matsumoto[2], Hiroyuki Osada[1,2]

([1]Chem. Biol., RIKEN ASI, [2]Saitamadai)

【目的】放線菌*Streptomyces reveromyceticus* が生産するリベロマイシンA (RM-A)は、破骨細胞選択的にアポトーシスを誘導し、腫瘍の骨転移を抑制することから、骨関連疾患治療薬としての開発が期待されている。そこで、我々はRM-A生合成遺伝子クラスターを取得し、新規活性誘導体創製に向けて生合成遺伝子群の機能解析を進めている。*S. reveromyceticus* はRM-Aの他にRM-C、RM-D、RM-Eを生産するが、これらの構造多様性は、特定のポリケチド伸長鎖へのブチルマロニル-CoA、ペンチルマロニル-CoA、イソペンチルマロニル-CoA、ヘキシルマロニル-CoAの取り込みに起因すると考えられる。このような2-アルキルマロニル-CoA生合成機構を解明することは、RM-Aだけでなく様々なポリケチド化合物の多様化に向けて重要である。近年、クロトニル-CoA還元酵素(Ccr)によるエチルマロニル-CoA生合成機構の発見をきっかけとして、サリノスポラミドAのクロロエチルマロニル-CoA及びFK506のアリルマロニル-CoA生成に関わる還元・カルボキシル化酵素の存在が明らかとなった。一方、ポリケチド合成酵素により炭素骨格に取り込まれるこれらのユニークなCoA生合成に関わる遺伝子の構成は多様である。本研究では、RM-A生合成遺伝子クラスターに特有の2-アルキルマロニル-CoA生合成遺伝子群の機能解析を行った。

【方法及び結果】2-アルキルマロニル-CoA生合成に関わると予想される*revR*、*revS*、*revT*遺伝子の破壊実験を行った。代謝産物を解析したところ、*revR*, *revS*破壊株ではRM類の生産量が減少していた。CcrホモログのrevT破壊株ではRM類の生産が完全に消失したが、ブチルマロニル-SNACを培地に添加することによりRM-Aの生産が回復した。RevT機能を明らかにするために*S. lividans*を用いて異種発現を行い、His8-RevTを均一に精製した。2-ヘキセノイル-CoA及び2-オクテノイル-CoAとの反応を解析したところ、それぞれブチルマロニル-CoA、ヘキシルマロニル-CoAを生成したことから、RevTは還元・カルボキシル化反応を触媒し2-アルキルマロニル-CoAを生合成することが明らかとなった。一方、RevTの基質供給機構を解明するために、CoAリガーゼと推定されるRevSの機能解析を行った。大腸菌を用いてHis8-RevSを調製し、基質特異性を解析したところ、炭素鎖6-10の脂肪酸に特異的なCoAリガーゼであることが判明し、RevTの基質は、RevS反応生成物がβ酸化を経て供給される可能性が示唆された。

alkylmalonyl-CoA, reductase/carboxylase, ligase

講演番号:2A06p08
講演日時、会場:3月23日15:16～ A校舎06会場

β-carboline compounds as biomediator of secondary metabolism in *Streptomyces reveromyceticus*

○Suresh Panthee, Shunji Takahashi, Teruo Hayashi, Takeshi Shimizu, Yushi Futamura, and Hiroyuki Osada (Chem. Biol., RIKEN ASI)

Objective: Diverse regulators inducing the production of secondary metabolites (SMs) among *Streptomyces* species have been identified. In a couple of decade, research has focused on the identification of autoregulatory compounds that are effective on the producing strain at nanomolar concentrations. Nevertheless, few compounds have been shown to induce the production of SMs, when added to the broth externally. In line with this, the production of reveromycin A (RM-A) was enhanced by the addition of tomato juice to culture medium of *Streptomyces reveromyceticus.* This phenomenon led us to speculate that exogenous small molecule, that we define as biomediator, can also induce SMs in this species. Here, we aim to explore such compounds through screening of chemical library (RIKEN NPDepo).

Methods and Results: RM-A has antifungal activity and reverses the transformed morphology of src^{ts}-NRK cells to the normal. *S. reveromyceticus* was cultured with the compounds (1 μg/ml) and the enhanced production of RM-A was assayed by applying the biomediator treated broth to *Magnaporthe oryzae* and src^{ts}-NRK cells. NPD2639, a β-carboline compound was identified from the screening of 3155 compounds. Structure-activity relationships study based on the compounds available from NPDepo identified NPD2683 as a more potent biomediator and shed light into the two key side chains responsible for biomediator activity. Modification of these side chains was performed by chemical synthesis in order to enhance the potency of biomediator.

This work was supported in part by the Program for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry.

Key words: biomediator, ß-carboline, NPDepo

講演番号：2A06p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ A校舎06会場

新規ヌクレオシド系抗生物質A-94964の生合成遺伝子の同定

Identification of the biosynthetic gene cluster of a nucleoside antibiotic A94964 produced by *Streptomyces* sp. SANK60404

○白石　太郎、葛山　智久、西山　真（東大生物工学セ）
○Taro Shiraishi, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama (Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo)

【目的】A-94964はTranslocase I阻害活性スクリーニングにより、*Streptomyces* sp. SANK60404株の培養液から発見された新規ヌクレオシド系抗生物質である[1,2]。その構造は不飽和脂肪酸やアミノ糖、リン酸ジエステル、ウリジンを含むユニークなものとなっており、その生合成研究が新たな酵素の発見や新規化合物の創成につながることが期待される。また、SANK60404株は数多くのA-94964類縁体も生産することから、それらの生合成にも興味がもたれる。本研究では、次世代シーケンサーを利用してA-94964の生合成遺伝子を推定し、その遺伝子群を*Streptomyces albus* G153株で異種発現させることでA-94964の生合成遺伝子クラスターの同定を試みた。
【方法・結果】SANK60404 株のドラフトゲノムシーケンスを解析し、A-94964 の生合成遺伝子クラスターの一部を含むと考えられる contig を同定した。その一部の領域を含む DNA をプローブとして SANK60404 ゲノムライブラリーから約 40 kbp の遺伝子断片を含むコスミドを取得した。本コスミドをプロトプラスト／PEG 法により *S. albus* G153 株に導入し、その形質転換株の培養液を HPLC および LC-MS/MS を用いて分析した。その結果、A-94964 およびその類縁体の生産が確認されたことから、このコスミドは A-94964 の生合成に必要な全ての遺伝子を含むと結論し、その全塩基配列を決定した。その結果、このコスミドには 30 個の ORF からなる遺伝子群があり、その中には Type I PKS/FAS ホモログが存在することが判明した。次に、この Type I PKS/FAS ホモログを破壊したコスミドを作製し、そのコスミドを導入した *S. albus* G153 形質転換体の培養液を分析したところ、A-94964 およびその類縁体の生産性は失われていた。以上の結果から、Type I PKS/FAS ホモログが A-94964 の脂肪側鎖の合成に関わっていることが示唆された。これは、Type I PKS/FAS ホモログがヌクレオシド系抗生物質の生合成に関与している初めての例である。
【参考文献】(1) R. Murakami, *et al* ., J. Antibiot. 61(9): 537-544, 2008. (2) R. Murakami, *et al* ., J. Antibiot. 61(9): 545-549, 2008.

nucleosde antibiotics, fatty acid synthase, Streptomyces

講演番号：2A06p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ A校舎06会場

ヌクレオシド系化合物caprazamycin生合成におけるCpz23の機能解析

Functional analysis of Cpz23 in the biosynthesis of a nucleoside antibiotic caprazamycin

○廣　昇[1]、五十嵐　雅之[2]、葛山　智久[1]、西山　真[1]（[1]東大生物工学セ、[2]微化研）
○Noboru Hiro[1], Masayuki Igarashi[2], Tomohisa Kuzuyama[1], Makoto Nishiyama[1] (Biotechnol. Res. Ctr. Univ. Tokyo, Inst. Microb. Chem., Tokyo)

【背景・目的】

caprazamycin は *Streptomyces* sp. MK730-62F2 から単離されたヌクレオシド系化合物であり、その化学構造は、特徴的な 3 つの不斉中心を有する 7 員環ジアゼパノン、長鎖アシル基、5-アミノリボース、ウリジン等が複雑に縮合したものである [1]。caprazamycin は細菌のペプチドグリカン生合成における translocase I の働きを阻害することで、抗菌活性を示す。translocase I はペプチドグリカン生合成の初期段階において、UDP-*N*-アセチルムラミン酸-ペンタペプチドから細胞膜上への糖ペプチドの転移反応を触媒する酵素である。translocase I 阻害剤は現在臨床において広く用いられているグリコペプチド系やβ-ラクタム系抗生物質よりもペプチドグリカン生合成経路のより上流に作用する。このため、caprazamycin は MRSA や VRE 等の薬剤耐性菌をターゲットとする創薬においてリード化合物となることが期待されている。caprazamycin 生合成遺伝子クラスター（*cpz* gene cluster）は既に同定されているが [2]、各々の遺伝子の機能に関しては大部分が未解明のままである。本研究では、*cpz* gene cluster 中に見出した lipase と高い相同性を示す Cpz23 の機能を明らかに、得られた知見をより生物活性の高い誘導体創製に応用することを目的としている。

【方法・結果】

MK730-62F2 の *cpz23* 破壊株を二回交叉法によって作製し、その培養抽出液を LC/MS によって分析した。その結果、*cpz23* 破壊株では caprazamycin の生産が完全に失われていた。さらに caprazamycin の 3'''位のアシル基が脱離して水酸基に変換された化合物（caprazol）の生産が確認された。改めて野生株の培養抽出液を分析したところ、caprazol の生産は確認されたが、生産量が *cpz23* 破壊株の 3 分の 1 程度であることがわかった。*cpz23* 破壊株に *cpz23* 発現プラスミドを導入し、*cpz23* 相補株を作製したところ、caprazamycin の生産性が回復し、caprazol の生産量は野生株と同程度に減少した。これらの実験結果から、caprazol が caprazamycin の生合成中間体であること、および Cpz23 が caprazol へのアシル基転移反応を触媒することが示唆された。さらに Cpz23 を大腸菌内で大量発現・精製したところ、可溶化した組換え酵素が得られた。現在は反応基質を検討し、Cpz23 の活性の検出を試みている。

【参考文献】

(1) Igarashi, M. *et al. J. Antibiot.* 56, 580-583, 2003.
(2) Kaysser, L. *et al. J. Biol. Chem.* 284, 14987-1496, 2009.

nucleoside antibiotic, Streptomyces, lipase

講演番号：2A06p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ A校舎06会場

16員環マクロライドbafilomycin生合成における修飾酵素遺伝子の同定

Identification of tailoring enzyme genes for 16-membered macrolide bafilomycin biosynthesis

○橋本 拓哉、沼田 淳、池田 治生[1]、葛山 智久、西山 真（東大生物工学セ、[1]北里大北里生命研）
○ Takuya Hashimoto, Atsushi Numata, Haruo Ikeda[1], Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama（Biotechnol. Res. Ctr. Univ. Tokyo, [1]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ.）

【目的】ポリケタイド化合物の生合成において、PKSによる基本骨格形成後の修飾反応は、構造多様性を創出する点で重要な役割を担っている。放線菌 *Kitasatospora setae* KM-6054は、液胞型プロトン輸送性ATPase（V-ATPase）の阻害剤であり16員環マクロライド骨格を持つbafilomycin (BFM) Bを生産する。これまでに我々は、BFM生合成遺伝子破壊株の生産するBFM中間体の解析と、BFM生合成遺伝子の一部を導入した*Streptomyces albus* G153の形質転換体によるBFM中間体の変換実験から、まずI型PKSによって基本骨格のBFM Aが形成され、*bfmIJ*によってフマル酸が転移されてBFM Cに変換された後、*bfmKLM*によるC_5Nユニットの付加を受けてBFM Bへと変換されることを明らかにしてきた。ポリケタイド化合物の生合成において、フマル酸付加による修飾反応はこれまでに報告例がない新規な反応である。また、C_5Nユニットはaskamycin、reductiomycinなどの化合物に共通な構造であり、それらの生合成遺伝子クラスター内にも*bfmKLM*と相同性を示す3つの酵素遺伝子が存在し、生合成への関与が示されている[1)]。本研究では、BFM生合成における*bfmI, J, K, L, M*の機能解析を目的としている。
【方法と結果】*bfmI, J, K, L, M*の各遺伝子を大腸菌BL21 (DE3)株を用いて大量発現、精製した組換え酵素を用いて各種酵素反応を行い、HPLCとLC/MSを用いて反応産物の同定を試みた。BfmJとフマル酸、Mg^{2+}、ATPを加えた反応系で反応させた結果、フマル酸のAMP体が検出された。また、BfmIとBfmJの共存下、BFM A、フマル酸、Mg^{2+}、ATPを加えた反応系では、BFM Cが検出されたことから、BfmIJによるBFM AからBFM Cへの変換反応は、BfmJによってフマル酸がAMP体として活性化された後、BfmIによってフマル酸基がBFM Aの21位の水酸基に付加してBFM Cへと変換されることが明らかとなった。フマル酸の代わりにメサコン酸を基質とした反応系においても、BFM Aへの付加反応が検出され、新規なBFM誘導体を合成することができた。BfmK, L, Mの反応では、これら3つの酵素すべてを加えた反応系でのみBFM CからBFM Bが生成した。この結果から、BFM CからBFM Bへの変換には、まずacyl-CoAリガーゼであるBfmMがBfmKによって合成されたアミノレブリン酸にCoAを付加して活性化し、次いで、アミノレブリン酸合成酵素BfmKがC_5Nユニットへの環化にも関与して、最後にBfmLがアミドシンセターゼとしてC_5NユニットをBFM Cに結合させることでBFM Bが生合成されることが強く示唆された。
【参考文献】(1) W. Zhang, et al. *J. Am. Chem. Soc.* 138. 2010.

polyketide, *Streptomyces*, biosynthesis

講演番号：2A06p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ A校舎06会場

Lavanducyanin 生合成における *N*-プレニル化酵素の同定

Identification of *N*-prenyltransferase in lavanducyanin biosynthesis

○尾崎太郎、葛山智久、西山真（東大生物工学セ）
○Taro Ozaki, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama (Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo)

【目的】放線菌*Streptomyces* sp. CL190が生産するlavanducyaninは抗腫瘍活性やテストステロン5-α-リダクターゼ阻害活性を示すため、医薬品への応用が期待されている化合物である。Lavanducyaninはフェナジンの窒素原子にプレニル基が付加した特徴的な構造を有している。同様の構造は抗腫瘍化合物phenazinomycin等の生物活性物質にも見出されるため、フェナジンの*N*-プレニル化が生物活性の発現に重要であると推測される。しかし、これまでにそれらの化合物の生合成におけるプレニル化機構は解明されていない。本研究は、lavanducyaninの生合成研究を通して、フェナジンの*N*-プレニル化機構を明らかにし、有用物質生産の基礎とすることを目的としている。

【方法と結果】Lavanducyanin生産菌ゲノムのドラフトシークエンス解析を行った。得られた塩基配列に対して相同性検索を行い、lavanducyanin生合成遺伝子を探索した。Lavanducyanin生産菌のゲノム上には複数のプレニル基転移酵素遺伝子が見出されたが、それらの遺伝子産物のうちの一つが、フェナジンの炭素原子のプレニル化を触媒するPpzPと31%の相同性を示すことが判明した。また、lavanducyaninと同じ1-フェナジノン構造を持つpyocyanin生合成に関わるフラビン依存型酸化酵素PhzSと49%の相同性を示す酵素遺伝子を見出すこともできた。PpzPホモログ遺伝子欠失株を作製し、その代謝産物を分析したところ、予想通りlavanducyaninの生産能を失い、プレニル基が付加していないフェナジン-1-カルボン酸(PCA)を蓄積した。そこで、PCAがPpzPホモログの基質となると考え、組換えタンパク質を用いたプレニル化反応を試みたが、予想に反して活性を検出することはできなかった。Pyocyanin生合成ではPCAの*N*-メチル化反応はメチル基転移酵素とPhzSが同時に存在するときにのみ進行し、メチル化反応と脱炭酸を伴う酸化反応が同時に起こることが報告されている[1,2]。Lavanducyaninの構造がpyocyaninに類似していることから、*N*-プレニル化が*N*-メチル化と同様の機構で進行すると仮定し、PpzPホモログとPhzSホモログの組換えタンパク質を同時に調製し、PCAの変換反応を試みた。その結果、PpzPホモログとPhzSホモログ共存下でのみPCAのプレニル化、脱炭酸を伴う酸化反応が進行した。これらの結果によって、lavanducyanin生合成における*N*-プレニル化機構を初めて明らかにすることができた。

【参考文献】(1) J. F. Parsons, *et al. Biochemistry*, 46, 1821-8, 2007. (2) B. T. Greenhagen, *et al. Biochemistry*, 47, 5281-9, 2008.

prenyltransferase, phenazine, biosynthesis

講演番号：2A06p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ A校舎06会場

放線菌由来新規ジテルペン環化酵素の機能解析

Functional characterization of diterpene cyclases found in *Streptomyces* genomes

○目黒　亜由子[1]、池田　治生[2]、大村　智[3]、葛山　智久、[1]西山　真[1]（[1]東大・生物工学セ、[2]北里大・北里生命研、[3]北里大）

○Ayuko Meguro[1], Haruo Ikeda[2], Satoshi Ohmura[3], Makoto Nishiyama[1], and Tomohisa Kuzuyama[1]（[1]Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo, [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ., and [3]Kitasato Univ.）

【目的】テルペノイド化合物の構造多様性は、ゲラニル二リン酸 (C_{10})、ファルネシル二リン酸 (C_{15})、ゲラニルゲラニル二リン酸 (C_{20}; GGPP)のような直鎖状のポリプレニル二リン酸基質から構築される。環状テルペン化合物の生合成過程では、これらの基質がテルペン環化酵素の触媒作用によって環化され、ジテルペン環化酵素 (GGPP cyclase) は直鎖状のGGPPを単環または多環といった多様な構造の環状テルペン化合物へと変換するための鍵酵素である。しかしこれまでに、原核生物からクローニングされ、性状解析されたジテルペン環化酵素はごく限られている。今回、ヌクレオシド系抗生物質A94964の生産菌である*Streptomyces* sp. SANK60404株と、プロテアソーム特異的阻害剤Lactacystinの生産菌である*Streptomyces* sp. OM-6519株から見出したGGPP cyclaseのクローニングと、その環化反応によって生合成されたジテルペン化合物の構造について発表する。

【方法と結果】*Streptomyces* sp. SANK60404 株のゲノム解析の結果、GGPP 合成酵素と隣接して存在するテルペン環化酵素を 2 つ見出した (cyclase1, cyclase2)。これらの推定テルペン環化酵素の組換えタンパク質を調製して、GPP, FPP, GGPP のそれぞれを基質に用いて反応を行った。その結果、何れも GGPP を基質に用いた酵素反応でのみ生成物が確認され、構造解析の結果、cyclase1 からは nephthenol と cembrene C のイソプロピリデン異性体が、cyclase2 からは nephthenol と cembrene A に加えて 15 員環骨格の新規炭化水素化合物が得られたことが明らかとなった。なお、nephthenol と cembrene A は軟質サンゴの *Nephthea* sp.からの単離例が報告されている [1) 2)]。

一方、*Streptomyces* sp. OM-6519株のゲノム解析からは、メバロン酸経路遺伝子群、GGPP合成酵素、シトクロームP450、テルペン環化酵素と相同性の高い配列がクラスターを形成していることを見出した。この推定テルペン環化酵素についても、GPP, FPPは基質とせず、GGPPを基質に用いた酵素反応でのみ生成物が確認され、反応産物の構造解析の結果、5-8-5員環骨格を持つ新規炭化水素化合物、cyclooctat-7,10(14)-dieneであることが明らかとなった。本酵素の酵素学的パラメーターは、K_m = 46.0 ± 3.7 μM, k_{cat} = 6.3 × 10^{-2} sec^{-1}と算出され、同様に5-8-5員環骨格を持つ炭化水素化合物cyclooctat-9-en-7-olを生成するGGPP環化酵素CotB2 [3)]のそれらとほぼ同程度であった。

【参考文献】(1) F. J. Schmitz, et al. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 407, 1974. (2) D. J. Vanderah, et al. *J. Org. Chem.* 43: 1614, 1978. (3) S-Y. Kim, et al. *Chem. Biol.* 16: 736, 2009.

Keywords; geranylgeranyl diphosphate, cyclase, streptomyces

講演番号：2A06p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ A校舎06会場

抗生物質バージニアマイシンS基質供給遺伝子の機能解析

Functional analysis of phenylglycine biosynthetic genes in production of virginiamycin S, a streptogramin type B antibiotic

○Fitria NINGSIH、木谷 茂、福島 絵里子、仁平 卓也（阪大・生物工学国際交流セ）
○Fitria NINGSIH, Shigeru Kitani, Eriko Fukushima, Takuya Nihira (Osaka University)

Virginiamycin S (VS), produced by *S. virginiae*, is a cyclic hexadepsipeptide antibiotic that belongs to the type B compounds in the streptogramin family, and is composed of two proteinogenic and five nonproteinogenic amino acids including L-phenylglycine. We have found, in the left-hand extremity of the virginiamycin supercluster, two genes (*visG* and *orf6*) that might be involved in VS production by participating in L-phenylglycine biosynthesis. Transcriptional analysis revealed that *visG*, encoding a protein with homology to a hydroxyphenylacetyl-CoA dioxygenase, and *orf6*, encoding a protein with homology to a dihydroxyphenylglycine aminotransferase, are under the transcriptional regulation of virginiae butanolide (VB), a small diffusing signalling molecule that governs production of VS and virginiamycin M (VM) as its synergistic counterpart. Gene deletion of *visG* resulted in complete loss of VS production without any changes in VM production, suggesting that *visG* is required for VS biosynthesis. The abolished VS production in the *visG* disruptant was fully recovered either by the external addition of L-phenylglycine or by gene complementation, which indicates that VisG is involved in VS biosynthesis as the provider of an L-phenylglycine molecule **[1]**.

orf6 gene is situated downstream of *visG*, and is presumed to convert the benzoylformate to L-phenylglycine which would eventually be activated and incorporated into VS by the action of VisF, a nonribosomal peptide synthetase. Disruption of *orf6* affected not only VS production but also VM production. Decreased production of VM is probably due to a polar effect that blocks the activity of Orf7, putative nonribosomal peptide synthetase for VM biosynthesis, encoded by a gene downstream of *orf6*. Currently, gene complementation analysis is underway to confirm the possible involvement of the *orf6* gene in VS biosynthesis.

[1] Ningsih et al. Microbiology (2011) 157: 3213-20.

virginiamycin, streptogramin, phenylglycine

講演番号：2A06p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ A校舎06会場

Streptomyces sp. RK95-74株のゲノム解析と二次代謝産物の生合成遺伝子群

Genome Analysis of *Streptomyces* sp. RK95-74, and Gene Clusters for Secondary Metabolite Biosynthesis.

○植木雅志[1]、小城尚文[1,2]、高橋俊二[1]、大輪田恵利[1]、豊田敦[3]、川崎寿[2]、長田裕之[1]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー、[2]東電大院工・物質工、[3]遺伝研）

○Masashi Ueki[1], Naofumi Koshiro[1,2], Shunji Takahashi[1], Eri Oowada[1], Atsushi Toyoda[3], Hisashi Kawasaki[2], Hiroyuki Osada[1]([1]Chemical Biology, RIKEN ASI, [2]Mat. Sci. Eng, Tokyo Denki Univ., [3]Natl. Inst. Genet.)

【目的】*Streptomyces* sp. RK95-74株は、土壌より分離された放線菌で、アンサマクロライド系抗生物質Cytotrienin Aの生産菌である。我々はこれまでに、さまざまな培養条件を用いて代謝産物の解析を行い、RK95-74株は多様な代謝産物の生産能を有することを示してきた。同株のゲノム解析の結果から、約10.2 Mbのゲノムの中には、13個のPKS遺伝子群、15個のNRPS遺伝子群を含む多くの二次代謝産物生合成遺伝子群が見出されていた。しかしながら、実際に培養液中より得られて同定されている代謝産物は僅かである。これら多くの遺伝子群の機能と実際の代謝産物を関連づけることで、遺伝子がコードするタンパク質の機能が同定でき、さらには非天然物型代謝産物の創製や、それら遺伝子の発現制御解析へと発展が期待される。そこで培地検討と主成分分析により、未知代謝産物を同定することを目的として、まず我々は種々の培養抽出物からの二次代謝産物の検出・同定を行い、ゲノム中にコードされる二次代謝産物生合成遺伝子群から構造予測をあわせ、生合成遺伝子群と代謝産物の関連付けを開始した。

【方法及び結果】これまでに我々が行ってきた代謝産物プロファイルの主成分分析から、培養には3つの培地を選択し、培養・抽出液の分析を行った。分析の結果を相互に比較し、UV-guided isolationを行い、単離した代謝産物の構造を各種機器分析で決定した。主たる代謝産物であるCytotrienin類に加え、Nocardamin類やPorphyrin類のほか、Heronamide類や新規の代謝産物linearlideが見出された。一方、ゲノム中には13個のPKS遺伝子群(Type Iは11個、Type IIは2個)があり、ドメイン・モジュールの構造から、生合成される代謝産物の構造を想定した。この結果と、実際に取得もしくは検出された代謝産物の構造とを比較して、遺伝子情報と代謝産物情報の関連づけを行った。また、ゲノム情報から直鎖状ポリエンポリケチドの生合成が期待され、それと思われる代謝産物を検出した。ポリエーテル、ポリエンマクロライドなどのポリケチド代謝産物の生合成が予想されたが、上記の培養条件では検出されなかった。今回は、これまでに得られた代謝産物の構造と予想される生合成遺伝子群の関係を報告する。

Streptomyces, Polyketide, Biosynthesis

講演番号：2A06p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ A校舎06会場

新規ポリケチド代謝産物Linearolides生合成遺伝子の解析

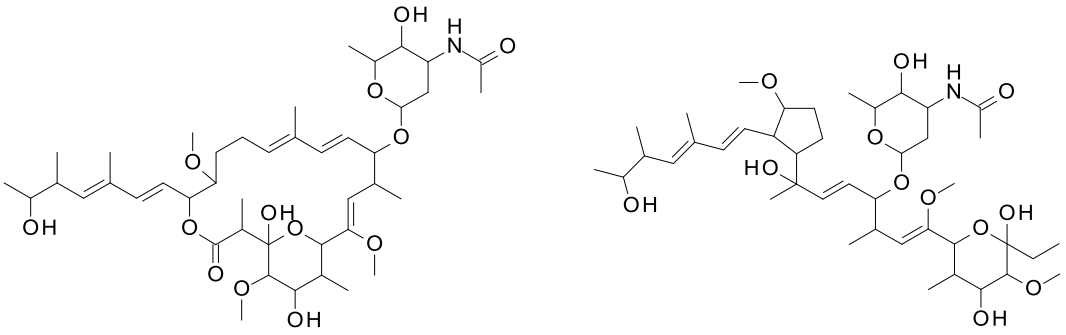
Analysis of biosynthetic gene of new polyketide metabolite Linearolides

○小城 尚文[1,2]、植木 雅志[1]、高橋 俊二[1]、川崎 寿[2]、長田 裕之[1]（[1]理研基幹研・ケミカルバイオロジー、[2]東電大院工・物質工）

○Naofumi Koshiro[1,2], Masashi Ueki[1], Shunji Takahashi[1], Hisashi Kawasaki[2], Hiroyuki Osada[1]
([1] Chem. Biol., RIKEN ASI, [2] Mat. Sci. Eng., Tokyo Denki Univ.)

【目的】放線菌は多様な二次代謝産物を生産することが経験的に知られているが、近年のゲノム解析によって一株の放線菌は多くの二次代謝産物生合成遺伝子群を有することが明らかになり、それが裏付けられた。*Streptomyces* sp. RK95-74はサイトトリエニン生産菌として理研抗生物質研究室で見出され、ゲノム解析が行われた。ゲノム解析の結果、他の放線菌と同様に多くの二次代謝産物生合成遺伝子群の存在が明らかになったが、実際の代謝産物とこれら遺伝子群の関連は不明なものが多い。二次代謝産物の生合成経路や生合成酵素の機能解明は新奇酵素の発見や非天然代謝産物の創製に繋がることが期待できる。我々はRK95-74の培養抽出液から代謝産物の取得を行い、ゲノム解析情報と合わせて生合成遺伝子群の解析を行うことにした。

【方法および結果】RK95-74は培地によって異なる代謝産物プロファイルを示すことを我々は報告してきた。その中の3種類の培地を使用し、培地特異的に生産が確認される新規化合物を2種類取得した。この2つの代謝産物は、構造から同一のI型ポリケチド合成酵素（PKS）によって生合成されるポリケチド化合物であることが考えられた。RK95-74のゲノム解析からI型PKS遺伝子群は11個見出されており、予想されるATドメインの基質特異性や存在する機能の種類や順序などから、7.1Mb付近に存在するPKS遺伝子群が共にこの2つの代謝産物の生合成に関与していることが示唆された。この遺伝子群は機能により3つに分けることができ、ポリケチド骨格を形成するPKS遺伝子群、メトキシマロニルACPを生合成する遺伝子群、そして糖を生合成する遺伝子群で構成される。そこでPKSのLoadingモジュール、メトキシマロニルACP生合成におけるglyceryl-S-ACP synthaseに機能推定される遺伝子、糖転移酵素の3つに着目し、遺伝子破壊株の代謝産物の生産変動をみることで、これら遺伝子群がLinearolides生産に関与するか否かの検証を行っている。



polyketide, biosynthesis, secondary metabolite

講演番号：2A06p17
講演日時、会場：3月23日17:15～ A校舎06会場

Streptomyces sp. RI-18由来ベンザスタチン類の生合成研究

Benzastatin biosynthesis in *Streptomyces* sp. RI-18

○林　貴之、高木　基樹[1]、新家　一男[2]、大西　康夫（東大院農生科・応生工、[1]JBIC、[2]AIST）
○Takayuki Hayashi, Motoki Takagi[1], Kazuo Shin-ya[2], Yasuo Ohnishi (Tokyo Univ., [1]JBIC、[2]AIST)

【目的】*Streptomyces* sp. RI-18（以下、RI-18）は既知化合物virantmycinと新規化合物JBIR-67、JBIR-73、7-OH benzastatin Dを生産する[1)]。これらは共通の生合成経路で合成されていると考えられ、benzastatin類と総称される。Virantmycinは特徴的なtetrahydroquinoline骨格を有するアルカロイドであり、有機合成により全合成がなされている。本研究の目的は、RI-18においてbenzastatin類の生合成経路・酵素を明らかにすることである。

【方法・結果】①*p*-aminobenzoic acid（PABA）にgeranyl基が結合したgeranyl-PABAを基本骨格とし、その後種々の修飾により様々なbenzastatinが合成されると予想した(図2)。したがってbenzastatin生合成には、PABAにgeranyl-PPを結合させるprenyltransferase（PT）が関与していると考えた。

②RI-18のドラフトゲノムシークエンスを決定し、PT遺伝子をBLAST検索した結果、PT遺伝子とPABA合成酵素遺伝子*pabAB*、*pabC*を含む遺伝子クラスターを見出した(図1)。このクラスターにはgeranyl-PABAの修飾酵素と思われる6つの酵素（2つのmethyltransferase、2つのP450、*N*-acetyltransferase、*N*-oxigenase）がコードされていた。遺伝子クラスター内の遺伝子の並びから各遺伝子を*bezA*-*bezJ*と名付けた(図1)。

③*bezF*（PT遺伝子）発現プラスミドを導入した*Streptomyces lividans*は、PABAを培地に添加した場合のみ、geranyl-PABAを生産した。また、*bezF*を含むオペロン*bezEFGHIJ*の発現株は、PABAを添加しなくても、geranyl-PABAおよびJBIR-67を生産した。さらに、上記6遺伝子に加えて*bezABC*を共発現させた株は、virantmycin、7-OH benzastatin Dを生産した。

以上の結果より、JBIR-67、virantmycin、7-OH benzastatin Dの生合成に関わる酵素群を同定できた。現在、geranyl-PABAの修飾酵素群が機能する順番とその触媒反応について解析している。

1) Motohashi, K. *et al. J. Antibiot.* **64**, 281 (2011).

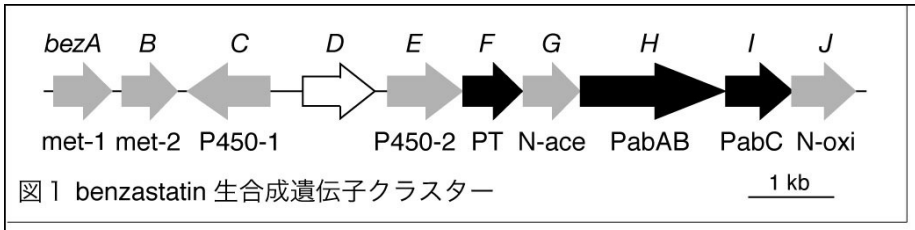
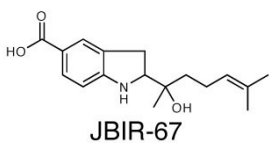


図1 benzastatin 生合成遺伝子クラスター



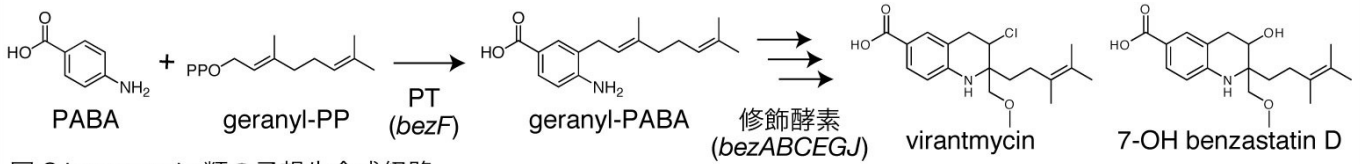


図2 benzastatin 類の予想生合成経路

Keyword1 biosynthesis, Keyword2 benzastatin, Keyword3 Streptomyces

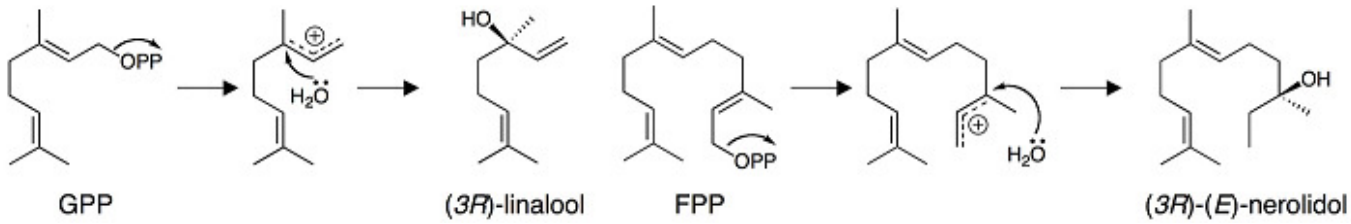
講演番号：2A06p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ A校舎06会場

放線菌*Streptomyces clavuligerus*由来のlinalool/nerolidol合成酵素の機能解析

Analysis of the linalool/nerolidol synthase from *Streptomyces clavuligerus*

仲野 千秋、○金 孝キョン、大西 康夫（東大院農生科・応生工）
Chiaki Nakano, ○Hyo-kyoung Kim, and Yasuo Ohnishi (Tokyo Univ.)

【背景・目的】テルペノイドは炭素数5のイソプレンユニットから構成される化合物の総称であり、多種多様なテルペノイドが主に植物から単離されている。テルペン環化酵素がイソプレニル2リン酸を環化することによって生じる環状テルペンがテルペノイドの大部分であるが、イソプレニル2リン酸への水付加や二重結合導入によって生じる直鎖テルペンも知られている。植物ではテルペン環化酵素と直鎖テルペン合成酵素は30%程度の相同性を有しており、アミノ酸配列だけからでは両者を区別できない。近年のゲノム解析の結果、原核生物のゲノムにも機能未知のテルペン環化酵素ホモログ遺伝子が多数存在していることが明らかになり、原核生物においても多様なテルペノイドが生産されていることが示唆された。我々は、新規なテルペン合成酵素を取得するとともに原核生物におけるテルペン環化酵素の多様性を示すことを目的に、テルペン環化酵素ホモログ遺伝子の機能解析を行ってきた。今回、放線菌のセスキテルペン環化酵素（SC）ホモログに注目した一連の研究の中で、テルペン環化酵素と相同性を有する直鎖テルペン合成酵素を原核生物で初めて見出したので発表する。【方法・結果】*Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064のゲノム配列からは10個を超えるSCホモログ遺伝子が見出された。まず、そのうちの4つの解析を試みたが、その1つが *SSCG_05291* であった。大腸菌を用いて組換えタンパク質を調製し、*in vitro* 解析を行った結果、本酵素はC_{15}のfarnesyl diphosphate (FPP)を基質にして直鎖セスキテルペンnerolidolを合成することが明らかになった。また、C_{10}のgeranyl diphosphate (GPP)を基質にして直鎖モノテルペンlinaloolも合成できた。そこで、本酵素をLnsA (linalool/nerolidol synthase)と命名した。LnsAの速度論解析を行ったところ、GPP、FPPに対するK_m値は同程度であったが、k_{cat}値はFPPを基質にした反応の方が約4倍高く、k_{cat}/K_m値の比較よりFPPを基質にした方が、GPPを基質にした時より5倍程度反応性が高いことが示された。*lnsA*を*Streptomyces lividans*で異種発現させ、培養液抽出物をGC-MSで解析した結果、linaloolとその類縁体は検出されたが、nerolidolは検出されなかった。*S. lividans* 細胞内では、FPPよりGPPの供給量が多いのかもしれない。一方、*S. clavuligerus* 野生株の培養液抽出物からはlinaloolおよびnerolidolは検出されなかった。この培養条件において、*lnsA* は発現してないか、生産されたlinaloolおよびnerolidolが修飾を受けている可能性が考えられる。



Keyword1 terpene synthase, Keyword2 linalool, Keyword3 nerolidol

講演番号：2A06p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ A校舎06会場

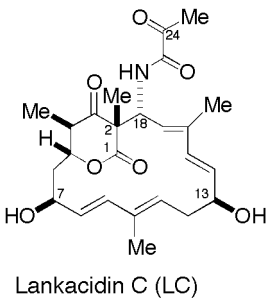
*Streptomyces rochei*のPQQ生合成遺伝子破壊株の代謝産物解析

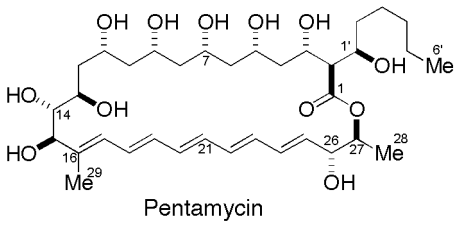
Metabolites isolated from the PQQ biosynthesis gene mutant of *Streptomyces rochei*

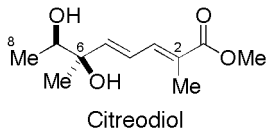
○荒川 賢治、吉田 竜平、曹 志生、木梨 陽康（広島大院・先端研）
Kenji Arakawa, Ryuhei Yoshida, Zhisheng Cao, Haruyasu Kinashi (Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ.)

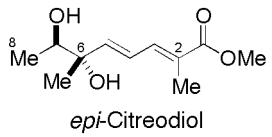
【目的】 放線菌 *S. rochei* の保持する線状プラスミド pSLA2-L 上にはランカサイジン (LC) 生合成遺伝子群 (*lkcA-lkcO*) が存在しており、そのクラスター左端に補酵素ピロロキノリンキノン (PQQ) 生合成遺伝子群 (*lkcK-lkcO*) がコードされている。*lkcL* 破壊株 (FS7 株) は LC 非生産となり、PQQ 添加によって生産能が回復した。そこで LC 生合成における PQQ の機能を調べるため、親株 51252 株および FS7 株の代謝産物の比較解析を行った。

【方法・結果】 FS7 株抽出物を TLC 解析したところ、UV 吸収をもつ 2 つの化合物 A、B の蓄積が認められた。両化合物を Sephadex LH-20 によるゲル濾過およびシリカゲル・クロマトグラフィーを用いて精製し、精密構造解析を行った。化合物Aの UV 吸収スペクトルでは 322, 338, 356 nm に特徴的なピークが検出され、ペンタエン構造の存在が示唆された。本化合物は分子量670、組成式$C_{35}H_{58}O_{12}$であり、NMRスペクトルはポリエン化合物 pentamycin の文献値と一致した。以上により化合物 A は 28 員環ポリエンマクロライド pentamycin と同定できた。抗カビ活性により生産量を調べたところ、親株と比較して250倍以上高生産していることが分かった。また化合物BのESI-MSスペクトルでは単一の分子量 214、組成式 $C_{11}H_{18}O_4$,が得られたものの、^{13}C-NMR スペクトルでは20本のシグナルが検出された。これにより化合物 B が 3:2 の混合物であると示唆された。混合物を誘導体化して分離し、NMR解析を行ったところ、それぞれ citreodiol および *epi*-citreodiol であることが分かった。これらはいずれも化学構造上 LC の生合成中間体とは考えにくく、本株での蓄積要因に興味が持たれる。またこれら生合成遺伝子はプラスミド上になく、染色体上に存在することが示唆された。









pyrroloquinoline quinone, *Streptomyces*, antibiotic

講演番号:2A06p20
講演日時、会場:3月23日17:48～ A校舎06会場

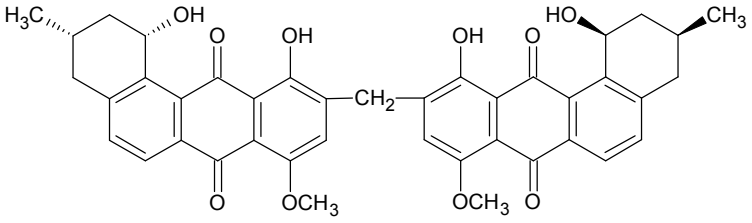
Hatomarubigin生合成遺伝子の機能解析

Characterization of hatomarubigin biosynthesis genes

○伊澤 真澄、前田 鮎美、川崎 崇[1]、早川 洋一（東理大・薬、[1]神戸大院・農）

○Masumi Izawa, Ayumi Maeda, Takashi Kawasaki[1], Yoichi Hayakawa (Tokyo Univ. Sci., [1]Kobe Univ.)

【背景・目的】*Streptomyces* sp. 2238-SVT4が生産するhatomarubigin D (HRD)は、2分子のhatomarubigin C (HRC)がメチレンを介して結合したユニークな構造を持つアングサイクリンであり、hatomarubigin (HR)類の生合成に関与する約30 kbpの*hrb*遺伝子クラスターが明らかになっている。



Hatomarubigin D

このうち、*hrbR1*から*hrbX*の領域を*S. lividans*において発現させることによってHRDを除くHRA～HRCの生産が確認されている。また、大腸菌組換え酵素を用いた*in vitro*の実験系において、HrbYがHRCからHRDへの変換反応に関与することが示唆されている。しかしながら、*S. lividans*を用いた発現系では、前述の領域に加えて*hrbY*を導入した株においてもHRDの生産は認められなかった。そこで、この異種放線菌発現系を改良し、メチレン架橋反応の候補遺伝子である*hrbY*、*hrbF*、*hrbZ1*、*hrbZ2*について機能解析を試みた。

【方法・結果】*hrbR1*から*hrbX*の領域に目的遺伝子*hrbY*、*hrbZ1*、*hrbZ2*を各々加えたプラスミドを作製し、*S. lividans*に導入した。培養条件を検討した結果、*hrbY*または*hrbZ1*を導入した株においてHRDの生産が確認され、*hrbY*導入株のHRD生産量がより多かった。一方、*hrbZ2*を導入した株はいずれも増殖が抑制され、HR類の生産率も低かった。*hrbZ2*は増殖抑制作用を有する遺伝子であることが示唆され、*hrbZ1*と*hrbZ2*は同一のプロモーターによって制御されていることから、両遺伝子はHR生産菌内で機能していない可能性が考えられる。

次に、*hrbR1*から*hrbX*の領域内の*hrbF*を欠失させたプラスミドを導入し、培養生産物の分析を行ったところ、HRA、HRB、HRCの生産が確認された。したがって、*hrbF*はHR生合成に必須の遺伝子ではないことが示された。今後、*hrbF*を欠失させた*hrbR1*から*hrbX*領域と*hrbY*を組み合わせたプラスミドを構築し、HRD生産への関与を含めた*hrbF*の機能解析を試みる予定である。

angucycline antibiotics, biosynthesis, *Streptomyces*

講演番号：2A07a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ A校舎07会場

リパーゼを用いた1H, 1H, 2H, 2H-Perfluoro Octyl gallate の酵素合成

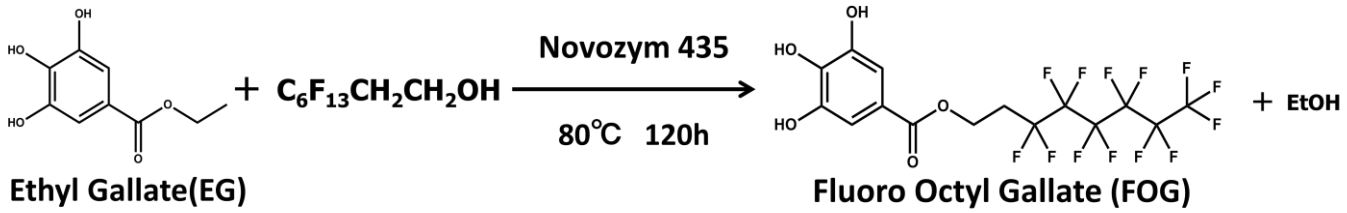
Enzymatic synthesis of 1H, 1H, 2H, 2H-perfluoro octyl gallate using lipase

○宇野喜晴、原田真里嘉[1]、濱本博三[2]、倉田淳志、岸本憲明（近畿大院・農、[1]近畿大・農、[2]近畿大・薬）

○Yoshiharu Uno, Marika Harada[1], Hiromi Hamamoto[2], Atsushi Kurata, Noriaki Kishimoto (Grad. Sch. of Agric., Univ. of Kinki, [1]Fac. of Agric., Univ. of Kinki, Sch. of Pharm., Univ. of Kinki.)

【目的】フッ素原子は水素原子とほとんど大きさが変わらないにもかかわらず、電気陰性度と親・疎水性質が大きく異なるため、標的分子の一部をフッ素原子に置き換えることにより生物活性を大きく変化させることが可能になる。そのため、近年、医薬品・農薬の開発研究において、含フッ素化合物を与える方法の重要性が急速に高まりつつあり、すでに医薬品ではおよそ約25%が、農薬の場合は約40%が分子中にフッ素原子を1つあるいは、数個含んでいる。今回、本研究では酵素合成による含フッ素ユニット導入法の開発を目的とし、フッ素系アルコールを用いてリパーゼを触媒とする没食子酸エチル（Ethyl gallate）のエステル交換反応の検討を試みた。

【方法および結果】フッ素系アルコールとして1H,1H,2H,2H-perfluoro octanol（$C_6F_{13}CH_2CH_2OH$）を用い、各種市販リパーゼを添加してEthyl gallateとの反応を行ったところ、すべての反応液から新規ピークが検出された。新規ピークの面積が最も大きかったNovozym435を用い、溶媒の種類を検討したところ、疎水性イオン液体と*t*-ブチルエチルエーテル、ジオキサンでも同一の新規ピークが出現したが、$C_6F_{13}CH_2CH_2OH$を溶媒とした場合の変換率が最も高かった。なお、新規ピーク物質はESI-MS解析とNMR解析により、1H, 1H, 2H, 2H-perfluoro octyl gallateであることが同定された。さらに、1H, 1H, 2H, 2H-perfluoro octyl gallateは、*Pseudomonas aeruginosa*と*Bacillus subtilis* に対して抗菌活性を示すことが明らかになり、本法の応用により新たな生物活性を示す没食子酸の合成が可能になることが示唆された。特に本法は、フッ素系分子の特性をいかした分離技術の適用も期待できるため、操作性・実用性に優れた手法となりうる。



enzymatic synthesis, fluorous chemistry, lipase

講演番号：2A07a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ A校舎07会場

Caffeoyl quinic acid とvinyl caffeateからdicaffeoyl quinic acidの酵素合成

Enzymatic synthesis of dicaffeoyl quinic acid from caffeoyl quinic acid and vinyl caffeate

○松田陽子[1]、宇野喜晴、岩井和也[2]、倉田淳志、岸本憲明（近畿大院・農、[1]近畿大・農、[2]UCC上島珈琲）

○Yoko Matsuda, Yoshiharu Uno, Kazuya Iwai[1], Atsushi Kurata, Noriaki Kishimoto (Grad. Sch. of Agric., Univ. of Kinki, [1]Fac. of Agric., Univ. of Kinki, [2]UCC Ueshima Coffee Co., Ltd.)

【目的】Dicaffeoyl quinic acid（ DCQA ）は Quinic acid に Caffeoyl 基が 2 個エステル結合したカフェオイルキナ酸誘導体である。DCQA は抗酸化や抗ガン活性など様々な生理活性を有することが知られている[1)]。しかし、DCQA はプロポリスやコーヒー生豆などに極微量しか含まれておらず、更なる生理機能の解明や、サプリメントなどへの応用を考えると、安定した供給方法を確立する必要がある。一方、コーヒー生豆にはクロロゲン酸が 5-10%含まれており、有望なクロロゲン酸資源である。そこで、市場に出荷されず廃棄されている等級外の未熟なコーヒー生豆から抽出した 5-Caffeoyl quinic acid（ 5-CQA ）を出発物質とし、3 段階の反応で DCQA に変換する方法を開発した。

【方法および結果】まず、リパーゼ Novozym 435 を用いてイオン液体[Bmim][NTf_2]中で 50mM 5-CQA とメタノールから 46.5mM 5-CQA-Me を合成した（ モル変換率 93% ）。Novozym 435 は 5-CQA に高い基質特異性を示し、3-CQA と 4-CQA をメチルエステル化できなかった。得られた 5-CQA-Me と Vinyl caffeate から DCQA-Me を合成できる酵素をスクリーニングしたところ、リパーゼ LPL と Lipozyme TLIM が新規ピークを生成した。LC/MS 分析と NMR 分析から、生成物を 4,5-DCQA-Me と同定した。4,5-DCQA-Me の酵素合成に最適なイオン液体は[Bdmim][NTf_2]で（ 変換率 30% ）、親水性イオン液体や *t*-butyl methyl ether、dioxane では生成物が得られなかった。Novozym 435 を用いて水溶液中で 4,5-DCQA-Me を処理すると、4,5-DCQA と同じ r.t.にピークが出現した。現在、最適条件を検討している。

1) K.Matsushige et al., Traditional Medicine. 1996, 13, 217

enzymatic synthesis,　ionic luiquid,　lipase

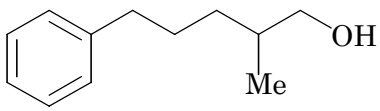
講演番号：2A07a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ A校舎07会場

加水分解酵素を用いたシクラメンアルデヒドの不斉合成

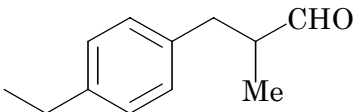
Asymmetric Synthesis of Cyclamen Aldehyde

○川崎正志（富山県立大・工）
○Masashi Kawasaki (Toyama Prefectural Univ.)

【目的】我々は石鹸などのfloral noteとして用いられる、Rosaphen®[1]の両鏡像異性体の合成とそれらの香りについて報告している[2]。両鏡像異性体の合成に必要な光学活性な中間体は加水分解酵素であるリパーゼを用いて調製した。今回は同様の手法にてフレグランスのmuguet noteとして用いられるCyclamen Aldehyde® **1**[3]の両鏡像異性体の合成に成功したので報告する。

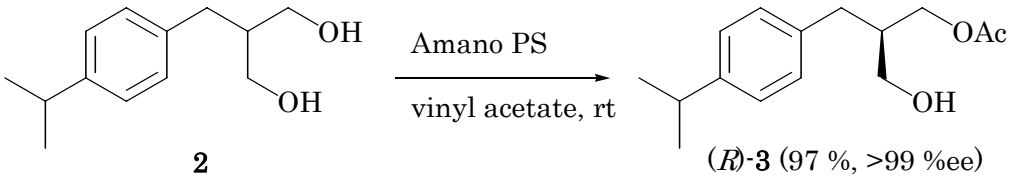


Rosaphen



Cyclamen Aldehyde **1**

【方法】まず市販の試薬から２段階でプロキラルなジオール**2**を合成した。次にリパーゼ(Amano PS) を不斉触媒、酢酸ビニルをエステル化剤兼反応溶媒として用い**2**の不斉エステル化を行った。



2 (*R*)-**3** (97 %, >99 %ee)

Scheme. Enantioselective esterification of **2**

【結果】上記スキームのように(*R*)-**3**を99 %ee以上で得ることができた。なお、(*R*)-**3**の絶対立体配置は**2**と構造が類似したジオールに対するAmano PSのエナンチオ選択性から推測したものである[4]。ついで、得られた(*R*)-**3**から３段階の反応を経て（*S*)-**1**を99 %eeで合成することに成功した。また、(*R*)-**3**から６段階の反応を経て（*R*)-**1**を98 %eeで合成することにも成功した。

1. D. J. Rowe (ed), “Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances”, Blackwell Publishing Ltd, Oxford (2005), p. 60.
2. M. Kawasaki *et al.*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **67**, 135 (2010).
3. D. J. Rowe (ed), “Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances”, Blackwell Publishing Ltd, Oxford (2005), p. 75.
4. T. Itoh *et al.*, *J. Org. Chem.*, **58**, 5717 (1993).

lipase, Cyclamen Aldehyde

講演番号：2A07a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ A校舎07会場

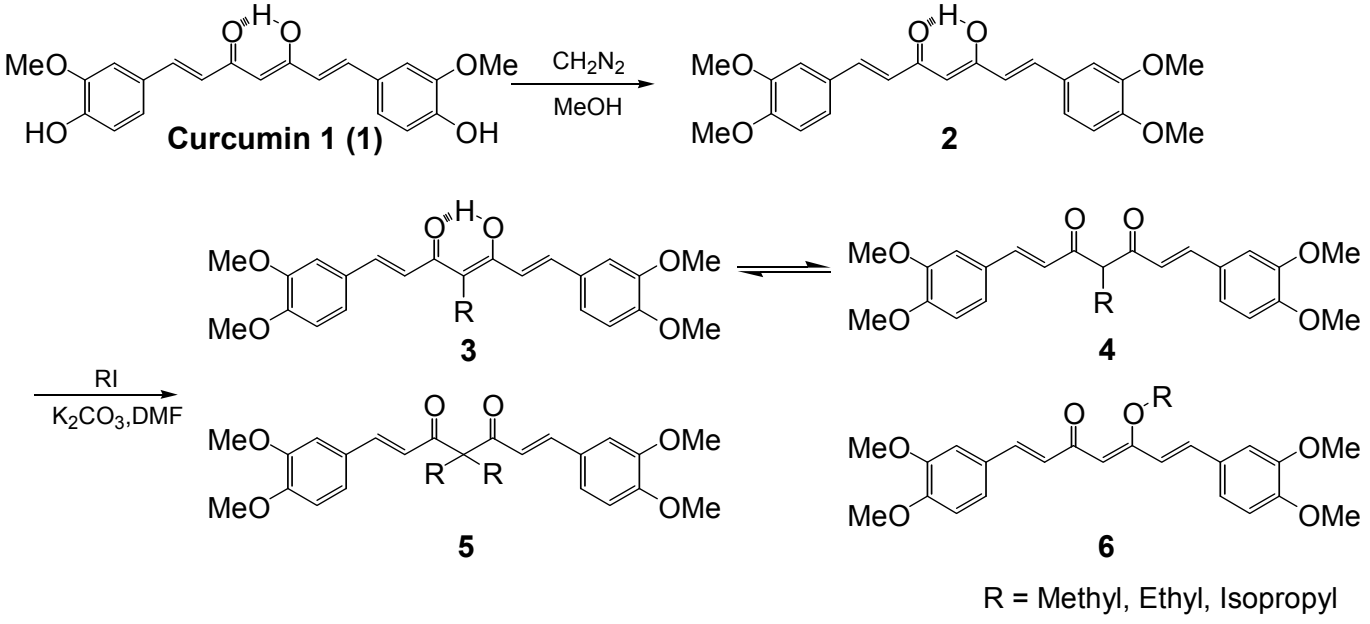
クルクミン類の類縁体合成とその化学的性質に関する研究

Chemical studies of on curcumin and its derivatives

○増田　温子[1]、柳瀬　笑子[1]、中塚　進一[2]　（[1]岐阜大・応生、[2]長良サイエンス）
○Atsuko Masuda[1], Emiko Yanase[1], Shin-ichi Nakatsuka[2]（[1]Gifu Univ.,[2]Nagara Science）

【目的】クルクミンは、ウコンの黄色色素であり、抗腫瘍作用、抗菌作用などを持つ化合物として注目を集めている。本研究では、クルクミン類縁体を合成し、分子内のβ-ジケトン構造に起因するケト-エノール互変異性の化学的性質について検討した。

【方法・結果】クルクミン1 (1)のフェノール性水酸基をCH_2N_2によってメチル化して、ジメチル体 **2**を得た。化合物 **2**の4位にアルキル基を導入するために、各種ヨウ化アルキルを反応させたところ、4位にアルキル基が導入された化合物 **3**、**4**、アルキル基が二つ導入された化合物 **5**、エノール性水酸基がアルキル化された化合物 **6**が得られた。このアルキル化反応では、導入するアルキル基の大きさによってこれらの生成比が異なることが分かった。さらにクルクミン1 (**1**)は、エノール体として存在することが知られているが、4位にアルキル基を導入した場合、エノール体 **3**だけではなく、その立体異性体であるケト体 **4**も単離することに成功した。これらは加熱条件下で互いに異性化し、導入したアルキル基が大きくなるにつれて異性化は速くなり、平衡比はケト体の方が優勢になることが分かった。



Curcumin, keto-enol tautomerism

講演番号：2A07a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ A校舎07会場

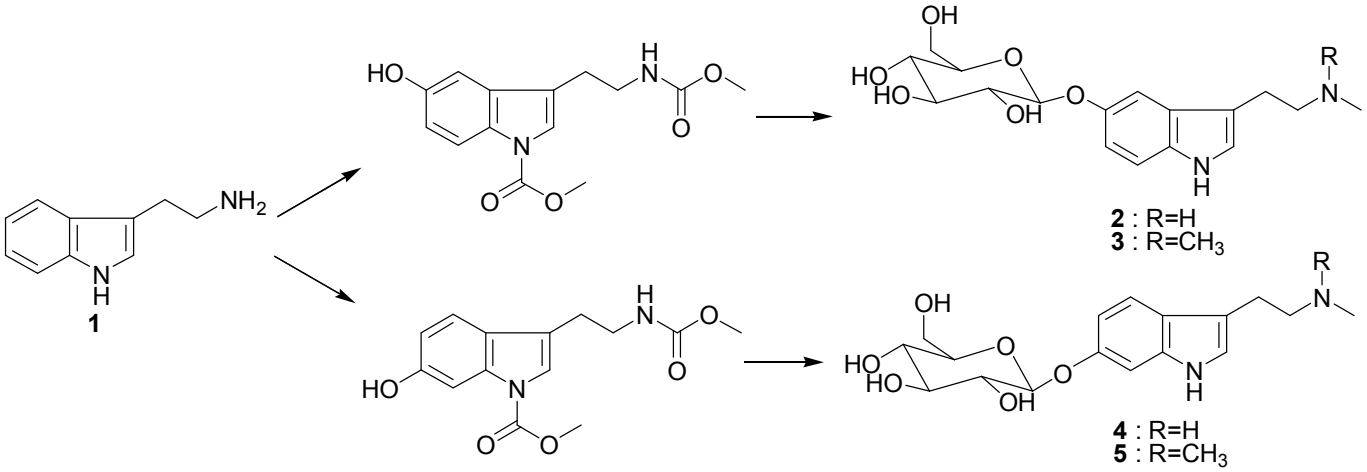
山椒種子中のセロトニン関連配糖体及び類縁体の合成

Synthesis of serotonin glycosides analogs in the seed of Japanese pepper

○吉田 拓弥[1]、柳瀬 笑子[1]、中塚 進一[2]（[1]岐阜大・応生、[2]長良サイエンス）
○Takuya Yoshida[1] , Emiko Yanase[1] , Shin-ichi Nakatsuka[2] ([1]Gifu Univ. , [2]Nagara Science)

【目的】我々は山椒種子中よりセロトニン関連配糖体の *N*-methyl-serotonin-5-*O*-*β*-D-glucopyranoside (**2**) と *N,N*-dimethyl-serotonin-5-*O*-*β*-D-glucopyranoside (**3**) の単離及び構造決定を報告した。これらの詳細な生理活性作用を調べるため我々は全合成に着手し、前年度これらの合成に成功した。本研究は、構造活性相関を調べるため類縁体である**4** , **5**の合成を目的に開始した。

【方法・結果】比較的安価なトリプタミン (**1**) を出発物質とした。アミノ基、1位をメトキシカルボニル基で保護し、ベンゼン環部にクロロアセチル基を導入後、酸化転位及び加水分解にて6位に水酸基を導入した。その後グリコシル化を行い、脱保護及び還元反応を経て全8段階、**4**を通算収率12%、**5**を通算収率11%で達成した。



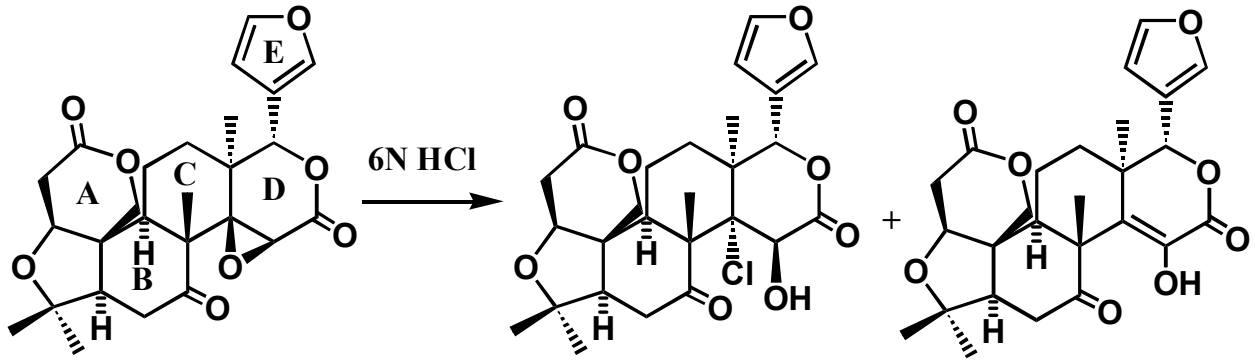
講演番号：2A07a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ A校舎07会場

ユズ種子リモノイド類の骨格変換反応

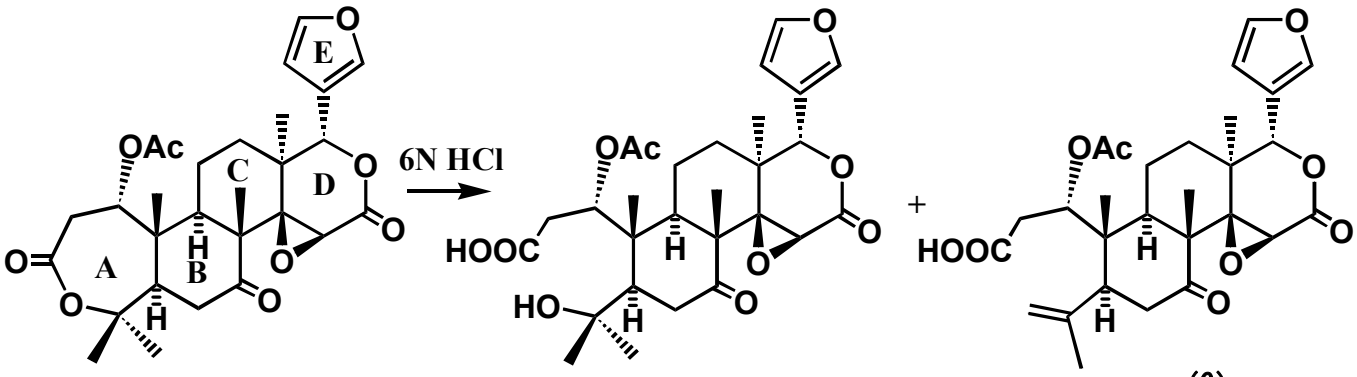
Chemical conversion of Limonoids from *Citrus junos*

○ 佐藤　弘規[1]、柳瀬　笑子[1]、中塚　進一[1,2]（[1]岐阜大・応生、[2]長良サイエンス）
○ Hiroki Sato[1], Emiko Yanase[1], Shin-ichi Nakatsuka[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]Nagara Science)

【目的】リモノイド類はカンキツ類に含まれる苦味成分のひとつであり、昆虫に対する摂食阻害作用やマウスに対する抗肥満作用などの生理活性を示す化合物である。そのため、リモノイド類の骨格を変換することは、このような生理活性の機構や構造活性相関を明らかにする上で役立つと考えた。そこで代表的なリモノイド類であるリモニンを中心に骨格変換を試みた。
【方法・結果】ユズ種子から再結晶化やオープンカラムで分離精製して反応に用いるリモノイド類を単離した。得られた原料に対し反応を行い、生成物の構造を誘導化反応と機器分析により決定した。リモニン **(1)**を塩酸で加水分解したところ、D 環ラクトンのエポキシドが開環したクロロヒドリン体 **(2)**とエノール体 **(3)**がそれぞれ収率 55%、20%で得られた。同様の反応をノミリン**(4)**に対して試してみたところ、エポキシドの開裂は起こらず A 環ラクトンが開裂したノミリン酸**(5)**と 5 の水酸基が脱離した化合物 **6** が得られたので報告する。



リモニン(1)　　クロロヒドリン体(2)　　エノール体(3)



ノミリン(4)　　ノミリン酸(5)　　(6)

limonoids, limonin, *Citrus junos*

講演番号：2A07a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ A校舎07会場

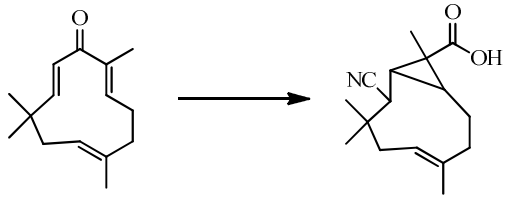
ゼルンボンの位置選択的ハロゲン化と新規多環式化合物への変換

Regioselective halogenation of zerumbone and conversion to novel polycyclic compounds

○高橋 一生[1]、井福 壮[2]、河合 靖[3]、北山 隆[1, 2]（[1]近畿大院農バイオ、[2]近畿大農バイオ、[3]長浜バイオ）

○Issei Takahashi[1], Masashi Ifuku[2], Yasushi Kawai[3], Takashi Kitayama[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric., Kinki Univ., [2]Fac. Agric., Adv. Biosci., Kinki Univ., [3]Nagahama Inst. Bio-Sci. Tech.)

【緒言】ゼルンボン**1**は、ショウガ科ショウガ属に属するハナショウガ (*Zingiber zerumbet* Smith) の根茎部に乾燥重量当たり3～4%含有されている11員環セスキテルペンで、共役二重結合、孤立二重結合、カルボニル基を有することから、非常に高い反応性を示す[1)]。**1**は抗HIV活性、抗癌活性など多くの生理活性をもつことが多数報告されており[2)]、**1**をリード化合物とした展開が期待できる。さらに**1**は水蒸気蒸留によって容易に精製できるため、工業的利用が可能である。すなわち、大量に生産され、かつ反応多様な二次代謝産物である有機分子の包括的利用を考え、**1**を用いてこの発展を目指す。特に、学理的かつ材料学的にも重要である複雑な骨格をもつ多環式化合物を中心とした簡便な構築法を確立し、未知の反応経路の開拓、およびファインケミカルズを含む新規物質を構築することによって、反応多様な天然物の新たな利用を考えたい。



1 **2**

【研究内容】**1**を位置選択的にハロゲン化したジブロモ中間体に求核性の比較的低いCN^-を求核剤として作用させると、複雑な反応経路を経由して、高収率で3-9員環**2**を形成するが、水酸化物イオンを反応させると、環状骨格が開裂した全く異なる生成物を与えるなど、非常に興味深い結果が得られた[3)]。これは、11位にアニオンが生じることが最も重要であることを示唆している。そこで、さらに詳細な反応検討を行ったところ、他の求核剤でもジアステレオ選択的反応の進行を確認することができた。このように、反応活性な中間体を経由することによって、環の歪みを利用した渡環反応が進行することが明らかとなってきたため、同様に反応活性の高いゼルンボン還元体を中間体として用いて反応を検討した結果、興味深い渡環反応性を見いだし、新規な多環式化合物を得たので、報告する。

【参考文献】

1) Kitayama T. *et al*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 199-207 (2011).
2) Akira Murakami *et al*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **63**, 1811-1812 (1999).
3) Kitayama T. *et al*, *J. Org. Chem.*, **64**, 2667-2672 (1999).

zerumbone, polycyclic, terpene

講演番号：2A07a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ A校舎07会場

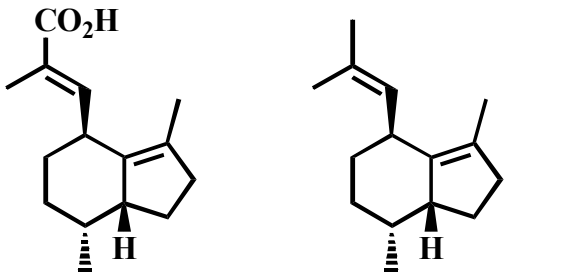
Valerena-4,7(11)-dieneの合成研究

Synthetic study of valerena-4,7(11)-diene

○妻形 博紀[1]、白井 貴士[2]、北山 隆[1,2]（[1]近畿大院農バイオ・[2]近畿大農バイオ）
○Hiroki Tsumagata[1], Takashi Shirai[2], Takashi Kitayama[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric., Kinki Univ., [2]Fac. Agric., Adv. Biosci., Kinki Univ.)

【目的】西洋カノコ草 (*Valeriana officinalis*) は沖縄を除く日本全土および中国から東シベリアにかけて分布し、その根や茎を乾燥させたものが鎮静、鎮痛作用を示すことが知られている。その主成分がValerenic acid (**1**) で、抗不安、鎮静、睡眠延長効果を有することが報告されている。最近になって伊藤らにより、カノコ草中に極微量含有するValerena-4,7(11)-diene (**2**) が **1** より強い鎮静作用を示すことが、マウスへの吸入投与法を用いた系により明らかとなった[1)]。その後、当研究室で **1** を出発物質に用いた **2** の半合成に成功しているが[2)]、更に開発を進めるためには安定的な **2** の供給が必要となる。そこで本研究では、**2** の全合成について検討した。

【方法および結果】種々検討した結果、Cyclopentanolを出発物質とし、エノンを合成後、不斉ジエノールを得た。次に、Diels-Alder反応によってインダン骨格を形成し、望みの立体化学およびそのantipodeの中間体をそれぞれ得、その後、プロペニル側鎖など、所望の置換基を導入するプロセスを経由することによって、**2** およびその類縁体の合成検討を行ったので報告する。



Valerenic acid **Valerena-4,7(11)-diene**
1 **2**

【参考文献】

1) H. Takemoto, T. Yagura, M. Ito, *J Nat Med*, **63**, 380-385, (2009).
2) T. Kitayama, G. Kawabata, M. Ito, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1963-1964, (2010).

Valerena-4,7(11)-diene, Valerenic acid, synthesis

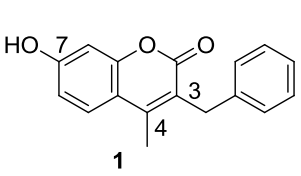
講演番号：2A07a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ A校舎07会場

3-Benzyl-7-hydroxy-4-methylcoumarinのアナログ合成研究

Synthesis of 3-benzyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin analogues

○石原沙也加[1]、堀川敦史[1]、土井翔馬[1]、岡本修平[1]、岡本泰輔[1]、植西譲二[1]、須藤龍彦[2]、長田裕之[2]、齊藤安貴子[1,3]（[1]大阪電通大工・応用化学、[2]理研基幹研　ケミカルバイオロジー、[3]大阪電通大工・環境科学）

○Sayaka Ishihara[1], Atsushi Horikawa[1], Syoma Doi, Shuhei Okamoto, Taisuke Okamoto, Joji Uenishi, Tatsuhiko Sudo, Hiroyuki Osada, Akiko Saito ([1]Appl. Chem., Eng., OECU, [2]Chem. Biol., RIKEN ASI, [3]Environ. Sci., Eng., OECU)

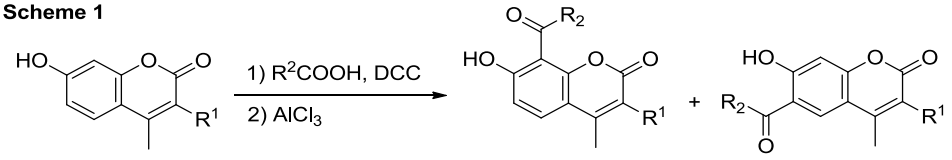


1

【目的】Coumarin類はラクトン構造を持つ化合物であり、多くの強い生物活性を有する誘導体が知られている。また、coumarin類は強い蛍光を発する化合物としても知られ、化学生物学研究におけるバイオプローブとして有望視されている。2010年度の本大会において、我々は3-Benzyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin（**1**）が細胞内シグナル伝達分子であるp38MAPKを阻害することを報告した。構造-活性相関研究により、7位の水酸基と3位のベンジル基がp38MAPK阻害活性には必須であることを確認している。また、**1**とp38MAPKの物理的結合に関しては、3位のベンジル基が必須であり、7位の水酸基は必須ではない事を光親和型SPRイメージング法を用いて確認している。我々は**1**の高い蛍光性を利用することで、p38MAPKに直接結合するバイオプローブを作り出すことが可能だと考え、さらなる合成研究、および、物性評価を進めている。

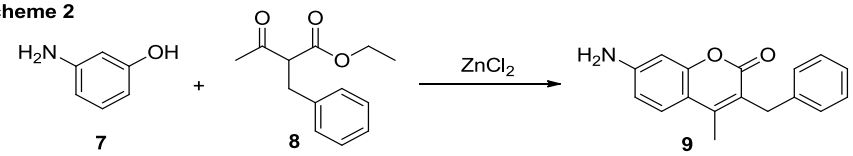
【方法と結果】p38MAPKに対する活性を保持し、かつ、蛍光強度が高い化合物の合成を目指して合成研究を行った。まず、Scheme 1に示したように、活性に必要な水酸基を保持したまま6位、8位を修飾した化合物群**4**～**6**を合成した。さらに、Scheme 2に示したように、7位にアミノ基を導入した化合物**9**を合成した[1]。本発表では、これらの合成研究に加え、蛍光強度、p38MAPKに対する活性も併せて報告する予定である。

Scheme 1



2: R^1 = H
3: R^1 = Bn
4: R^1 = H
5: R^1 = Bn
6: R^1 = Bn

Scheme 2



7 **8** **9**

参考文献）1. 藤原ら、第41回複素環化学討論会講演要旨集、p141, 2011.

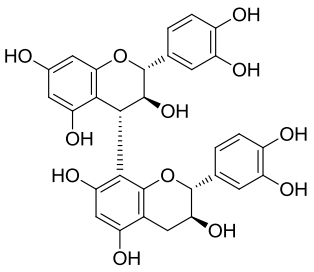
3-Benzyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin, p38 MAPK, bioprobe

講演番号：2A07a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ A校舎07会場

TBDMSを保護基として用いたプロシアニジ-B3アナログの立体選択的合成と位置選択的脱保護

Stereocontrolled synthesis and regioselective deprotection of procyanidin-B3 analogs using TBDMS as protective groups.

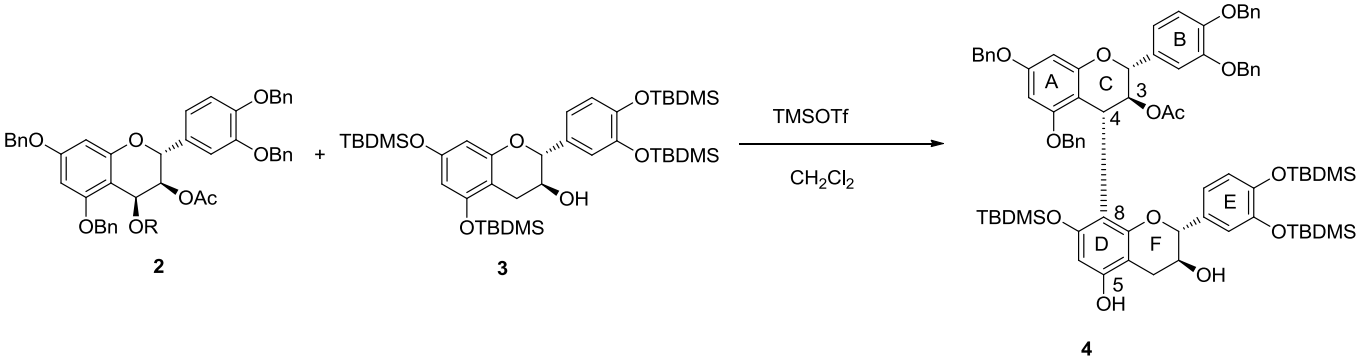
○岡本泰輔[1]、東野雄祐[1]、植西譲二[1]、石原沙也加[1]、岡本修平[1]、土井翔馬[1]、中島範行[2]、
齊藤安貴子[1,3]（[1]大阪電通大工・応用化学、[2]富山県大工・生物工学、[3]大阪電通大工・環境科学）
○Taisuke Okamoto[1], Yusuke Higashino[1], Joji Uenishi[1], Sayaka Ishihara[1], Shuhei Okamoto[1], Syoma Doi[1], Noriyuki Nakajima[2], Akiko Saito[1,3] ([1]Appl. Chem., Eng., OECU, [2]TPU, [3]Environ. Sci., Eng., OECU)



Procyanidin-B3 (**1**)

【目的】プロアントシアニジンは，お茶やカカオ等の嗜好品、大豆や小麦、古代米等の穀物、果物類、さらには、スギなどの樹木の樹皮などにも含まれ、一般にはポリフェノール化合物として良く知られている。プロアントシアニジンは、(+)-catechinや(-)-epicatechinのようなフラバン - 3 - オール類が縮合してオリゴマー化した構造を基本骨格に、様々な修飾や変換を受けて実に多くの類縁体を持つ。この化合物群は様々な強い生物活性を有する事が報告されているが、詳細な活性発現機構は未だ不明である。我々はこれまでに、修飾化合物を含む様々なオリゴマーを合成して生物活性試験を行い報告してきた[1]。現在はこれらの研究をさらに進め、さらなる構造-活性相関研究、プローブ化を行うため、合成時の保護基の再検討、および、反応条件の最適化を進めている。

【方法と結果】エレクトロファイル**2**とヌクレオファイル**3**をTMSOTf存在下縮合反応を行ったところ、5位が脱保護されたと考えられる2量体**4**が高収率・選択的に得られた。かつ、この時、3,4-*cis*体の生成は検出されず、3,4-*trans*選択的であることがわかった。この選択性は2の脱離基の種類には影響されないが、Lewis acidとして$TiCl_4$や$SnCl_4$を用いた時、脱保護されていない2量体が得られ、脱保護されていない2量体に関しては3,4-*cis*体も検出された。本発表では、これらの詳細な条件検討について、および、下図に示した分子間縮合反応による2量体合成に加え、分子内縮合反応についても報告する。



参考文献）1. A. Saito *et al.*, *Tetrahedron*, **65**, 7422-7828 (2009).

procyanidin-B3, stereoselective synthesis, polyphenols

講演番号:2A07a11
講演日時、会場:3月23日11:10～ A校舎07会場

プロアントシアニジン立体選択的合成における保護基の再検討

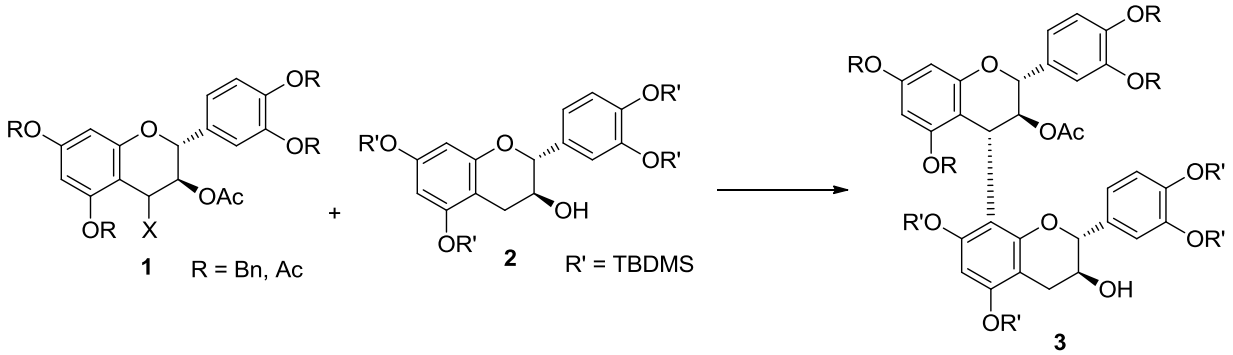
Re-examination of protective groups in the stereoselective synthesis of proanthocyanidins.

○植西譲二[1]、岡本泰輔[1]、森口正太郎[1]、岡本修平[1]、土井翔馬[1]、石原沙也加[1]、中島範行[2]、齊藤安貴子[1,3]（[1]大阪電通大工・応用化学、[2]富山県立大工・生物工学、[3]大阪電通大工・環境科学）

○Joji Uenishi[1], Taisuke Okamoto[1], Syotaro Moriguchi[1], Shuhei Okamoto[1], Syoma Doi[1], Sayaka Ishihara[1], Noriyuki Nakajima[2], Akiko Saito[1,3] ([1]Appl. Chem., Eng., OECU, [2]TPU, [3]Environ. Sci., Eng., OECU)

【目的】プロアントシアニジンは，お茶やカカオ等の嗜好品、大豆や小麦、古代米等の穀物、ブドウやリンゴ、柿等の果物類、さらには、スギなどの樹木の樹皮などにも含まれ、一般にはポリフェノール化合物として良く知られている。プロアントシアニジンは、(+)-catechinや(-)-epicatechinのようなフラバン－3－オール類が縮合してオリゴマー化した構造を基本骨格に、様々な修飾や変換を受けて実に多くの類縁体を持つ。この化合物群は様々な強い生物活性を有する事が報告されているが、詳細な活性発現機構は未だ不明である。我々はこれまでに、修飾化合物を含む様々なオリゴマーを合成して生物活性試験を行い報告してきた[1]。その過程で、抗酸化活性やラジカル消去活性のような生物活性は水酸基の数やオリゴマーの重合度と相関が得られたが、我々が行ってきた生体物質を用いた活性試験については相関を持たない場合が数多く見られた。そこで、オリゴマーのいずれかの単量体ユニットがより重要な機能を果たすのではないかと仮定し、それぞれのユニットを異なる保護基で保護し、区別して脱保護・修飾が可能な合成法の開発を行った。

【方法と結果】(+)-Catechinを出発原料として合成したelectrophile **1**とnucleophile **2**を、それぞれ異なる保護基で保護し、ルイス酸存在下、縮合反応を行った。R=Bn、R= TBDMS、ルイス酸として$TiCl_4$、$SnCl_4$、BF_3・OEt_2を用いたとき、反応がスムーズに進行し、2量体**3**が高収率・高選択的に得られた。現在はR=Acとした**1**を用いて反応条件検討を進めている。



参考文献）1. A. Saito *et al.*, *Tetrahedron*, **65**, 7422-7828 (2009).

stereoselective synthesis, proanthocyanidin, polyphenols

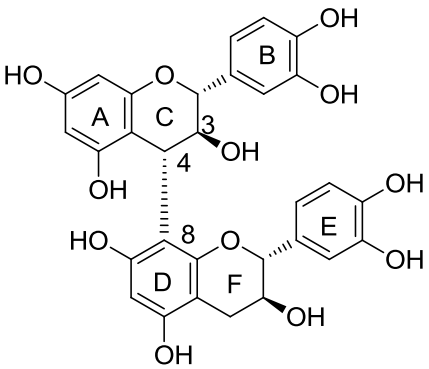
講演番号：2A07a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ A校舎07会場

プロシアントシアニジンのプローブ化研究

Synthetic study of proanthocyanidin molecular probes

○土井翔馬[1]、岡本修平[1]、石原沙也加[1]、植西譲二[1]、岡本泰輔[1]、齊藤安貴子[1,2]
([1]大阪電通大工・応用化学、[2]大阪電通大工・環境)
○Shoma Doi[1], Shuhei Okamoto[1], Sayaka Ishihara[1], Joji Uenishi[1], Taisuke Okamoto[1], Akiko Saito[1,2] ([1]Appl. Chem., Eng., OECU, [2]Environ. Sci., Eng., OECU)

【目的】プロアントシアニジンは，お茶やカカオ等の嗜好品、大豆や小麦、古代米等の穀物、ブドウやリンゴ、柿等の果物類、さらには、スギなどの樹木の樹皮などにも含まれ、一般にはポリフェノール化合物として良く知られている。プロアントシアニジンは、(+)-catechinや(-)-epicatechinのようなフラバン－3－オール類が縮合してオリゴマー化した構造を基本骨格に、様々な修飾や変換を受けて実に多くの類縁体を持つ。この化合物群は様々な強い生物活性を有する事が報告されているが、詳細な活性発現機構は未だ不明である。我々はこれまでに、修飾化合物を含む様々なオリゴマーを合成して生物活性試験を行い報告してきた[1]。我々はさらに研究を進め、プロアントシアニジンを用いた化学生物学研究を行うためのプローブ合成を進めている。本報告では、(+)-catechinの2量体であるprocyanidin-B3のプローブ化の検討を行ったので報告する。



Procyanidin-B3 (**1**)

【方法と結果】我々はprocyanidin-B3の合成に関して保護基の再検討を行い、8か所あるフェノール性水酸基のうち一か所のみの脱保護に成功した。各種スペクトルを測定した結果、D環の水酸基の片方が脱保護されていることが確認された。これまでの構造-活性相関研究により、B環やE環のフェノール性水酸基が活性に強く影響する可能性、および、C環やF環の3位にガロイル基を導入すると活性が増強される事が示唆されている。すなわち、D環の水酸基の位置選択的脱保護が可能になった事は、活性に重要な部分以外に選択的にリンカー導入が可能であることを示している。現在、**1**へのPEG等から誘導したリンカーの導入、および、蛍光分子の導入を進めている。

参考文献）1. A. Saito *et al.*, *Tetrahedron*, **65**, 7422-7828 (2009).

molecular probe, proanthocyanidin, procyanidin-B3

講演番号：2A07a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ A校舎07会場

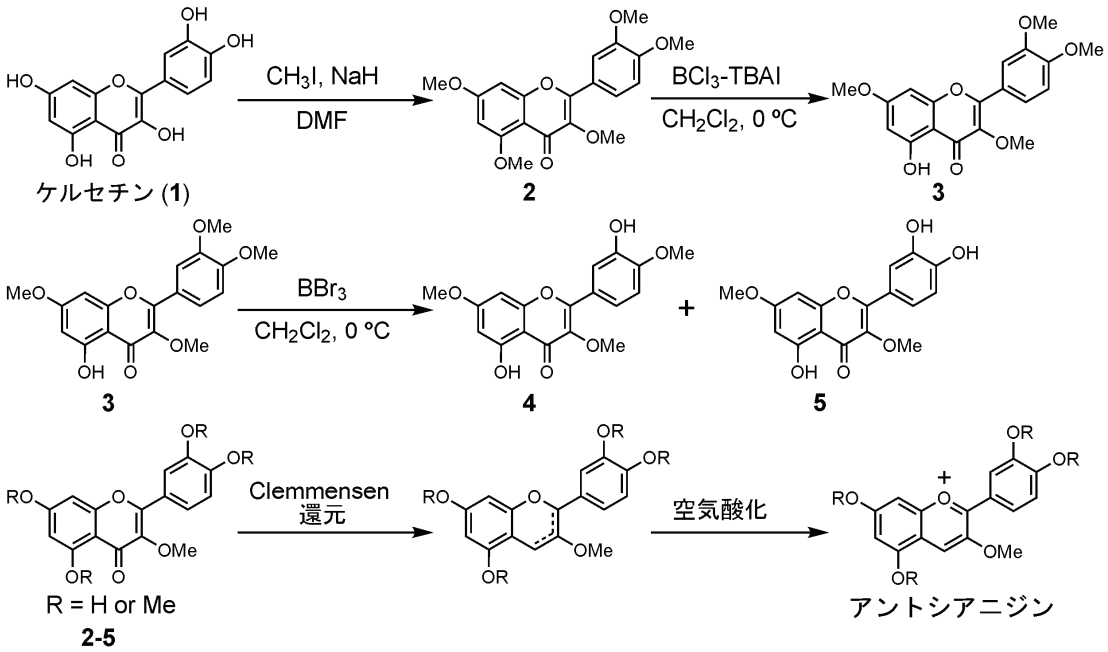
3-*O*-メチル化ケルセチンの合成とアントシアニジンへの変換反応

Synthesis of 3-*O*-methylquercetins and their transformation to anthocyanidins

○加藤亮、尾山公一[1]、近藤忠雄、吉田久美（名大院・情報科学、[1]名大・物国セ）
○Ryo Kato, Kin-ichi Oyama[1], Tadao Kondo, Kumi Yoshida (IS Nagoya Univ., [1]RCMS Nagoya Univ.)

【目的】アントシアニンは、抗酸化、抗癌、抗糖尿病、抗肥満、抗炎症作用、視覚改善効果などの多様な健康維持機能が見出され、生活習慣病の治療や予防薬、健康機能性食品として注目を集めている。さらに、色素増感太陽光電池の色素などの機能性材料としても有望視されている。したがって、天然資源のフラボノール配糖体からアントシアニンへの変換反応は、非常に重要である。我々は、既に、ルチンからクレメンゼン還元により得られるフラベノールチノシドが、容易にアントシアニンへと空気酸化により変換されることを本大会(2008、2011)で報告してきた。本研究では、種々の 3-*O*-メチル化ケルセチンからアントシアニジンへの変換反応を行って生成物を精査することで反応機構を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】ケルセチン(**1**)をヨウ化メチルでメチル化し、ペンタメチルケルセチン(**2**)を合成した。この**2**をBCl_3とTBAIで処理すると位置選択的に脱メチル化が起こりテトラメチル体**3**に変換できた。さらに、テトラメチル体**3**をBBr_3を用いて脱メチル化するとトリメチル体**4**とジメチル体**5**が得られた。3-*O*-メチル化ケルセチン(**2-5**)のクレメンゼン還元を行った後、空気酸化するとそれぞれ対応したアントシアニジンが生成した。



methylanthocyanidin, methylquercetin, Clemmensen reduction

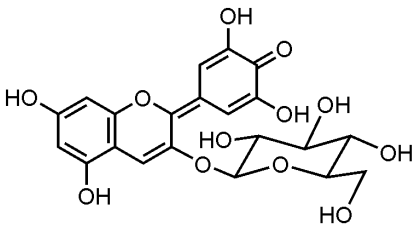
講演番号：2A07a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ A校舎07会場

アジサイの青色発色に関与するアシル化キナ酸類の効率的合成

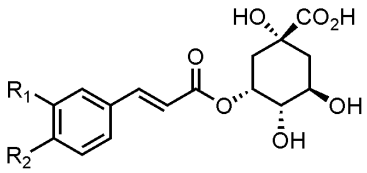
Efficient synthesis of acylquinic acids as a co-pigments for blue hydrangea coloration

○渡邉紀之、鈴木昌子、関口由起子、尾山公一[1]、近藤忠雄、吉田久美
（名大院・情報科学、[1]名大・物国セ）
○Noriyuki Watanabe, Masako Suzuki, Yukiko Sekiguchi, Kin-ichi Oyama[1], Tadao Kondo, Kumi Yoshida
(IS Nagoya Univ., [1]RCMS Nagoya Univ.)

【目的】アジサイガク片 (*Hydrangea macrophylla*) の青色は、デルフィニジン 3-グルコシド(**1**)が、Al^{3+}イオンと錯体形成し、さらにキナ酸誘導体 (**2** or **3**) がコピグメントとして作用して発現する。既に、我々はアジサイの着色細胞の分析データより、pH 4 で **1** と **2** 又は **3** 及び Al^{3+}からアジサイの青色を再現する条件を見出している。しかし、この青色色素は水溶液中で存在するが、NMR シグナルはブロード化し、構造解析できないため、構造は全く不明である。そこで、青色色素を再構築して構造情報を得る目的で、種々の助色素類縁体の合成を行っている。1 位カルボン酸を PMB (*p*-methoxybenzyl 基)で保護したキナ酸誘導体を分子設計し、5-*O*-アシル化キナ酸の合成を本大会(2005、2008)で報告してきた。今回、この方法論をさらに発展させ効率化した合成法の開発とポリアシル化キナ酸の合成について報告する。

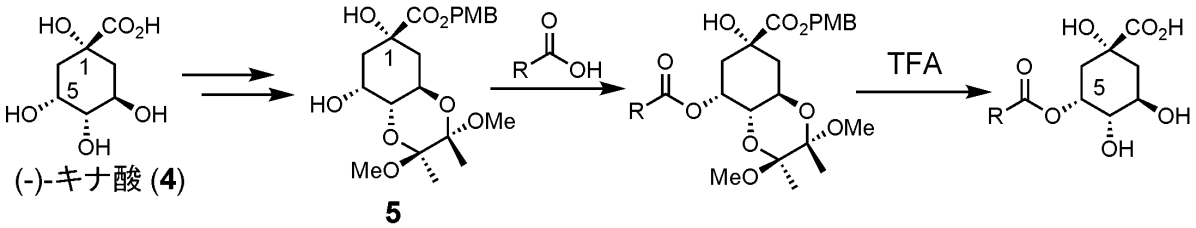


デルフィニジン 3-グルコシド (**1**)



$R_1 = R_2 = OH$: 5-*O*-カフェオイルキナ酸 (**2**)
$R_1 = OH, R_2 = H$: 5-*O*-*p*-クマロイルキナ酸 (**3**)

【方法と結果】(−)−キナ酸(**4**)から 4-メトキシベンジル(PMB)基で保護した **5** を合成した。改良した田辺らのエステル化反応[1](2008 年度本大会の発表)の反応機構を詳細に検討することで、さらに強力なエステル化反応を開発した。**5** にこのエステル化反応を応用することで 5 種類の 5-*O*-アシル化キナ酸を合成した。さらに、このエステル化反応を用いてポリアシル化キナ酸の合成も行っている。



(-)-キナ酸 (**4**)　　**5**

1) Tanabe *et al. Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 1209.

acylquinic acid, esterification, blue hydrangea

講演番号：2A07a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ A校舎07会場

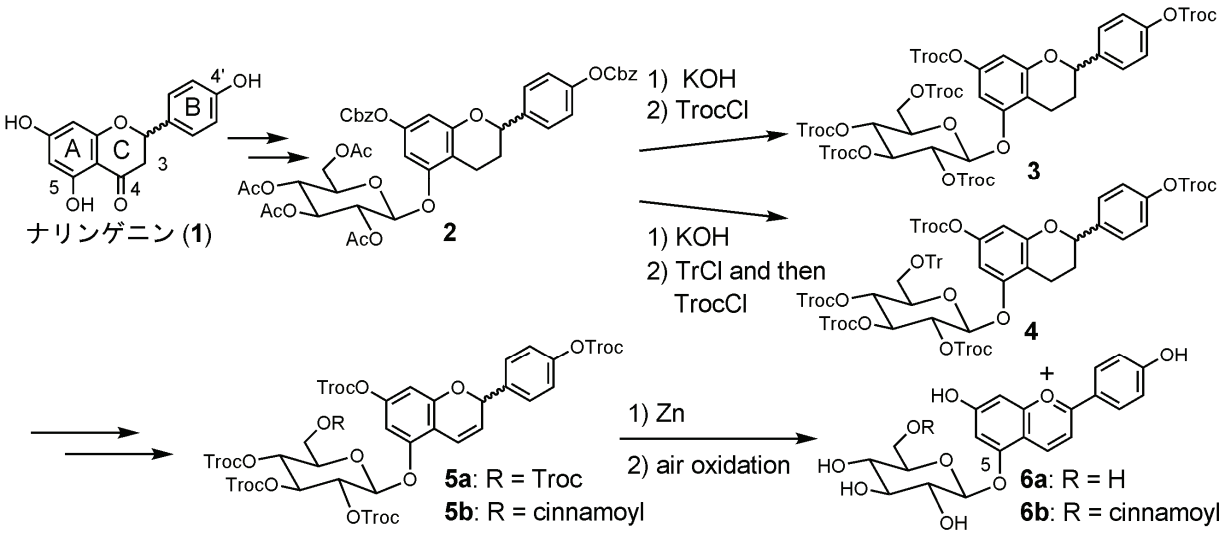
3-デオキシペラルゴニジン 5-*O*-(6-*O*-シンナモイルグルコシド)の合成研究

Synthetic studies on 3-deoxypelargonidin 5-*O*-(6-*O*-cinnamoylglucoside)

○尾山公一、近藤忠雄[1]、吉田久美[1]（名大・物国セ、[1]名大院・情報科学）
○Kin-ichi Oyama, Tadao Kondo[1], Kumi Yoshida[1] (RCMS Nagoya Univ., [1]IS Nagoya Univ.)

【目的】アントシアニンは、抗酸化作用に基づく様々な生理活性のため、生活習慣病の治療や予防薬、健康機能性食品として注目を集めている。特に、アシル化アントシアニンは、アシル化による分子構造の安定化、抗酸化作用の向上などの高機能性の発現が期待できるので非常に注目されている。しかし、サンプル供給が天然からに限られているため明確な構造に基づく機能性探索および機能性発現機構の研究は立ち遅れている。既に、我々は配糖化フラベノールの空気酸化によるアントシアニンへの変換反応により、シアニジン 3-グルコシドの合成を報告した[1)]。本研究は、このアントシアニンへの変換反応を基礎にして効率的なアシル化 3-デオキシアントシアニンの合成方法の開発を目的とする。

【方法と結果】市販されていて入手の容易なナリンゲニン(**1**)から数段階を経て配糖化フラバン**2**を合成した。さらに、**2**の保護基を温和な還元条件で除去可能かつフラベン誘導体を電子吸引効果により安定化することが期待できるTroc基に変換して**3**を合成した。**3**をフラベン**5a**へと変換した後、脱保護して空気酸化することにより3-デオキシアントシアニン**6a**の合成に成功した。さらに、**2**のグルコースの6位をトリチル化した後、TrocClを作用させることで**4**を合成した。現在、**4**からアシル化3-デオキシアントシアニン**6b**への変換反応を検討中である。



1) T. Kondo et al., *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3609.

acylated anthocyanin, 3-deoxyanthocyanin, flavene 5-glucoside

講演番号：2A07p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ A校舎07会場

オルト-ブロモトシルオキシアリールからオルト-ブロモビアリールの合成

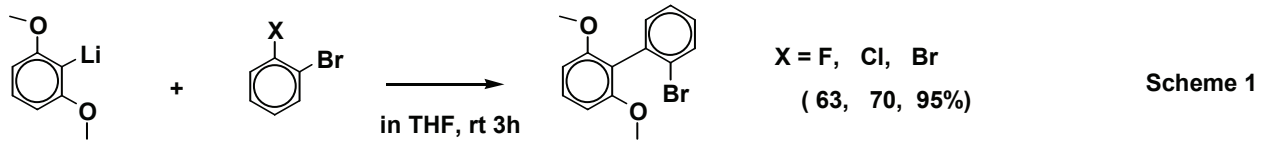
Synthesis of *O*-bromobiaryls from *O*-bromotosyloxyaryls

間瀬智志、○福士幸治（北大院農）
Satoshi Mase, ○Yukiharu Fukushi (Hokudaiinnou)

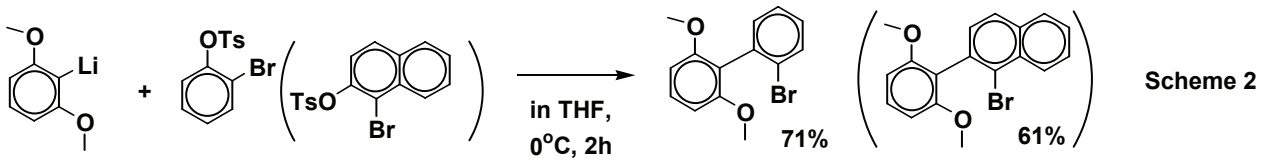
【目的】我々はNMR解析のためのビアリール型キラル誘導体化試薬を数多く開発してきた[1)]。Bochtらは、2004年オルトジハロアリール化合物とアリールリチウムとのカップリング反応によりオルトハロゲノビアルール化合物が生成することを報告した[2)]（スキーム1）。今回、同様の反応がオルト-ブロモトシルオキシ基を有する芳香族化合物でも起こるかどうか検討した。

【方法と結果】オルトハロゲノビアルール化合物とアリールリチウムとのアニオンカップリング反応においてトシルオキシ基が選択的に求核置換されることを見出した（スキーム2）。フェノール性化合物のオルト位は選択的ブロム化が容易であることから、この反応はオルト-ブロモビアリールの効率的調製法になると期待される。

1) *Organic Lett.*, 2010, **12**, 2856-2859
2) *Tetrahedron*, 2004, **60**, 6853-6357



Scheme 1



Scheme 2

Keyword1, Keyword2, Keyword3 *O*-bromobiaryl, *O*-bromotosyloxyaryl, anionic coupling

講演番号:2A07p03
講演日時、会場:3月23日14:11～ A校舎07会場

液相二相合成法を用いた迅速な一容器ペプチド合成システムの構築

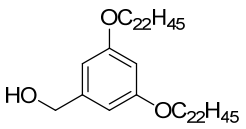
One-pot peptide synthesis system using biphasic solutions

○小池　幹男，岡田　洋平，千葉　一裕（東農工大・農）
○Mikio Koike, Yohei Okada, Kazuhiro Chiba (Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

【目的】ペプチドは生体高分子と比べ化学合成が容易であり，かつタンパク質への高い親和性が期待できることから，医薬品候補化合物として広く注目を集めている．ペプチド合成の主流となっている固相法は分離精製操作が簡便であり，これまでに様々な天然型ならびに非天然型のペプチドの合成例が報告されている．固相法は自動合成やコンビナトリアル合成にも応用されており，生理活性を有するペプチドのスクリーニングにおいて強力な手法となっている．一方で，液相法によるアプローチでは不均一触媒反応の導入が可能であり，高い反応性が獲得されるため効率的なペプチドの化学修飾が達成される．我々の研究室では，これまでに疎水性タグを用いた液相ペプチド合成法の開発に取り組んできた．本手法では，タグを導入したペプチドが各反応終了後に沈殿として高純度かつ定量的に回収出来るため，カラムクロマトグラフィー等の分離精製操作を挟むことなく数十段階に上る化学反応が実現できる．本研究では液相二相系で疎水性タグを利用することで，一容器内での多段階ペプチド合成を試みた．

【方法】疎水性タグとして 3,5-didocosyloxybenzyl alcohol(**1**)を用い，シクロヘキサン／アセトニトリル液相二相系において Fmoc 法によって順次ペプチドの伸長反応を行った．疎水性タグを結合させたペプチドはシクロヘキサン相に選択的に回収され，余剰のアミノ酸や縮合剤などの試薬はアセトニトリル溶液として液 - 液抽出のみによって効率的に除去できる．目的とする配列を合成した後に酸条件下での疎水性タグの切り出しを行い，ペプチド生成物を得た．

【結果】シクロヘキサン／アセトニトリルは室温条件下で二相を形成する．このような液相二相系において，疎水性タグ上で効率的なペプチド合成が進行することが確認された．縮合ならびに脱保護反応はいずれも定量的に進行し，液 - 液抽出のみによって高収率かつ高純度で目的とするペプチドの合成が達成された．本手法におけるペプチドの化学合成は完全に液相で行うため，各段階において TLC や ESI-MS による反応終了や目的化合物の生成が迅速かつ簡便に確認できる．また，疎水性タグは塩基性条件ならびに側鎖官能基の脱保護に適用される一般的な酸条件に耐性を有するため，一容器内での多段階反応におけ副反応を最低限に抑えることが可能となる．最終的な脱保護過程においては，様々な酸条件を検討した結果，一段階での側鎖脱保護ならび疎水性タグの切り出しが達成された．



3,5-didocosyloxybenzyl alcohol (**1**)

【参考文献】Chiba, K.；Kono, Y.；Kim, S.；Nishimoto, K.；Kitano, Y.；Tada, M. *Chem. Commun.* 2002, 1766-1767.

hydrophobic tag, liquid-phase peptide synthesis, biphasic solution

講演番号:2A07p04
講演日時、会場:3月23日14:22～ A校舎07会場

疎水性タグを用いたジスルフィド架橋ペプチドの合成

Practical synthesis of disulfide bond containing-peptide based on hydrophobic tag strategy

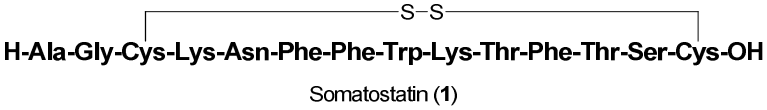
○北田　慎吾,[1] 藤田　秀司,[2] 岡田　洋平,[1] 金　承鶴,[1] 千葉　一裕[1] ([1]東農工大・農, [2]JITSUBO株式会社)

○Shingo Kitada,[1] Shuji Fujita,[2] Yohei Okada,[1] Shokaku Kim,[1] Kazuhiro Chiba[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]JITSUBO Co. Ltd.)

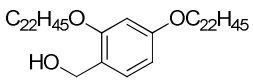
【目的】ペプチドの立体構造は活性や安定性と深い関わりを持つことが知られており，中でもシステイン残基間でのジスルフィド架橋構造は,天然に存在する多くのペプチドの立体を制限し,様々な生理活性の発現に寄与している．このようなジスルフィド架橋を含むペプチドの化学合成に関して固相法ならびに液相法に基づいた様々な例が報告されており，分子内に複数のジスルフィド架橋を含むペプチドの合成も達成されている．これまでに，我々は疎水性タグを用いた液相ペプチド合成法を開発し，多様な配列の化学合成に取り組んできた．この方法ではタグを導入したペプチドが各反応終了後に沈殿として高純度かつ定量的に回収出来るため，カラムクロマトグラフィー等の分離精製操作を挟むことなく数十段階に上る化学反応が実現できる．本研究では，ジスルフィド架橋を含むペプチドのモデルとしてSomatostatin（**1**），α-Conotoxin MII（**2**）を選定し，疎水性タグを用いた手法によりこれらの化学合成を行った．

【方法】疎水性タグとして2,4-didocosyloxybenzyl alcohol(**3**)を用い，Fmoc法によって順次ペプチドの縮合反応を行った．目的配列の合成後，フリーのシステイン残基間でのDEAD酸化ならびにAcm基で保護されたシステイン残基間でのヨウ素酸化を用いジスルフィド架橋の形成を試みた．

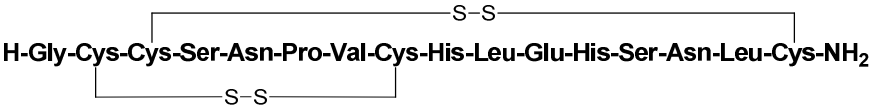
【結果】アラニン残基を2つのシステイン残基で挟んだトリペプチドをモデルとして用いることで,疎水性タグ上でのヨウ素酸化による効率的分子内ジスルフィド架橋形成が可能であることを見出した．この条件を用い，疎水性タグ上でSomatostatin配列を合成した後に分子内環化を試みたところ，目的環化物を高収率かつ高純度で得ることに成功した．システイン残基の側鎖保護基としてMmt基およびAcm基を使い分けることで，DEAD酸化ならびにヨウ素酸化を組み合わせて段階的に分子内で2つのジスルフィド架橋を形成することにも成功し，高収率かつ高純度でのα-Conotoxin MIIを得ることに成功した．



Somatostatin (**1**)



2,4-didocosyloxybenzyl alcohol (**3**)



α-Conotoxin MII (**2**)

【参考文献】Kitada, S.; Fujita, S.; Okada, Y.; Kim, S.; Chiba, K.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4476-4479.

solution-phase peptide synthesis, hydrophobic tag, disulfide bond

講演番号:2A07p05
講演日時、会場:3月23日14:33～ A校舎07会場

疎水性タグを用いた液相ペプチド合成

Hydrophobic tag-assisted liquid-phase peptide synthesis

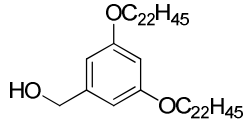
○藤田　裕子,[1] 格根　塔娜,[1] 藤田　秀司,[2] 岡田　洋平,[1] 金　承鶴,[1] 千葉　一裕[1] ([1]東農工大・農, [2]JITSUBO株式会社)

○Yuko Fujita,[1] Gegen Tana,[1] Shuji Fujita,[2] Yohei Okada,[1] Shokaku Kim,[1] Kazuhiro Chiba[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]JITSUBO Co. Ltd.)

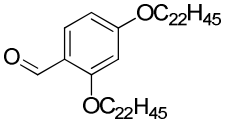
【目的】ペプチドは低分子と比べタンパク質への高い親和性が期待でき，医薬品候補化合物として広く注目を集めている．高分子と比べ化学合成が容易であることはペプチドの大きな強みであり，これまでに様々な天然型ならびに非天然型のペプチドの合成例が報告されている．ペプチド合成の主流となっている固相法は分離精製操作が簡便であり，自動合成やコンビナトリアル合成を可能にしている．一方で，液相法によるアプローチでは高い反応性が獲得され，不均一触媒反応を導入することでペプチドの精密な構造制御が可能になる．我々の研究室では，これまでに疎水性タグを用いた液相ペプチド合成法の開発に取り組んできた．本手法では，タグを導入したペプチドが各反応終了後に沈殿として高純度かつ定量的に回収出来るため，カラムクロマトグラフィー等の分離精製操作を挟むことなく数十段階に上る化学反応が実現できる．本研究では新たな疎水性タグを調製し，従来のタグでは合成が困難であった配列への応用を試みた．

【方法】疎水性タグとしてmethyl 3,5-dihydroxybenzoateを1-bromodocosaneでアルキル化した後に水素化アルミニウムリチウム還元することで，3,5-didocosyloxybenzyl alcohol (**1**)を調製した．また，2,4-dihydroxybenzaldehydeを同様に1-bromodocosaneを用いてアルキル化することにより2,4-didocosyloxybenzaldehyde (**2**)を調製し，これを還元的アミノ化によってアミノ酸のN末端へと導入することが可能な疎水性タグとして用いることを検討した．

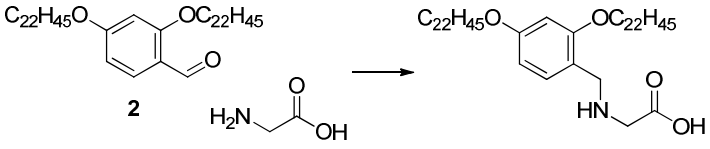
【結果】**1**を疎水性タグとして用いることでタグとペプチドの結合部分であるベンジルエステルの酸耐性が飛躍的に高まり，本手法にBoc基で保護されたアミノ酸を利用することが可能となった．また，**2**を疎水性タグとして用いることで，これまでアミノ酸のC末端に限定されていたタグの導入がN末端でも可能となることを見出した．タグを導入したN末端にも種々のアミノ酸を縮合することができるため，本手法によってC末端ならびにN末端の双方向へのペプチド伸長が可能となることが期待される．



3,5-didocosyloxybenzyl alcohol (**1**)



2,4-didocosyloxybenzaldehyde (**2**)



【参考文献】Tana, G.; Kitada, S.; Fujita, S.; Okada, Y.; Kim, S.; Chiba, K.; *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8219-8221.

hydrophobic tag, liquid-phase peptide synthesis, reductive amination

講演番号：2A07p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ A校舎07会場

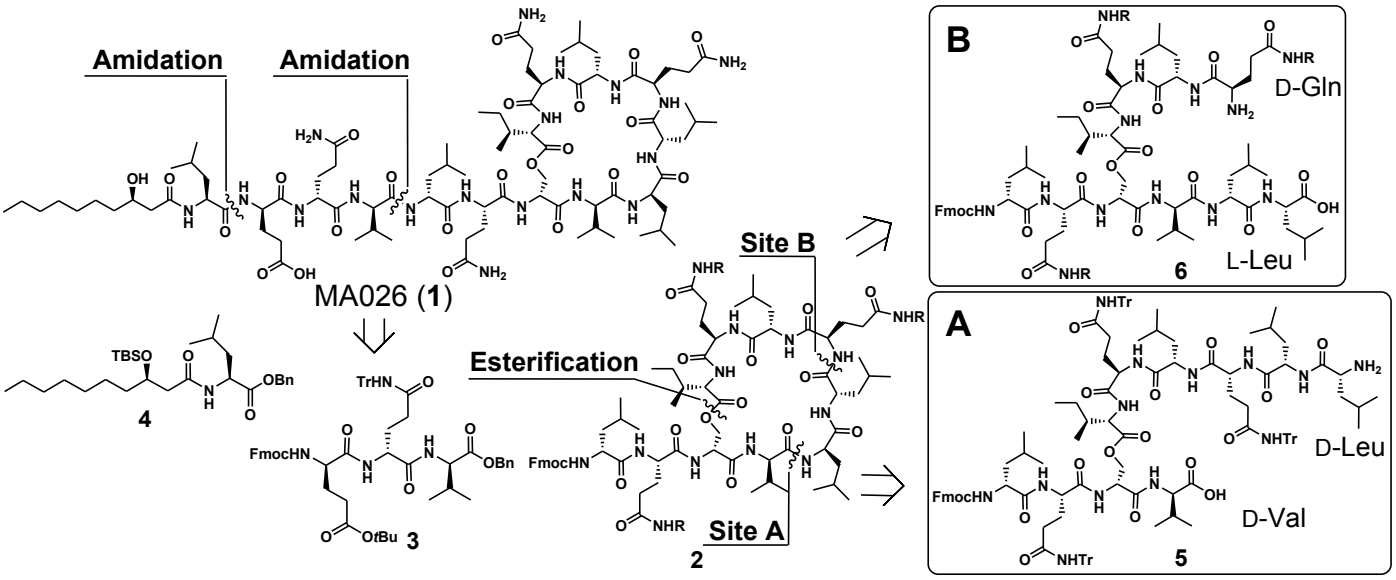
抗ウイルス活性を有する新規環状デプシペプチド MA026 の合成研究

Synthetic Studies of MA026, a Novel Antiviral Lipocyclodepsipeptide

○志村聡美、石間正浩、太田育恵、筒井悦子、紙透伸治、村田寛、山崎隆之、鈴木孝洋[1]、倉持幸司[2]、竹内倫文、小林進[1]、菅原二三男、（東理大・理工、[1]東理大・薬、[2]京府大院・生命環境）

○Satomi Shimura, Masahiro Ishima, Ikue Ota, Etsuko Tsutsui, Shinji Kamisuki, Hiroshi Murata, Takayuki Yamazaki, Takahiro Suzuki[1], Koji Kuramochi[2], Toshifumi Takeuchi, Susumu Kobayashi[1], Fumio Sugawara (Tokyo Univ. of Sci, [1]Tokyo Univ. of Sci, [2]Kyoto Pref. Univ）

【目的】MA026 (**1**) は、当研究室で単離・構造決定された新規環状デプシペプチドである[1)]。本化合物は、ニジマスの消化管より分離した *Pseudomonas* sp. RtIB026 株の培養液から単離された。この菌体を体内に保持する養殖魚は、病原ウイルスに対して感染防御効果を示した。そして、菌体が生産する抗ウイルス活性を示す物質として MA026 が単離された。MA026 は新規の抗ウイルス薬として応用が期待されるが、その作用機構は解明されていない。本研究は、MA026 に関する研究をさらに進めるため、効率的な化学合成法を確立することを目的とした。【方法と結果】MA026 は、アミノ酸 8 残基からなるマクロラクトン構造に、アミノ酸 6 残基からなる鎖状ペプチド、(3*R*)-ヒドロキシデカノイル基が結合した複雑な構造を有する。我々は、MA026 を 3 つのセグメント **2**、**3**、**4** に分割し、収束的に合成する計画を立案した。環状デプシペプチド **2** の合成において、環化部位が A の位置となるデプシペプチド **5** では、分子内環化反応が進行しなかった。環化部位を B の位置に変更したデプシペプチド **6** では、分子内マクロラクタム化が進行し、環状デプシペプチド **2** へと導くことができた。環状デプシペプチド **2** と、別途合成した MA026 の側鎖部分を縮合し、その後全ての保護基を除去し、MA026 (**1**) の全合成を達成した。



1) 国際特許 PCT/JP02/01139

synthetic study, cyclodepsipeptide, natural product

講演番号：2A07p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ A校舎07会場

Callipeltin E の固相全合成

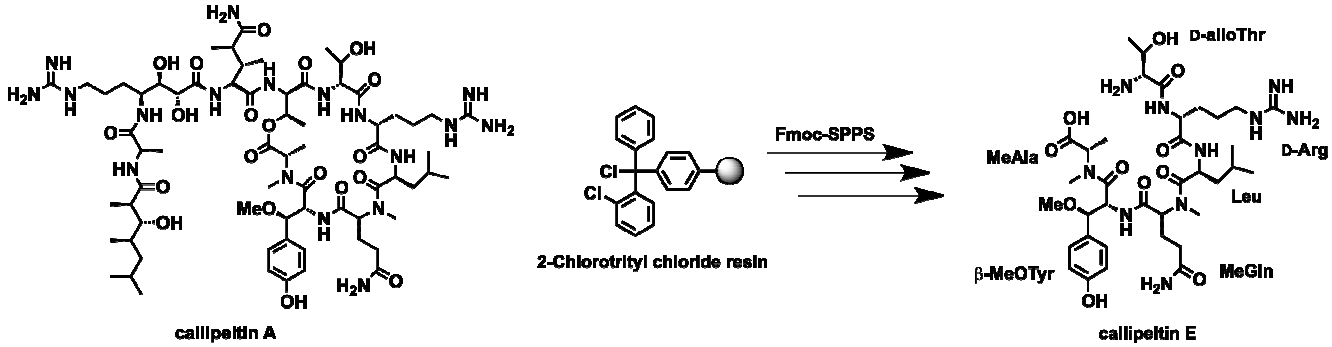
Solid phase total synthesis of callipeltin E

○菊池 真理、野坂 和人[1]、赤路 健一[2]、今野 博行（山形大院理工・バイオ化学、[1]兵庫医大、[2]京都薬大）

○ Mari Kikuchi, Kazuto Nosaka[1], Kenichi Akaji[2], Hiroyuki Konno (Yamagatadai, [1]Hyogoidai, [2]Kyotoyakudai)

【目的】Callipeltin A は海綿 *Callipelta* sp. から単離された抗 HIV 活性を有する環状デプシペプチドである. 我々は HIV 阻害剤創製を目指し, そのリード化合物として期待される callipeltin A の全合成研究を行っている. 今回, 環状部に含まれる直鎖ヘキサペプチド callipeltin E の固相全合成を検討した. Callipeltin E は海綿 *Latrunculia* sp. から単離され, Lipton らによってその全合成および立体化学の決定が報告されている [1, 2]. その中で Lipton らは分解を避けるために最終脱保護での酸条件の使用を回避している. しかし, アナログ体合成などを考慮した場合オーソドックスな Fmoc 法の適用が必要であると考えられる. そこで, 最終脱保護に酸条件を用いる callipeltin E の固相全合成を試みた.

【方法と結果】まず, 構成する6つのアミノ酸のうち4つの異常アミノ酸を合成した. Fmoc-MeAla-OH, Fmoc-MeGln-OH はそれぞれ Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH を原料とし, オキサゾリジノン中間体を経てシラン還元により得た. また, L-Thr の α 位をラセミ化させることで D-alloThr を調製し, Fmoc 基で保護することで Fmoc-D-alloThr-OH へと導いた. β-MeOTyr は Sharpless の不斉ジヒドロキシル化反応を用いた立体選択的合成により Fmoc-(2*R*,3*R*)-β-MeOTyr(MEM)-OH とした. これらを2-クロロトリチル樹脂上で HATU/HOAt をカップリング剤に用いて縮合し, 保護 callipeltin E を得た. 樹脂から切り出した後側鎖保護基の脱保護を検討した結果, TFA:CH_2Cl_2=1:3 の時, 最も効率よく反応が進行し, callipeltin E の全合成に成功した [3]. これらの詳細について報告したい.



[1] Zampella, A.; *et al*. *Tetrahedron Lett*. **2002**, *43*, 6163-6166. [2] Lipton, M. A.; *et al*. *J. Org. Chem*. **2006**, *71*, 6351-6356. [3] Kikuchi, M.; Konno, H.; *et al*. *Tetrahedron Lett*. **2011**, *52*, 3872-3875.

callipeltin, solid phase peptide synthesis, unusual amino acid

講演番号：2A07p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ A校舎07会場

抗真菌活性を有する Bk-1229 の β-hydroxyTyr 部位の立体化学と合成に関する研究

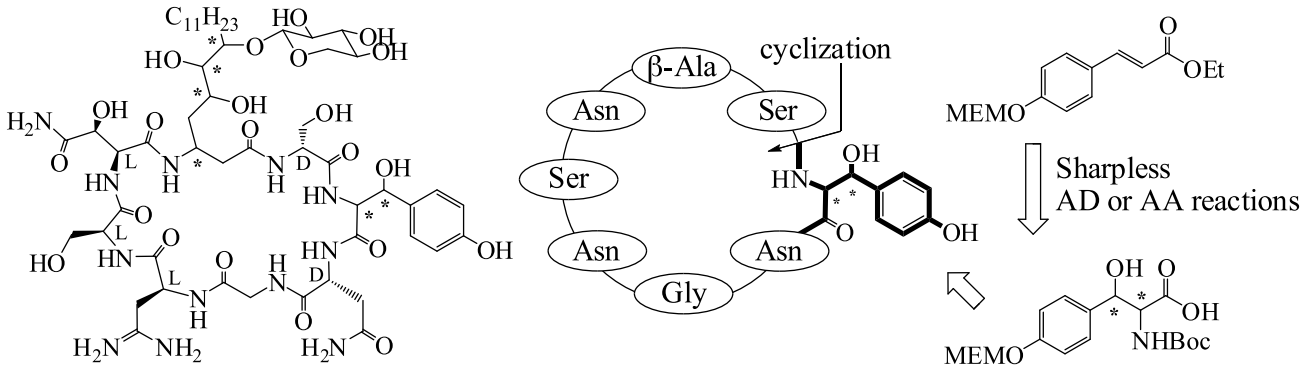
Synthesis and stereochemistry of β-hydroxyTyr residue of Bk-1229, an antifungal cyclic lipopeptide.

◯生駒 恵、大槻 雄介、野坂 和人[1]、今野 博行（山形大院理工・バイオ化学、[1]兵庫医大）

◯Megumi Ikoma, Yusuke Otsuki, Kazuto Nosaka[1], Hiroyuki Konno (Yamagatadai, [1]Hyogoidai)

【目的】Bk-1229 は抗真菌活性を有する環状リポペプチドで，2010 年に A. Tawfik らにより *Burkholderia ambifaria* 2.2N から単離, 構造決定された[1]. Bk-1229 は *S. cerevisiae* に対し, 既存薬である Amphotericin B より 60 倍強い阻害活性を示し, 更に作用機序も異なると考えられるため, 今後の新薬開発の有力なリード化合物になると期待される. Bk-1229 は D-アミノ酸, *β*-hydroxyTyr, *β*-hydroxyAsn, 糖付加脂肪アシルアミノ酸 (FAA) を含む 8 つのアミノ酸から構成されている. しかし *β*-hydroxyTyr と FAA 部位の立体化学については未決定である. 本研究では *β*-hydroxyTyr 部位の可能性のある 4 つの立体異性体の合成と環状ペプチドの固相合成について検討した.

【方法と結果】① Boc-β-hydroxyTyr(MEM)-OH 全立体異性体の合成 ; *p*-Hydroxy benzaldehyde を出発原料とし, 2 工程で Ethyl 3-(4'-MEMOPh)propenoate を得た. 続いて Sharpless の不斉アミノヒドロキシル化反応などを用い, 2 工程で (2*S*, 3*R*) 体ならびに (2*R*, 3*S*) 体を合成した. また, 不斉ジヒドロキシル化反応などを用い, 5 工程で (2*R*, 3*R*) 体ならびに (2*S*, 3*S*) 体を合成した. ② 環状ペプチドの合成 ; Fmoc 固相合成法を適用したモデルペプチドの合成を検討した. 樹脂には 2-Chlorotrityl chloride resin を用いた. 合成した Boc-β-hydroxyTyr(MEM)-OH が N 末端になるように, Fmoc-Ser (*t*Bu)-OH を出発アミノ酸として順次アミノ酸をカップリングし, 続いて樹脂から切り出した直鎖ペプチドを HCl/dioxane (4M) で 1 分間処理することで Boc 基と MEM 基のみを選択的に脱保護した. その後 HATU, HOAt による分子内縮合を行うことで望む環化体を得ることができた. 現在最終脱保護ならびに他の異性体を用いた合成を検討中である. FAA 導入モデルペプチドや抗真菌活性について, 合わせて報告する.



Bk-1229　　model peptide　　Boc-β-hydroxyTyr(MEM)-OH

1) Tawfik K. A. *et al. Org. Lett*. 2010; 12(4):664-6.

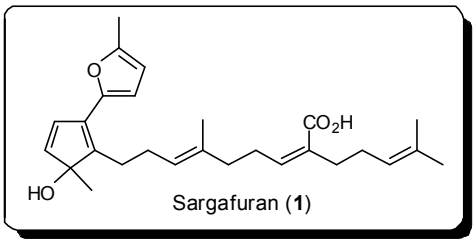
Antifungal, *Burkholderia ambifaria*, Cyclic lipopeptide

講演番号：2A07p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ A校舎07会場

Sargafuran の合成研究

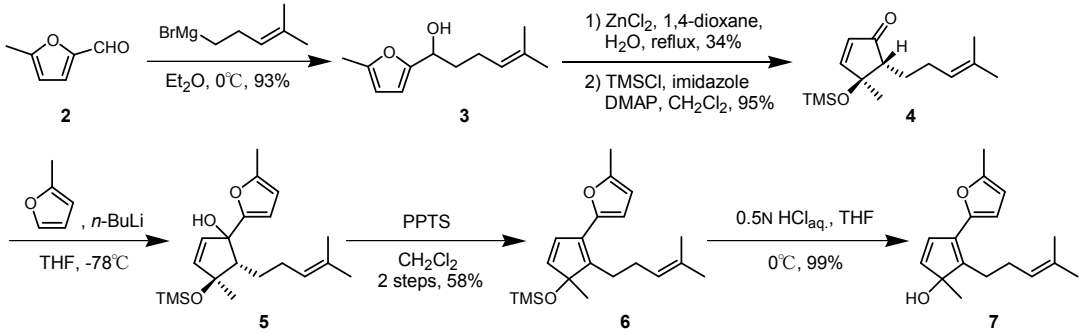
Synthetic Study of Sargafuran

○青木 一矢、勝田 亮、矢島 新、額田 恭郎（東農大応生）
○Kazuya Aoki, Ryo Katsuta, Arata Yajima, Tomoo Nukada (Tokyo University of Aguriculture)

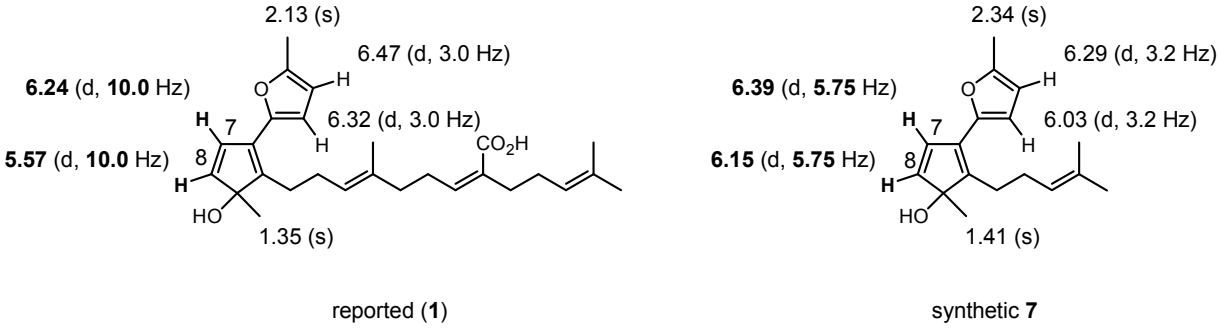


Sargafuran (**1**)は、海洋性褐色藻類 *Sargassum macrocarpum* より単離、構造決定されたテルペン誘導体である。本化合物は、ニキビの原因菌 *Propionibacterium acnes* に対して高い抗菌活性作用を示すことに加え、ヒトの細胞に対する毒性は低いことが報告されている。この理由により **1** は、新規の抗 *P. acnes* 物質開発のためのリード化合物として期待されている。このため合成研究は誘導体も合成可能かつ効率的経路の確立を目的とした。

フルフラール誘導体 **2** をアルキル化し化合物 **3** へと導いた。これに塩化亜鉛を作用させることによりフラン環の開環及び分子内アルドール縮合反応が進行しシクロペンテノン誘導体を得た後 3 級水酸基を TMS 基により保護し化合物 **4** を合成した。次に、 **4** と 2-メチルフランをカップリング反応に付し化合物 **5** を得た後 3 級水酸基の脱水及び TMS 基の除去によりフリルシクロペンタジエノール **7** を合成することに成功した。



上述のように、sargafuran 提唱構造左側に相当するフリルシクロペンタジエン部分を合成することに成功し、これと天然物 **1** との ^{1}H NMR スペクトルの比較を行った。その結果、両化合物の ^{1}H NMR の化学シフト及び 7,8位のプロトンの結合定数に顕著な差が見られた。このことから sargafuran の提唱構造は誤りがあることがわかった。

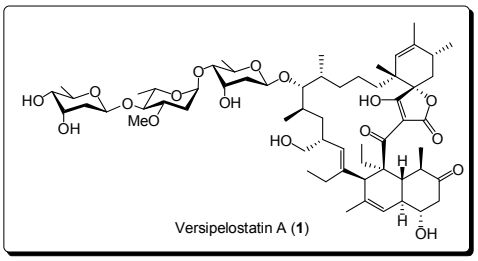


Sargafuran, anti-*P. acnes*, furylcyclopentadiene

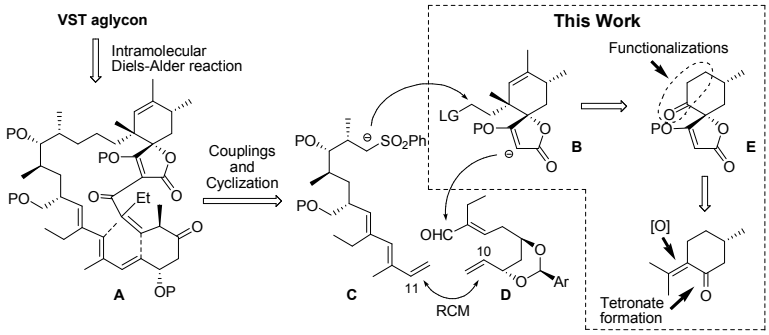
講演番号：2A07p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ A校舎07会場

Versipelostatin A 天然型スピロテトロン酸ユニットの合成
Synthesis of the Spirotetoronate Unit of Versipelostatin A

○勝田 亮、新井一哉、籠原裕磨、矢島 新、額田恭郎（東農大応生）
○Ryo Katsuta, Kazuya Arai, Yuuma Kagohara, Arata Yajima, Tomoo Nukada
(Tokyo University of Agriculture)

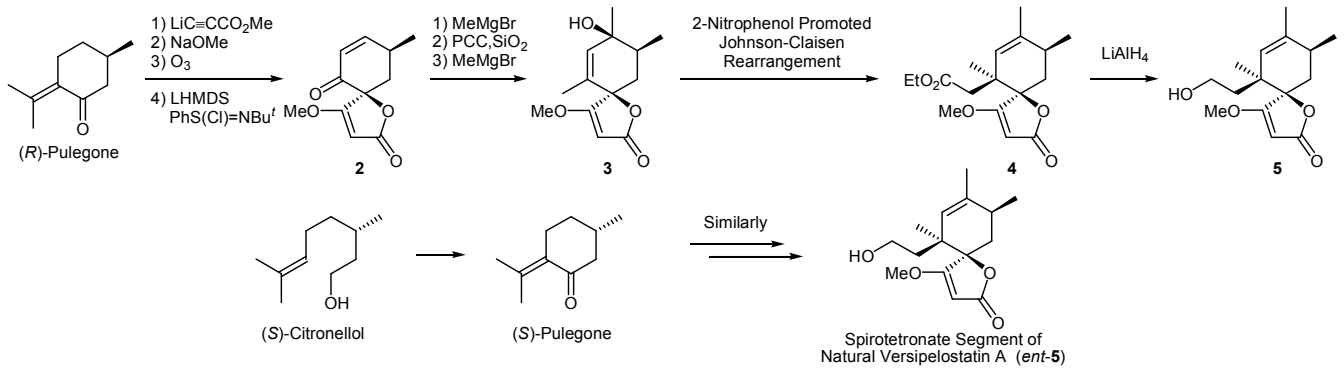


【目的】Versipelostatin A (VST, **1**) は2004年、新家らにより単離された分子シャペロンGRP78の誘導阻害活性を示す化合物である。GRP78は固形ガン細胞におけるストレス応答に重要な役割を果たしており、その誘導を阻害する化合物は固形ガンに対する新規治療薬となることが期待できる。また、VSTはスピロテトロン酸、オクタリンを含む17員環化合物の3糖配糖体でありその構造は特異である。我々は本化合物の生物活性および構造に興味を持ち合成研究を開始した。



【方法】VSTを効率的に合成するにあたりスピロテトロン酸部分の構築とマクロ環化反応が鍵となる。我々はユニット**B**, **C**, **D**より集約的に25員環中間体**A**を合成した後に、分子内Diels-Alder(IMDA)反応によりオクタリン部分を構築する戦略を立案した。前年度大会においてはこのうちスピロテトロン酸部分の合成研究について発表したが、今回その詳細とユニット**B**の天然型立体異性体の合成について報告する。

【結果】まずモデル実験の出発原料として安価な(*R*)-pulegoneを設定した。カルボニル基をスピロラクトンへと変換、オレフィンを足掛かりにエノン**2**とした後、アリルアルコール**3**へと導いた。続いて鍵反応であるJohnson-Claisen転位を行なうことにより、VSTスピロテトロン酸部**5**の簡易な合成法の開発に至った(9工程、総収率8.9%)。続いて同様の方法をシトロネラールから誘導可能な(*S*)-pulegoneに適用し、天然型スピロテトロン酸部の合成にも成功したので報告する。



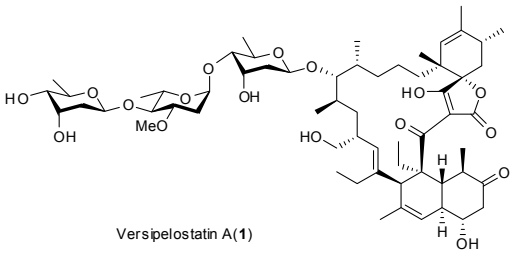
Versipelostatin A, tetronate, Claisen rearrangement

講演番号：2A07p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ A校舎07会場

Versipelostatinマクロ環およびオクタリン構築の検討

Study for the Macrocyclization and Formation of the Octalin Segment of Versipelostatin A

○山本 健人、小鷲 真衣、廣嶋 将純、勝田 亮、矢島 新、額田 恭郎（東農大応生）
○Kento Yamamoto, Mai Kowashi, Masayoshi Hiroshima, Ryo Katsuta, Arata Yajima, Tomoo Nukada(Tokyo University of Agriculture)

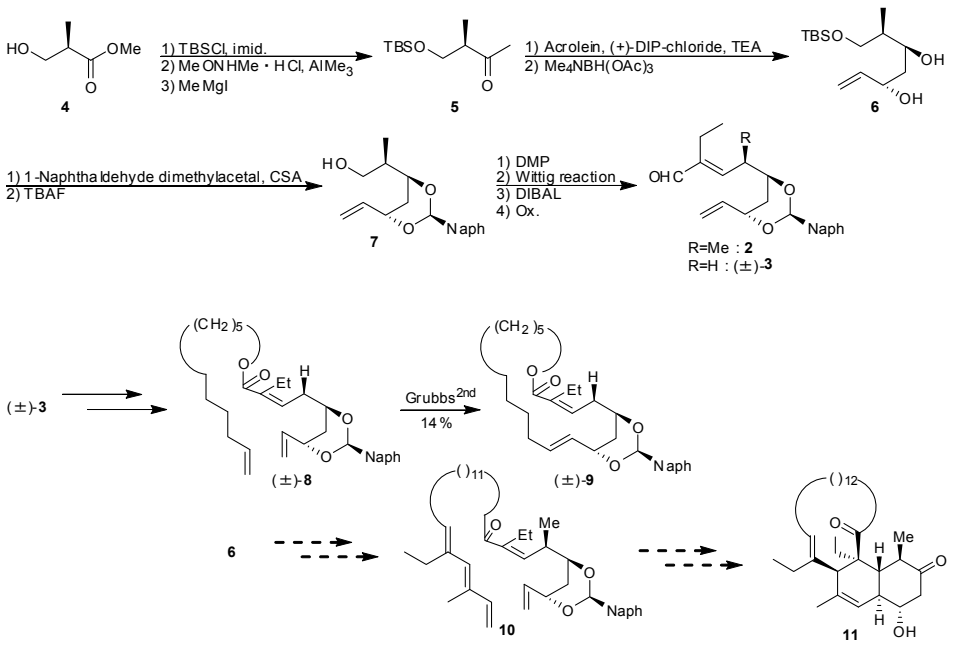


Versipelostatin A(**1**)

Versipelostatin A(VST A, **1**)は 2002 年新家らによって *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6 株の培養液より単離された 17 員環ペンタデカケチド化合物三糖配糖体である。本化合物は分子シャペロン GRP78 の誘導阻害活性を有している。GRP 78 は 90% 以上の固形癌細胞や、成長期の哺乳類の小胞体において発現することが知られているため、成人においては固形癌に対し特異的に作用する副作用の少ない治療薬となることが期待されている。我々は VST の構造活性相関研究および活性発現機構の解明を目的として VST の合成研究を行っている。

本研究では VST 合成に必要な下部ユニット **2**, (±)-(**3**)の合成を行った。Methyl (*R*)-(-)-3-hydroxyisobutylate(**4**)よりケトン **5** を調製し、Acrolein との aldol 縮合、ジアステレオ選択的還元を行いジオール **6** とした。ナフチルメチリデン保護と(*E*)-選択的 Wittig 反応による C4 単位の導入を経て VST 下部ユニット **2** の合成を達成した。また、別途マクロ環形成反応と分子内 Diels-Alder 反応の検討のためモデル化合物(±)-**3** を合成した。

(±)-(**3**)より **8** を調製してマクロ環形成反応を行ったところ、低収率ながら 19 員環の閉環反応に成功した。現在は末端にトリエン構造を有する化合物 **10** での閉環反応、オクタリン構築のための分子内 Diels-Alder 反応の検討、および上部スピロテトロン酸部等、他ユニットとのカップリング反応の検討を行っている。



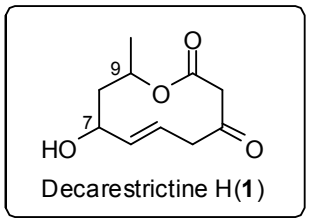
Versipelostatin A, GRP 78, Diels-Alder reaction

講演番号：2A07p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ A校舎07会場

Decarestrictine H の合成研究

Synthetic Study of Decarestrictine H

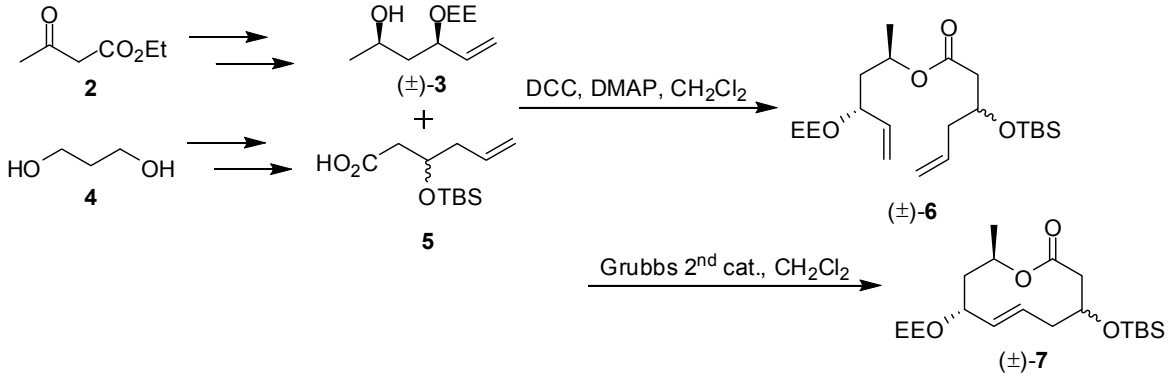
○下平 雄一郎、勝田 亮、矢島 新、額田 恭郎（東農大・応生）
○Yuichiro Shimodaira, Ryo Katsuta, Arata Yajima, Tomoo Nukada (Tokyo University of Aguriculture)



Decarestrictine H(**1**)

【目的】Decarestrictine類は、*Penicillium*属より単離構造決定された10員環ラクトンを中心としたペンタケチド類である。これらのうちの数種はHEP-G2細胞に対しコレステロール生合成を抑制することが報告されており、新規脂質異常症治療薬となることが期待されている。なかでもDecarestrictine H (**1**)は33%と比較的強力なコレステロール生合成抑制効果を有するにも拘わらず、7-位と9-位の立体化学が未解明なままであり合成研究も為されていない。合成化学的手法を用いて本化合物の可能な4種の立体異性体を合成することで立体化学を決定し、構造活性相関研究を行うことを目的とした。

【方法と結果】Decarestrictine H (**1**)を合成するにあたり、エステル部分をあらかじめ合成しておき、後に閉環メタセシス反応により10員環形成を行う合成戦略を試みた。すなわち3-オキソブタン酸エチル(**2**)より数段階でアルコール**3**を合成した。また、1,3-プロパンジオール(**4**)をカルボン酸**5**へと誘導し、これとアルコール**3**とのDCCを用いた縮合によりエステル**6**を調製した。エステル**6**に対し第2世代Grubbs触媒を用いた閉環メタセシス反応を行ったところ10員環ラクトン**7**を得ることに成功した。



今後は、保護基の除去と酸化反応を経て、(7*R**, 9*R**)-Decarestrictine H (**1**)の合成を達成する予定である。本法を応用すれば他の3種の立体異性体合成も可能であると考えられることから、引き続き全立体異性体を合成して、Decarestrictine H (**1**)の立体化学を決定する計画である。

Decarestrictine H, Ring Closing Metathesis, HEP-G2

講演番号:2A07p13
講演日時、会場:3月23日16:21～ A校舎07会場

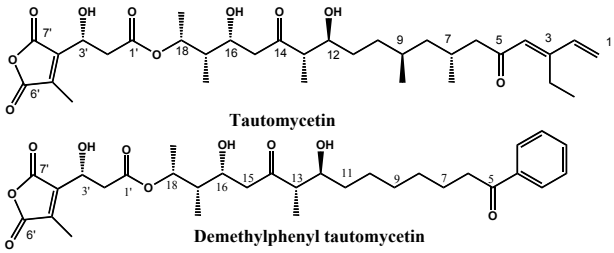
Tautomycetinの合成研究(5)

Synthetic study of tautomycetin (5)

○今村龍太郎　重冨顕吾　生方　信（北大院農）

○Ryutaro Imamura, Kengo Shigetomi, Makoto Ubukata (Hokudai)

【研究背景】Tautomycetin(TC)は放線菌 *Streptomyces griseochromogenes* より単離・構造決定された化合物であり、抗真菌活性を有する抗生物質である。また、TC は 1 型のセリン/スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素(PP1)に特異的な阻害剤であることが明らかにされており、細胞内シグナル伝達機構の解明や、抗がん剤などの薬剤としての利用が期待される。しかし TC 自体の脆弱性ゆえに全合成においても収率の低下を招く可能性がある。そこでファンクション-オリエンテッド　シンセシス(FOS)による化合物としての安定性を備えたトウトマイセチン誘導体(Demethylphenyl　tautomycetin)の合成を行った。誘導体の設計においては TC と PP1 複合体の水素結合ネットワークの観察により、PP1 との効果的な結合が予想される構造を採用した。



【方法・結果】逆合成解析によりTC誘導体をC15、C16間で大きく二つのセグメントに分割し、無水マレイン酸構造を含むセグメントをセグメントA、芳香環を含むセグメントをセグメントBとした。両者のカップリングにはアルドール反応を用いることにした。

各セグメントの合成を試み、acetylene dicarboxylic acid と *trans*-3-pentenoyl chloride から選択的キュプラート反応、(+)-DIPCl による不斉還元、二重結合の酸化的開裂を行い、セグメント A の基本骨格の合成を行った。C11-C15 セグメントと C16-C18 セグメントは methyl tiglate からシャープレスの不斉酸化、Jung のアルデヒド合成法を経て立体選択的に合成した。残る C1-C10 セグメントは acetylhexenol を加水分解し臭素化したものを、^{t}BuLi を用いて benzaldehyde とカップリングさせた。その後、水酸基の保護、オゾン酸化を行い、5 ステップで C1-C10 セグメントを合成した。今後、これらフラグメントのカップリングを行い、Demethylphenyl tautomycetin の合成を達成する予定である。また並行して TC の全合成についても検討している。

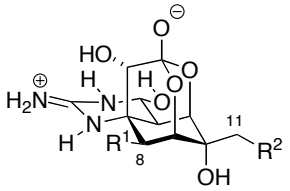
講演番号：2A07p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ A校舎07会場

8-デオキシテトロドトキシンの立体制御合成

Stereocontrolled Synthesis of 8-Deoxytetrodotoxin

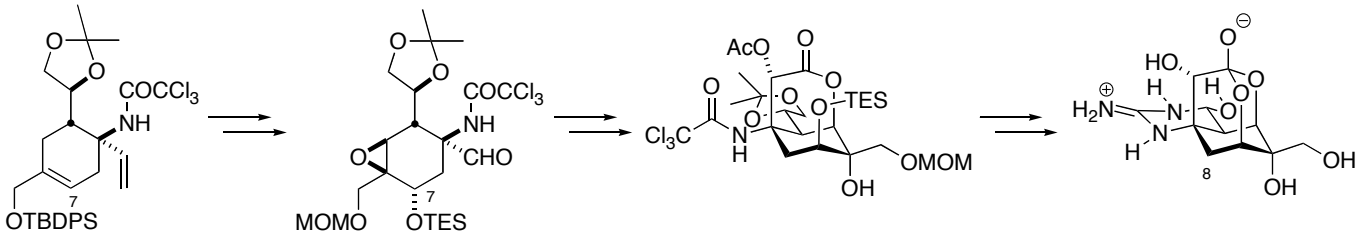
○所　聖太、安立昌篤、磯部　稔[1]、西川俊夫（名大院生命農、[1]台湾国立清華大）
○Shouta Tokoro, Masaatsu Adachi, Minoru Isobe[1], Toshio Nishikawa
(Nagoya University, [1]National Tsing Hua University)

【目的】フグ毒テトロドトキシン(TTX, **1**)は、電位依存性Na^+チャネルを強力に阻害する。我々は、多くの官能基を持つTTXとNa^+チャネルとの詳細な構造活性相関を明らかにするため、TTX類縁体の合成研究を行ってきた。天然由来の11-deoxyTTX(**2**)と当研究室で化学合成した8,11-dideoxyTTX(**3**)[1)]がそれぞれTTXの約1/60、1/2000の阻害活性を示す[2)]ことより、TTXの8位水酸基がNa^+チャネル阻害に重要な役割を果たしていると考えた。本研究では、天然から入手できない8-deoxyTTX(**4**)を化学合成によって供給し、Na^+チャネル阻害活性に及ぼす8位水酸基の効果をより明確に調べることを目的とした。



TTX (**1**) : R^1 = OH, R^2 = OH
11-deoxyTTX (**2**) : R^1 = OH, R^2 = H
8,11-dideoxyTTX (**3**) : R^1 = H, R^2 = H
8-deoxyTTX (**4**) : R^1 = H, R^2 = OH

【方法および結果】当研究室で大量合成法の確立された中間体**5**[3)]から、トリクロロアセトアミド基の隣接基関与を利用して7位に水酸基を導入した。環内オレフィンをエポキシ化した後、7位水酸基の立体配置の反転とビニル基のオゾン分解によって、アルデヒド**6**を合成した。続いてカルボン酸等価体としてアセチレンを導入した後、そのアセチレンを過マンガン酸で酸化的に切断し、エポキシドの開環を伴うラクトン化により**7**を得た。オルトエステルの構築、アセトニドの脱保護とグアニジンの導入を経て、8-deoxyTTX(**4**)の合成を完了した。



5　　**6**　　**7**　　8-deoxyTTX (**4**)

References

1) Nishikawa, T.; Urabe, D.; Yoshida, K.; Iwabuchi, T.; Asai, M.; Isobe, M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2679.
2) Yotsu-Yamashita, M.; Urabe, D.; Asai, M.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *Toxicon* **2003**, *42*, 557.
3) Satake, Y.; Nishikawa, T.; Hiramatsu, T.; Araki, H.; Isobe, M. *Synthesis* **2010**, *12*, 1992.

tetrodotoxin, natural products synthesis, sodium channel

講演番号：2A07p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ A校舎07会場

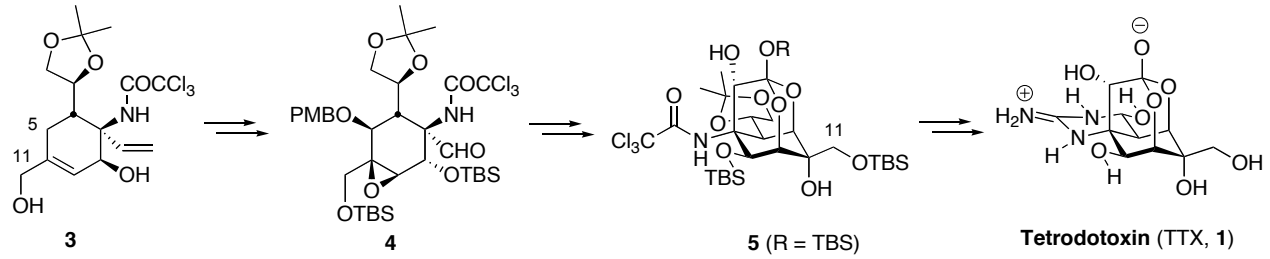
テトロドトキシンおよびチリキトキシンの合成研究

Synthetic Studies on Tetrodotoxin and Chiriquitoxin

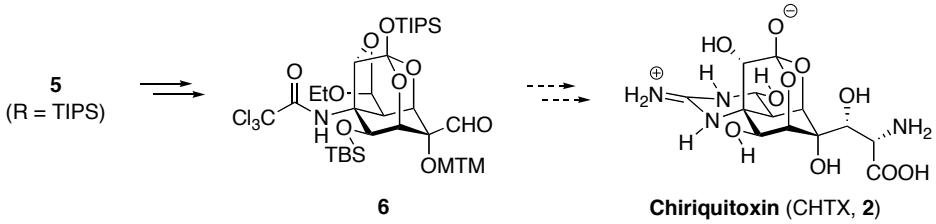
○榊原　良、安立昌篤、佐竹佳樹、磯部　稔[1]、西川俊夫 (名大院生命農、[1]台湾国立清華大)
○Ryo Sakakibara, Masaatsu Adachi, Yoshiki Satake, Minoru Isobe[1], Toshio Nishikawa
(Nagoya University, [1]National Tsing Hua University)

【目的】フグ毒テトロドトキシン(TTX, **1**)とコスタリカ産矢毒ガエル *Atelopus chiriquiensis* より単離されたチリキトキシン(CHTX, **2**)は、電位依存性ナトリウムチャネルの強力な阻害活性を持つ天然有機化合物である[1,2]。我々は、これら TTX 類の強力な生理活性と特異な化学構造に興味を持ち、これまでに 2 度の TTX の全合成とその類縁体の合成を報告してきた。本研究では、11 位水酸基を修飾した TTX 類縁体を合成するためのより柔軟な合成法の開発と TTX (**1**) および CHTX (**2**) の全合成を検討した。

【方法および結果】当研究室では最近、11位に水酸基を持つ中間体 **3** の合成を報告し[3]、**3** からの5-deoxyTTXの全合成に成功している[4]。本研究でも **3** を用いることで、TTX (**1**) およびCHTX (**2**) が効率的に合成できると考えた。中間体 **3** からSeO_2によるアリル酸化によって5位へ水酸基を導入した後、エポキシ化とオゾン酸化によってアルデヒド **4** を合成した。続いて、5-deoxyTTXの合成法に従いオルトエステル **5** (R=TBS)を合成し、グアニジンを導入することでTTX (**1**) の全合成を完了した。



CHTX (**2**)の合成には、**4**から同様の手法で調製可能なオルトエステル **5** (R=TIPS)を用いることとした。現在、11位水酸基を酸化したアルデヒド **6** に対し、グリシン側鎖の導入を検討中である。



References 1) Kim, Y. M.; Brown, G. B.; Mosher, H. S.; Fuhrman, F. A. *Science* **1975**, *189*, 121. 2) Yotsu, M.; Yasumoto, T.; Kim, Y. H.; Naoki, H.; Kao, C. Y. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3187. 3) Satake, Y.; Nishikawa, T.; Hiramatsu, T.; Araki, H.; Isobe, M. *Synthesis* **2010**, 1992. 4) 佐竹佳樹，西川俊夫，磯部　稔 第 94 回有機合成シンポジウム, O-33, 2008 年.

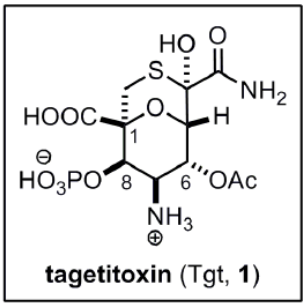
tetrodotoxin, natural products synthesis, sodium channel

講演番号：2A07p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ A校舎07会場

植物毒素Tagetitoxinの合成研究

Synthetic Studies on Tagetitoxin, a Phytotoxin

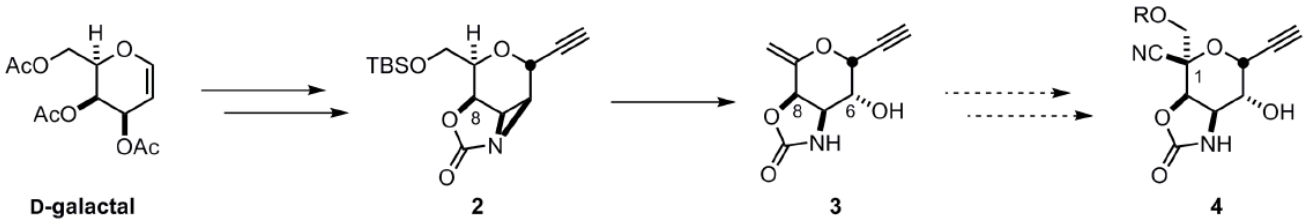
○山田 ひと美、安立 昌篤、西川 俊夫（名大院生命農）
○Hitomi Yamada, Masaatsu Adachi, Toshio Nishikawa (Nagoya University)



tagetitoxin (Tgt, **1**)

【目的】Tagetitoxin (Tgt) は、1981年にMitchellらによって頂端萎黄病の原因物質として植物病原性細菌*Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*の培養液から単離された植物毒素である[1)]。Tgtは葉緑体内のRNAポリメラーゼ (RNAP) に対して阻害活性を示し、真核生物のもつRNAP I、IIおよびIIIのうちRNAP IIIのみを選択的に阻害する[2)]。このため生化学の分野ではRNAP阻害剤として利用され、また近年RNAP－Tgt複合体の結晶構造解析が報告されるなど注目されている[3)]。しかしながら、Mitchellらの構造解析研究では、絶対立体化学およびカルボン酸とアミドの位置が未だ決定されていない。本研究では、構造決定を目的としてTgt (**1**) の合成研究を行った。

【方法および結果】D-Galactalを出発原料として、オキサチアン環とアミドの構築の足がかりとなるアセチレンを*C*-グリコシル化反応により立体選択的に導入した。その後、8位水酸基を利用して立体特異的にアジリジン化することで環状カーバメート**2**を得た。アジリジンの開環による6位への水酸基の導入とエキソオレフィンの構築によって、望む四連続不斉中心をもつアルコール**3**の合成に成功した。現在は、エキソオレフィンのエポキシ化と続くシアニドの付加によって、1位が四級化されたニトリル**4**の合成を検討している。



D-galactal **2** **3** **4**

【参考文献】

1) (a) Mitchell, R. E. et al. *Physiol. Plant Pathol.* **1981**, *18*, 157. (b) Mitchell, R. E. et al. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 501.
2) (a) Mathews, D. E. et al. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 493. (b) Steinberg, T. H. and Mathews, D. E. et al. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 499.
3) Artsimovitch, I. et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 1086.

tagetitoxin, RNA polymerase, aziridine

講演番号：2A07p17
講演日時、会場：3月23日17:15～ A校舎07会場

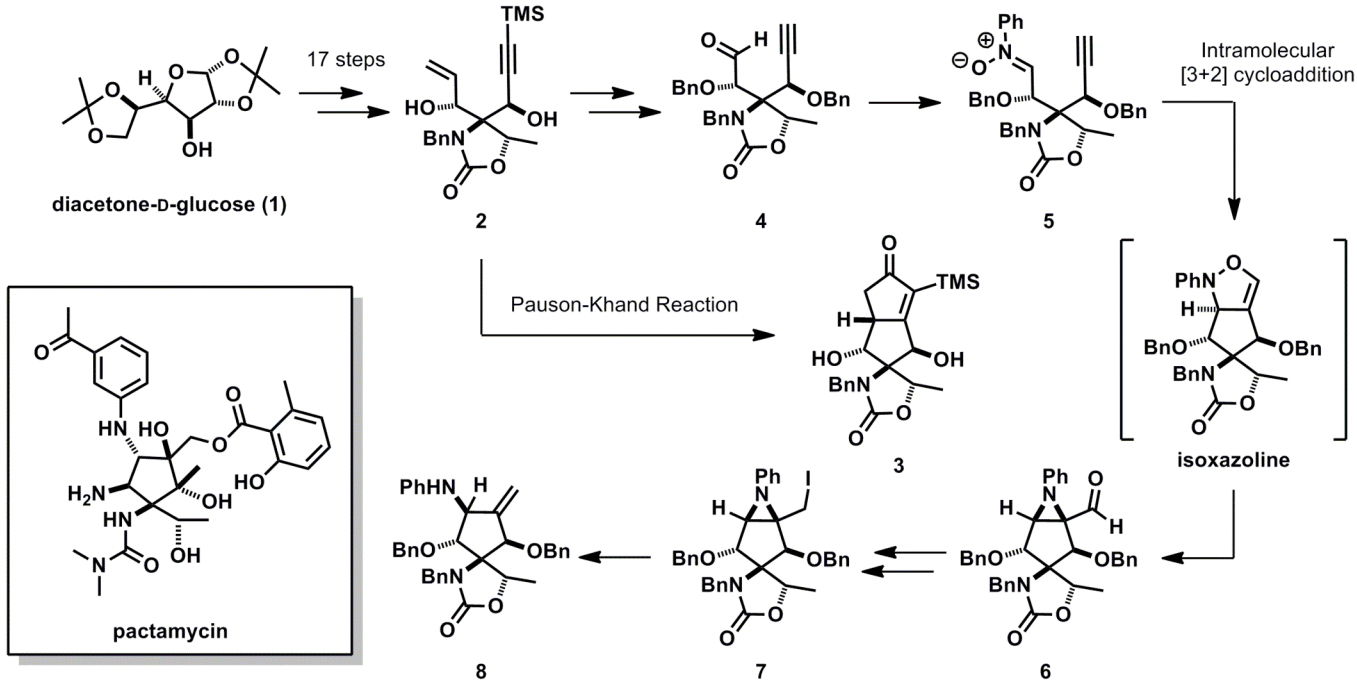
抗腫瘍性抗生物質パクタマイシンの合成研究

Synthetic Studies toward Pactamycin, an Antitumor Antibiotic

○松本　信之、辻本　恭、中崎　敦夫、西川　俊夫（名大院生命農）
○Nobuyuki Matsumoto, Takashi Tsujimoto, Atsuo Nakazaki, Toshio Nishikawa (Nagoya University)

【目的】放線菌*Streptomyces pactum* var *pactum*より単離されたパクタマイシン[1]は、強力な抗腫瘍活性と抗菌活性を示す抗生物質である[2]。この化合物は、シクロペンタン骨格を構成するすべての炭素が酸素または窒素で官能基化された不斉中心という特徴的な構造を有する。このような複雑な骨格の合成は、有機合成化学上チャレンジングなテーマであり、本研究では、このパクタマイシンとそのアナログの合成法の開発を目的とする。

【方法と結果】当研究室では、当初パクタマイシンのシクロペンタン骨格をエンイン**2**のPauson-Khand反応によって得られる環化体**3**から構築する計画[3]であったが、今回新たに立案したナイトロンとアセチレンの分子内[3+2]環化付加反応による骨格構築を検討した。出発基質であるdiacetone-D-glucose (**1**)から17工程でエンイン**2**を合成し[3]、アルデヒド**4**を経由してナイトロン**5**を調製した。ナイトロン**5**は室温で環化反応が進行したが、生成物は期待したイソオキサゾリンではなくアジリジンアルデヒド**6**であった。得られたアジリジンアルデヒド**6**をヨウ化物**7**に誘導し、開環反応によってパクタマイシン合成に必要な足がかりを有するアリルアミン**8**の合成に成功した。



1) J. A. Fox, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1962**, 184.
2) C. G. Smith, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1962**, 191.
3) T. Nishikawa, et al. *Synlett* **2005**, 433.

Keyword1 : Pactamycin, Keyword2 : cycloaddition, Keyword3 : aziridine

講演番号：2A07p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ A校舎07会場

ソラノエクレピンA右側部分の合成研究

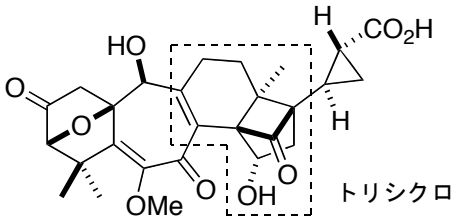
Synthetic Studies on Right Part of Solanoeclepin A

○駒田武馬、安立昌篤、西川俊夫（名大院生命農）
○Takema Komada, Masaatsu Adachi, Toshio Nishikawa (Nagoya University)

【目的】ソラノエクレピンAはジャガイモ水耕栽培液より単離された、ジャガイモシストセンチュウの孵化促進物質である。その構造は、三員環から七員環までのすべての炭素環によって構成され、特に右側部分には高度に歪んだシクロブタンを含むトリシクロ[5.2.1.$0^{1,6}$]デカンが存在している。ソラノエクレピンAは天然より極微量しか得ることができないため、特異な構造と孵化活性との詳細な構造活性相関は明らかにされていない。本研究では、ソラノエクレピンAの全合成および構造活性相関研究を目的として、トリシクロ[5.2.1.$0^{1,6}$]デカンを含む右側部分の合成を検討した。

【方法および結果】トリシクロ[5.2.1.$0^{1,6}$]デカンの合成において、連続する不斉四級炭素を含む高度に歪んだシクロブタンの構築が最大の課題である。そこで、ラジカル環化反応によってシクロブタンを合成すると同時に、トリシクロデカン骨格を構築できる効率的な合成計画を立案した。

光学活性なHajos-Parrishケトンから四段階で環化前駆体を合成した。この前駆体を用いてラジカル環化反応を行ったところ、高度に歪んだシクロブタンを含むトリシクロデカンを良好な収率で合成することに成功した。現在、右側部分の合成にむけて環化体からシクロプパン側鎖の構築を検討している。



solanoeclepin A

solanoeclepin A, radical cyclization, cyclobutane

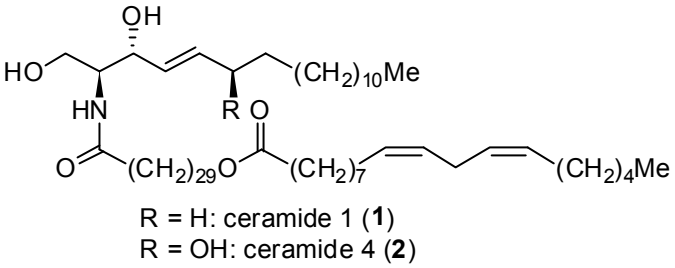
講演番号：2A07p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ A校舎07会場

ヒトの表皮に含まれるセラミドの合成

Synthesis of ceramides contained in human epidermis

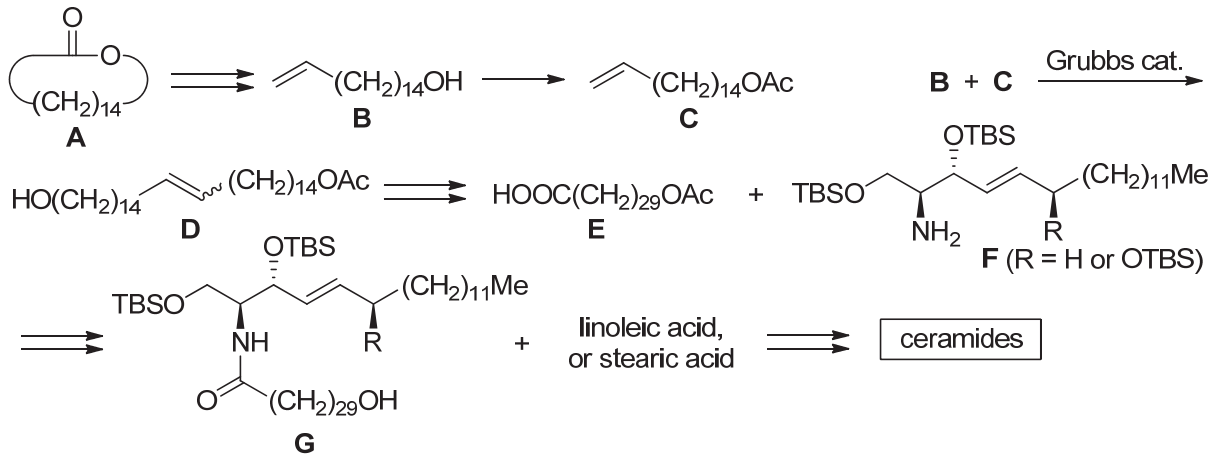
○田代 卓哉、濱中 すみ子[1]、森 謙治（理研・RCAI、[1]理研・BSI）
○Takuya Tashiro, Sumiko Hamanaka[1], Kenji Mori (RIKEN RCAI, [1]RIKEN BSI)

【目的】ヒトを含め、哺乳類の表皮には長鎖のω-ヒドロキシカルボン酸や、そのω-末端がエステル化されたアシル鎖を有するセラミド成分が含まれている。Ceramide 1 (**1**) および ceramide 4 (**2**) はヒトの皮膚中に存在するセラミドであり、老齢者では 6-位が酸化された **2** の構成割合が増加していることが知られている。また、アシル側鎖のω-末端にリノール酸ではなくステアリン酸がエステル結合したセラミドの存在も報告されている。これらは体表の保湿ならびに防御機能において重要な役割を担っていると考えられている。しかし **1** および **2** はいずれも天然からの供給が困難である。そこで一連の ceramide 成分を効率的に合成し、詳細な活性試験を行うための生物学者へのサンプル供給を行うことを目的として研究に着手した。



R = H: ceramide 1 (**1**)
R = OH: ceramide 4 (**2**)

【方法と結果】15-Pentadecanolideから導かれる２種のオレフィン **B** と **C** とをcross-olefin metathesis 反応に付すことで **D** を得た。水素添加反応、酸化反応によってω-ヒドロキシカルボン酸保護体（**E**）を調製した。アセチル保護基を選択的に除去して得られる **G** を経ることで、様々な ceramide 成分を共通中間体から簡便に合成できる経路を確立した。



ceramide, epidermis, olefin metathesis

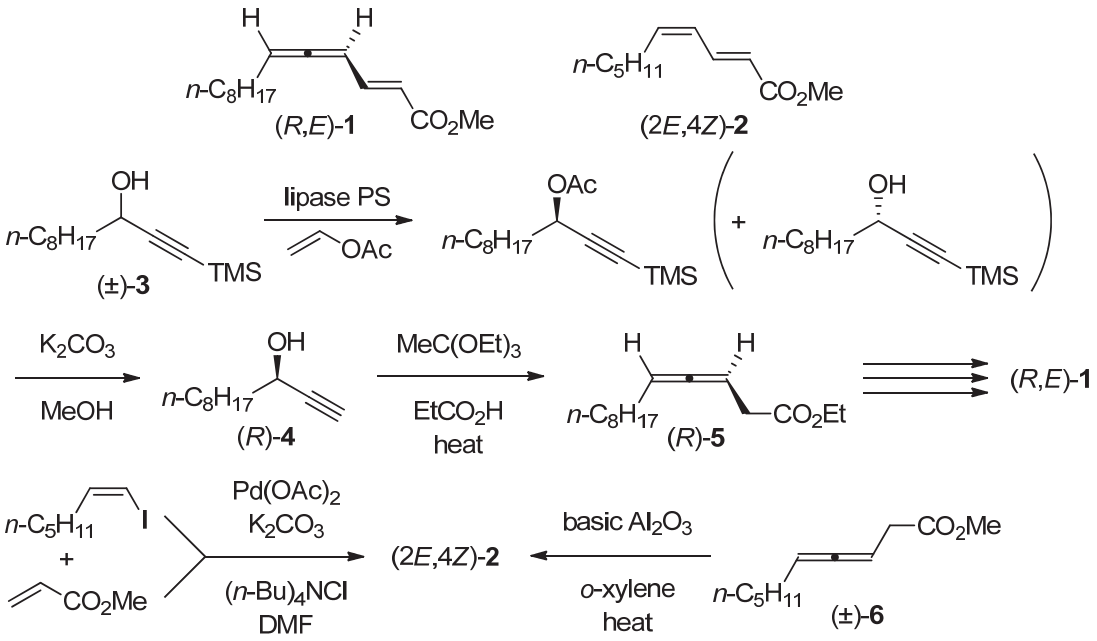
講演番号：2A07p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ A校舎07会場

貯穀害虫dried bean beetleの雄のフェロモン構成成分である(*R*,*E*)-2,4,5-テトラデカトリエン酸メチルと(2*E*,4*Z*)-2,4-デカジエン酸メチルの合成

Synthesis of methyl (*R*,*E*)-2,4,5-tertadecatrienoate and methyl (2*E*,4*Z*)-2,4-decadienoate, the pheromone components of the male dried bean beetle

○森 謙治[1,2] ([1]東洋合成、[2]理研・RCAI)
○Kenji Mori[1,2] ([1]Toyo Gosei Co., Ltd., [2]RIKEN RCAI)

【目的】貯穀害虫である dried bean beetle (*Acanthoscelides obtectus*) の雄が放出するフェロモンの構成成分である２種の表題化合物 **1** と **2** を合成する。特に、光学活性アレンである天然フェロモン成分 methyl (*R*,*E*,)-2,4,5-tetradecatrienoate (**1**) の鏡像体純度を決定する。
【方法】(±)-1-Trimethylsilyl-1-undecyn-3-ol (**3**) を、リパーゼPS (天野) と酢酸ビニルにより不斉アセチル化反応に付することで光学分割した。得られた(*R*)-1-undecyn-3-ol (**4**) とオルト酢酸トリエチルとをプロパン酸存在下加熱して反応させオルトエステルClaisen転位反応を行って、光学活性アレン部位 **5** を構築した。生成物を、最終物であるmethyl (*R*,*E*)-2,4,5-tetradecatrienoate (**1**) に誘導した。第２成分の methyl (2*E*,4*Z*)-2,4-decadienoate は、Pd触媒を用いるHeck反応や、methyl (±)-3,4-decadienoate (**6**) の (2*E*,4*Z*)-decadienoate への塩基性アルミナ存在下の熱転位反応を用いて合成した。
【結果】(1) 天然の methyl (*R*,*E*)-2,4,5-tetradecatrienoate (**1**) の鏡像体純度はHamburg大学 W. Francke 教授のGC分析により87%eeと決定された。
(2) Methyl (2*E*,4*Z*)-2,4-decadienoate (**2**) の合成にはPd触媒を用いるHeck反応よりアルミナを触媒とする転位反応の方が有効であった。



allene, optically active; dried bean beetle; pheromone

講演番号：2C09a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ C校舎09会場

*Arabidopsis thaliana*由来3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼの活性制御機構に関する研究

Regulatory mechanisms of 3-phosphoglycerate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*

○岡村　英治[1,2]、平井　優美[1,2] ([1]理研PSC、 [2]JST CREST)
○Eiji Okamura[1,2], Masami Yokota Hirai[1,2] ([1]RIKEN PSC、 [2]JST CREST)

【目的】セリンはシステインやメチオニンなどの硫黄代謝にかかわるアミノ酸や、植物ホルモンオーキシンの前駆アミノ酸であるトリプトファンなどの基本骨格を構成する重要なアミノ酸である。従って、セリン生合成の代謝調節機構を詳細に理解することは、硫黄代謝や植物ホルモン代謝を理解する上で重要である。セリン生合成の代謝調節機構はバクテリアにおいて詳細に明らかにされており、初発反応を触媒する酵素である3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (3-PGDH) が、最終産物であるセリンによってアロステリックな活性制御を受けることで代謝の制御が行われている。一方、植物ではその代謝調節機構は明らかにされていなかった。そこで、本研究ではモデル植物であるシロイヌナズナを対象として、未だ明らかにされていないセリン生合成の代謝調節機構の解明を目的とする。
【方法】シロイヌナズナでは、3-PGDHホモログが3種類存在しており、互いにアミノ酸レベルで70%程度の高い相同性を有している。BLAST検索の結果、それらの3-PGDHホモログのC末端側に、アロステリックエフェクターとして働くアミノ酸の結合ドメインであるACT domainの存在が示唆された。このことから、シロイヌナズナではバクテリアと同様3-PGDHが何らかのアミノ酸によってアロステリックな活性制御を受けており、代謝が調節されていると推測した。そこで、シロイヌナズナの3-PGDHホモログのひとつであるEDA9 (At4g34200) の組換えタンパク質を作出して、20種類のアミノ酸をそれぞれ添加した場合の3-PGDH活性の変化を検討した。
【結果】その結果、終濃度10 mMのシステイン、アラニン、バリンおよびメチオニンの添加によりその活性が半分に低下した。さらに、メチオニンは終濃度1 mMでも活性の低下が観察された。一方、当初の予測に反して、セリンを添加した場合にはEDA9の3-PGDH活性は変化しなかった。この結果から、シロイヌナズナの3-PGDHはバクテリアと同様アロステリックな活性制御を受けてはいるものの、そのエフェクターはセリンではなくメチオニンであることが示唆された。
　今回の結果は、植物に特異的なセリン生合成の代謝調節機構の存在を示すものであり、その生理学的な意義に興味が持たれる。現在、EDA9およびそのホモログを含めた組換えタンパク質の詳細な酵素学的パラメーターの検討を行うとともに、より効果的なアロステリックエフェクターであると推測されるメチオニン誘導体を用いた網羅的な活性の検討を行っている。今後、生化学的な観点のみならず、構造生物学的、遺伝学的および生理学的な観点からも植物におけるセリン生合成の代謝調節機構を解明する予定である。

Arabidopsis thaliana, amino acid biosynthesis, ACT domain

講演番号:2C09a02
講演日時、会場:3月23日09:11～ C校舎09会場

超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来システイン合成酵素 *O*-phosphoserine sulfhydrylase (OPSS)の熱安定性と有機溶媒安定性について

Analysis of *O*-phosphoserine sulfhydrylase (OPSS) from hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1 for the thermal stability and for the stability toward organic solvent

○中村　卓、浅井　伸次、武田　瑛美、石川　一彦[1] (長浜バイオ・バイオサイエンス、[1]産総研・バイオマス研究センター)
○Takashi Nakamura, Shinji Asai, Emi Takeda, Kazuhiko Ishikawa[1] (Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [1]AIST)

【目的】
超好熱性古細菌*Aeropyrum pernix* K1由来のシステイン合成酵素*O*-phosphoserine sulfhydrylase (OPSS)は、熱に安定な*O*-ホスホセリンと硫化物イオンを基質とし、80℃でシステインを効率よく合成できる。さらに、近年、硫化物イオンの代わりに様々な求核剤を用いることで、OPSSにより薬剤となり得る非天然アミノ酸を合成できることが確認された。酵素法による非天然アミノ酸の工業生産を考えたとき、使用する酵素の耐熱性、有機溶媒安定性は非常に重要である。そこで、OPSSのシステイン合成活性の耐熱性、有機溶媒安定性をOPSSと同じく非天然アミノ酸を合成できる大腸菌由来のシステイン合成酵素CysMと比較した。
【方法】
OPSSは我々が以前に報告している方法で精製した。[(1)] CysMについては、大腸菌W3110株由来のシステイン合成酵素CysMの遺伝子をpQE80Lベクターに導入し、N末端にヒスチジンタグを有する状態で大量発現させ、Ni^{2+}-IMAC担体を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。システイン合成活性は酸ニンヒドリン試薬を利用して測定された。有機溶媒としては、非プロトン性で沸点の高い*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) と1,4-ジオキサンを使用した。
【結果】
アフィニティークロマトグラフィーにより比較対象となるCysMを簡便かつ高収量で得ることに成功した。DMFを有機溶媒として、反応液中での含有率を0～50% (v/v) の間で変化させてシステインに対する比活性を測定したところ、CysMでは、DMFの含有率が増えるとともに活性の減少が見られた。一方、OPSSでは、40%のDMF存在下まで活性の低下は見られなかった。1,4-ジオキサンに関する活性の変化、熱安定性の結果については現在実験中であり、学会当日に発表する予定である。
【参考文献】
(1) Mino, K. and Ishikawa, K. *J. Bacteriol.* **185**, 2277-2284 (2003)

O-Phosphoserine sulfhydrylase, thermal stability, stability toward organic solvent

講演番号:2C09a03
講演日時、会場:3月23日09:22～ C校舎09会場

X線結晶構造解析による超好熱性古細菌*Aeropyrum pernix* K1由来のシステイン合成酵素OPSSの基質認識機構の解明

Elucidation of the substrate recognition mechanism in OPSS from hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1 by X-ray crystallography

○武田　瑛美、中村　卓、石川　一彦[1]（長浜バイオ大・バイオサイエンス、[1]産総研・バイオマス研究センター）

○Emi Takeda, Takashi Nakamura, Kazuhiko Ishikawa (Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [1]AIST)

【目的】

O-phospho serine sulfhydrylase (OPSS)は、ピリドキサール5’リン酸（PLP）依存性の酵素で、1次基質(ホスホセリン(OPS))と2次基質(スルフィド)からのシステイン合成反応を触媒し、80～90℃を至適温度とする耐熱性酵素である。また、OPSSは広い基質特異性をもち、さまざまな2次基質を用いることで医薬品やそのビルディングブロックとなり得るさまざまな非天然アミノ酸を合成できる。OPSSによる効率の良い非天然アミノ酸合成を行うために、まず、OPSSが活性部位においてどのような結合様式を取っているか解明することが重要である。そこで、本研究ではX線結晶構造解析によるOPSSの基質認識機構解明を目的とした。

【方法】

本酵素はOPSSのみ、OPSS-アミノアクリレート中間体複合体、OPSS-システイン(Cys)複合体の立体構造が大型放射光施設SPring-8でのX線結晶構造解析により決定されている。活性に関わる残基を調べるため、Molecular Operating Environment(MOE)、UCSF Chimeraといった解析プログラムを用いてこれら3つの構造の重ね合わせから構造上の違いを比較した。また、OPSSと外部アルジミン間で水素結合しているOPSSのアミノ酸残基をChimeraにより調べた。

【結果】

3つの構造の比較から、立体構造上動きのある残基として21個がピックアップされた。これら残基の動きによりOPSS-アミノアクリレート中間体複合体、OPSSのみ、OPSS-Cys複合体の順に活性部位の構造の広がりがあることが明らかになった。

OPSSとアミノアクリレート中間体間で水素結合しているのは14残基、OPSSとCys-PLP外部アルジミン間で水素結合しているのは14残基であった。そのうち、共通して使われているのは11残基であった。特徴として、親水性で電荷をもたないアミノ酸が多かった。詳細な解析は、現在進行中である。

O-phospho serine sulfhydrylase(OPSS), OPSS-Cysteine complex, X-ray crystallography

講演番号：2C09a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ C校舎09会場

好気性超好熱アーキア*Aeropyrum pernix*由来色素依存性L-プロリン脱水素酵素の構造解析

Structural analysis of Dye-linked L-proline dehydrogenase from aerobic hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix*

○里村 武範、川上 竜巳[1]、末 信一朗、櫻庭 春彦[2]、大島 敏久[3]（福井大院・工・生応化、[1]佐賀大・総合分析セ、[2]香川大・農・応生、[3]九大院・農・遺資工）

○Takenori Satomura, Ryushi Kawakami[1], Shin-ichiro Suye, Haruhiko Sakuraba[2], Toshihisa Ohshima[3] (Univ. Fukui, [1]Saga Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Kyuusyu Univ.)

【目的】色素依存性 L-プロリン脱水素酵素（LPDH）は 2,6-ジクロロインドフェノール（DCIP）などの人工色素を電子受容体として L-プロリンの脱水素反応を行う酸化還元酵素である。

現在までに *Pyrococcus horikoshii* や *Thermococcus profundas* などユリアーキオータに 2 種類の LPDH (αβγδ 型、α4β4 型) が見出され、これらの機能と構造解析が進められている [1,2,3,4]。近年、我々の研究グループではクレンアーキオータにおいて LPDH 活性を見出し、その機能解析に成功した [5,6,7]。本研究では、クレンアーキオータに属する超好熱菌 *A. pernix* 由来 LPDH の構造解析を行い、ユリアーキオータ由来 LPDH の構造と比較し機能と構造の相関関係について考察した。

【方法】*A. pernix* 由来 LPDH の大腸菌によるタンパク質発現系の構築を行った。*A. pernix* 由来 LPDH の構造解明のため発現タンパク質の結晶化とＸ線構造解析を行った。

【結果】*A. pernix*由来LPDHの大腸菌によるタンパク質発現系の構築に成功した。本酵素を1Lの大腸菌培養液あたり5 mgと大量に取得することに成功した。また、精製酵素を結晶化、Ｘ線構造解析を行った結果、基質であるL-プロリンとの複合体の構造決定にも成功した。本研究で明らかにした*A. pernix* LPDHと既知のユリアーキオータ由来LPDHとの構造比較を行ったところ、本酵素の基質保持にC末端に存在するロイシン残基が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、本酵素中に存在するセリン残基が電子受容体特異性に関与していることが明らかとなった。

1) Sakuraba, H. et al., Appl. Environ. Microbiol. 67:1470–1475 (2001)
2) Kawakami, R. et al., Extremophiles 8:99–108 (2004)
3) Kawakami, R. et al., FEBS J 272:4044–4054 (2005)
4) Tuge, H. et al., J. Biol. Chem. 280: 31045-31049 (2005)
5) Satomura, T. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 89:1075-82 (2010)
6) Satomura, T. et al., Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 66:1508-10 (2010)
7) Satomura, T. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. in press.

Aeropyrum pernix, L-proline, dye-linked dehydrogenase

講演番号：2C09a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ C校舎09会場

Pseudomonas sp. AIU 813由来L-アミノ酸α-オキシダーゼの変異型酵素C254Iの解析

Analysis of C254I mutant of L-amino acid α-oxidase from *Pseudomonas* sp. AIU 813

○松井 大亮[1]、礒部 公安[2]、浅野 泰久[1,3]（[1]富山県大工・生工研セ、[2]岩手大農、[3]JST ERATO）
○Daisuke Matsui[1], Kimiyasu Isobe[2], Yasuhisa Asano[1,3]（[1]Toyama Pref. Univ., [2]Iwate Univ., [3]JST ERATO）

【目的】我々は、血中アミノ酸による疾病検出をより安価且つ簡易的に行うため、酵素を用いた定量法の開発を進めている。*Pseudomonas* sp. AIU 813由来L-アミノ酸α-オキシダーゼ[1)]は、塩基性L-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒するフラビン酵素である。また、塩基性L-アミノ酸の酸化的脱炭酸の反応も触媒する二機能性の酵素である。早石らは、同じ二機能性の酵素を用いて、*p*-クロロ水銀安息香酸(以下、PCMB)の添加実験により、モノオキシゲナーゼ活性の減少と共にオキシダーゼ活性の上昇を報告している。我々は、このPCMBが反応するシステイン残基に着目し、以下の実験を行った。
【方法】本酵素遺伝子を挿入した発現ベクターを鋳型とし、QuikChange® (Stratagene)を用いて、本酵素中の5つのシステイン残基に飽和変異を導入した。飽和変異発現ベクターを大腸菌に形質転換し、得られたコロニーをそれぞれ破砕後、活性測定によるスクリーニングを行った。得られた変異型酵素を用いて、各種特性を解明すると共に、血漿サンプル中のL-リジン定量を行った。
【結果】
アミノ酸配列の比較：変異型酵素のアミノ酸配列において、254番目のシステイン残基がイソロイシンに置換されていた。
酵素活性とPCMBの影響：変異型酵素C254Iは、野生型酵素よりもオキシダーゼの比活性が上昇した。野生型酵素とは対照的に、各濃度のPCMBによる活性への影響は見られなかった。変異型酵素の二機能性の酵素活性において、オキシダーゼ活性の割合が上昇した可能性が示唆される。
pHの影響とL-リジン定量への応用：野生型酵素は、L-リジンのみならず、L-アルギニンやL-オルニチンをそれぞれ基質とする。pH6.5以下では、L-リジンのみを基質とし、アルカリ側ではL-オルニチンを最適な基質とする。変異型酵素C254Iの至適pHの測定を行った結果、アルカリ側のL-オルニチンの活性が減少し、広範囲のpHにおいて、L-リジンを最適な基質とした。血漿サンプルにおけるL-リジンの定量においても、変異型酵素C254Iは、L-オルニチンやL-アルギニンの影響が少ないことが明らかとなった。
吸収スペクトルの比較：フラビン酵素である野生型酵素は、385 nmと462 nmの吸収極大を示すのに対し、変異型酵素C254Iは、それらの吸収極大が見られなかった。野生型酵素に比べ、変異型酵素C254Iの熱安定性が低下していることから、構造の変化等が考えられる。

なお、本研究は文部科学省・地域イノベーションクラスタープログラムグローバル型（第II期）「ほくりく健康創造クラスター」の助成の下に行われた。

1）菅原、他4名、日本農芸化学会東北支部第146回大会、p54

L-Amino acid α-oxidase, Cysteine residue, L-Lysine determination

講演番号:2C09a06
講演日時、会場:3月23日10:05～ C校舎09会場

Streptomyces coelicolor A3(2)のD-アミノ酸オキシダーゼの機能解析

Functional analysis of D-amino acid oxidase of *Streptomyces coelicolor* A3(2)

○高橋 祥司，斎藤 弥生，田所 南海帆，小林 美江子，阿部 勝正，解良 芳夫
（長岡技科大・環境）
○Shouji Takahashi, Yayoi Saito, Namiho Tadokoro, Mieko Kobayashi, Katsumasa Abe, Yoshio Kera (Nagaoka Univ. of Tech.)

【目的】D-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)は，中性および塩基性D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する。DAOは種々の真核生物に見出されており，主にD-アミノ酸を除去する解毒酵素と考えられている。加えて，神経伝達に関与するD-セリンの分解代謝を通して精神機能の制御に関与する可能性も指摘されている。一方，原核生物におけるDAOは放線菌*Arthrobacter protophormiae* (ApDAO)に見出されたDAOに限られており，細菌DAOに特有な性質及び生理機能は不明である。そこで本研究では，細菌DAOの特性および生理機能を明らかにすることを目的として，放線菌*Streptomyces coelicolor* A3(2)に見出された推定DAO遺伝子(*daoA*遺伝子)の機能を解析するとともにD-アミノ酸が*S. coelicolor* A3(2)に及ぼす影響を解析した。

【方法】大腸菌における*daoA*遺伝子(SCO6740)の発現は，発現ベクターpET25bと*E. coli* BL21 Star (DE3) を用いた。DAO活性は，20 mM D-アミノ酸を基質として用い，*o*-ジアニシジンを発色試薬としたペルオキシダーゼカップリング反応により測定した。D-アミノ酸の生育に及ぼす影響は20 mM D-アミノ酸を含むMS培地を用いて行った。バイオフィルム接着へ及ぼす影響は10 mM D-アミノ酸を含むmNMMP培地を用いて24ウェルプレートで行った。接着率はクリスタルバイオレット染色から求めた接着菌体量を生育菌体量で徐して算出した。

【結果】原核生物における*daoA*遺伝子の探索を行ったところ，多くの放線菌にその存在が確認され，放線菌においてDAOが何らかの役割を担っている可能性が示唆された。そこで放線菌*S. coelicolor* A3(2)の*daoA*遺伝子を大腸菌で発現させDAO活性を測定したところ，D-ValやD-Ileなどの分岐鎖D-アミノ酸に高い活性を示し，そのL体および酸性D-アミノ酸にはほとんど活性を示さなかった。このことから，*daoA*遺伝子がDAOをコードしていることが示された。近年，いくつかの細菌においてD-ValやD-IleなどのD-アミノ酸が生合成され，細胞壁リモデリングやバイオフィルム分散に関与することが報告されている。このことから，放線菌においてDAOがこれらD-アミノ酸の分解を通して，その生理機能に関与する可能性が考えられた。そこで，D-アミノ酸の生育に及ぼす影響を解析したところ，D-Tyrを除くD-アミノ酸が生育を阻害することが示された。また，顕微鏡観察においてD-Valの形態への影響が観察された。つぎに，D-アミノ酸のバイオフィルム接着へ及ぼす影響を解析したところ，D-アミノ酸はバイオフィルムの接着にほとんど影響を与えないが，逆にL-アミノ酸が影響を及ぼすことが明らかとなった。

Streptomyces coelicolor A3(2), D-amino acids, D-amino acid oxidase

講演番号：2C09a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ C校舎09会場

細胞性粘菌における D-セリン代謝関連酵素とその生理機能

Physiological function of D-serine and its related enzymes of *Dictyostelium discoideum*

○萩 泰典、伊藤　智和、齊藤　玉緒[1]、邊見　久、吉村　徹
（名大院生命農、[1]上智大理工）
○Taisuke Hagi, Tomokazu Ito, Tamao Saito[1], Hisashi Hemmi, Tohru Yoshimura
(Grad. Sch. of Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [1]Fac. of Sci. and Tech., Sophia Univ.)

哺乳動物脳内に高濃度存在する D-セリンは、セリンラセマーゼによって内因的に生合成され、NMDA レセプターのコアゴニストとして、記憶や学習など、脳の高次機能発現に重要な役割を果たしている。セリンラセマーゼは、哺乳類に加え、真核微生物や植物など NMDA レセプターを持たない多くの真核生物にも存在するが、それら生物における D-セリンの機能は未知のまま残されている。近年、D-セリンが蚕体内に存在し、蛹期や孵化など変態時に一過的に D-セリンの割合が上昇することが明らかとなり、D-セリンが発生、発達に関わる可能性が示唆されている。

我々は、D-セリンが発生や発達において内因性のある種のシグナルとして機能する可能性を考え、NMDA レセプターを持たない下等真核生物である細胞性粘菌、*Dictyostelium discoideum* を用いて D-セリンの新規機能の同定を目指している。*D. discoideum* は飢餓状態に陥ると単細胞のアメーバの状態から細胞同士が集合し多細胞を形成する、ユニークな生活環をもち、既報の D-セリン代謝関連酵素（セリンラセマーゼ、D-セリンデヒドラターゼ、D-アミノ酸オキシダーゼ）ホモログの遺伝子をすべて有している。

細胞性粘菌のこれら遺伝子を大腸菌にクローニングし、それぞれの産物であるタンパク質の *E. coli* を宿主とした大量発現系を構築した。酵素を精製し、それぞれが予想された活性、すなわちセリンのラセミ化や分解を触媒することを確認した。各酵素の基質特異性や動力学定数など酵素学的諸性質を検討した結果、細胞性粘菌においてセリンラセマーゼが D-セリンの合成を、D-セリンデヒドラターゼが D-セリンの分解を担う可能性が示唆された。さらに、細胞性粘菌における D-セリンの生理的役割の解明を目指して、相同組み換えにより D-セリンデヒドラターゼ遺伝子(*DdDSD*)破壊株を構築した。得られた *DdDSD* 破壊株と野生株の無細胞抽出液を D-セリンとインキュベートした結果、*DdDSD* 欠損株では D-セリンの分解活性は検出されなかった。また単細胞期の細胞を 24 時間ごとに測定した結果、*DdDSD* 欠損株では最大細胞数の減少、D-セリン添加による成育遅延が観察された。さらに多細胞期では子実体の形成能の低下及び、子実体の柄が短くなる形態の異常が見られた。本大会では各酵素の酵素学的性質及び、*DdDSD* 欠損株の性質について報告する。

D-serine, *Dictyostelium discoideum*

講演番号：2C09a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ C校舎09会場

Pichia pastoris を宿主とするマサバ由来 L-リジン α-オキシダーゼの発現系構築

Expression of recombinant L-lysine α-oxidase from *Scomber japonicus* in *Pichia pastoris*

○大松 晃一郎、谷 泰史、由上 亮一、中許 昆照、斎藤 茂樹、川端 潤[1]、上田 誠[1]、三原 久明（立命館大・生命科学・生物工、[1]三菱化学科学技術研究センター・バイオ技術研）

○Koichiro Omatsu, Yasushi Tani, Ryoichi Yukami, Hideaki Nakamoto, Shigeki Saito, Hiroshi Kawabata[1], Makoto Ueda[1], Hisaaki Mihara (Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [1]Biotech. Lab., Mitsubishi Chem. Group Sci. Tech. Res. Center)

【目的】

光学活性環状アミノ酸の一種である L-ピペコリン酸は、抗癌剤 VX710 などの合成医薬品の原料として利用されている。本研究では、L-リジンを出発物質とした L-ピペコリン酸の新規生産系の開発を目指し、L-リジンに特異的に作用してΔ[1]-ピペリデイン-2-カルボン酸（L-ピペコリン酸の前駆体）を生成する酵素であるマサバ由来 L-リジン α-オキシダーゼ（LysO）遺伝子の *Pichia pastoris* を宿主とする発現系の構築を行った。

【方法・結果】

マサバ *Scomber japonicus* に由来する apoptosis-inducing protein（AIP）は L-リジン特異性の高い L-アミノ酸 α-オキシダーゼ活性を示すことから（Jung SK *et al.*, *J. Immunol.,* 165, 1491-1497, 2000）、AIP 遺伝子配列（GenBank: AJ400871）に基づいて、*P. pastoris* での発現用に使用コドンの最適化を行った遺伝子断片を人工合成した。本遺伝子断片を宿主細胞内発現型ベクターである pPICZB および宿主細胞外分泌型ベクターである pPICZαA にサブクローニングし、それぞれ、pPICZB-AIP および pPICZαA-AIP を得た。これら AIP 発現プラスミドを *P. pastoris* に導入し、得られた形質転換体をメタノール含有培地で培養したところ、pPICZB-AIP 導入株の場合においてのみ LysO 活性が検出された。pPICZB-AIP 導入株の培養上清と細胞抽出液の本酵素活性を調べた結果、培養上清に 70%、細胞抽出液に 30% の総活性が検出され、pPICZB は細胞内発現型ベクターではあるが、70% の本酵素が細胞外に漏出していると考えられた。培養上清と細胞抽出液の比活性を比較したところ、細胞抽出液よりも培養上清の比活性の方が 13 倍高いことが分かった。培養上清画分を用いて本酵素の諸性質ついて検討した結果、本酵素は pH 4.5、60°C で最も高い活性を示し、L-リジンに対して高い基質特異性を示すことが示唆された。

lysine, oxidase, *Pichia pastoris*

講演番号：2C09a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ C校舎09会場

Pseudomonas putida 由来新奇 D-リジンデヒドロゲナーゼの遺伝子クローニング、精製、および酵素化学的緒性質の解明

Gene cloning, purification, and characterization of novel D-lysine dehydrogenase from *Pseudomonas putida*

○中許 昆照、谷 泰史、斎藤 茂樹、川端 潤[1]、上田 誠[1]、三原 久明（立命館大・生命科学・生物工、[1]三菱化学科学技術研究センター・バイオ技術研）

○Hideaki Nakamoto, Yasushi Tani, Shigeki Saito, Hiroshi Kawabata[1], Makoto Ueda[1], Hisaaki Mihara (Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [1]Biotech. Lab., Mitsubishi Chem. Group Sci. Tech. Res. Center)

【目的】

Pseudomonas putida は D-リジンを唯一の炭素源および窒素源として生育することができる。*P. putida* の D -リジン異化経路経路において、D-リジンを Δ[1]-ピペリデイン-2-カルボン酸 (Pip2C) に変換する反応段階に *amaD* 遺伝子が関与することが示唆されているが (Revelles O *et al.*, *J. Bacteriol.,* 189, 2787-2792, 2007)、*amaD* 遺伝子産物の機能の詳細は未だ明らかではない。本研究では、*P. putida* ATCC12633 の *amaD* 遺伝子をクローニングして *E. coli* 宿主内で発現させ、*amaD* 遺伝子産物を精製し、その酵素化学的諸性質を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

ゲノム解析株である *P. putida* KT2440 の *amaD* (PP3596) の塩基配列情報に基づいてプライマーを設計し、PCR 法によって *P. putida* ATCC12633 の *amaD* 遺伝子断片を増幅させた。本遺伝子断片を pET21a ベクターに挿入し、発現プラスミド pET_3596 を構築した。本発現プラスミドで *E. coli* Rosetta-gami B を形質転換し、得られた形質転換体を用いて*amaD* 発現条件を検討したところ、大半は封入体となったが、一部は可溶画分に回収されることが分かった。また、細胞粗抽出液を用いて本酵素活性について調べたところ、phenazine methosulfate などの電子伝達体存在下、D-リジンを Pip2C に変換する活性が検出されたため、活性を指標に本酵素の精製を行った。精製には、DEAE-Toyopearl および Q-Sepharose の各カラムクロマトグラフィーを使用した。精製酵素の諸性質を調べたところ、本酵素は、D-リジンを基質として Pip2C を生成する反応を触媒する、フラビン要求性の色素依存性脱水素酵素であることが明らかとなった。本酵素の至適温度は45°C、至適 pH は 8.0 であった。本酵素は、D-リジン (100%) に次いで、D-プロリン (63%)、D-ヒスチジン (63%)、D-ロイシン (38%)、D-アルギニン (38%)、D-メチオニン (37%) を基質として利用できることが分かった。以上より、*amaD* 遺伝子産物は新奇の D-リジンデヒドロゲナーゼであることが明らかとなった。

D-lysine, dehydrogenase, flavoprotein

講演番号：2C09a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ C校舎09会場

*Thermococcus kodakarensis*におけるリジン・アルギニン生合成経路の解析

Funtional analysis of lysine and arginine biosynthetic pathways in *Thermococcus kodakarensis*

○吉田 彩子[1,2]、富田 武郎[2]、跡見 晴幸[3]、葛山 智久[2]、西山 真[2]（[1]順天堂大医アトピー疾患研究セ、[2]東大生物工学セ、[3]京大院工）

○Ayako Yoshida[1,2], Takeo Tomita[2], Haruyuki Atomi[3], Tomohisa Kuzuyama[2], Makoto Nishiyama[2] ([1]Atopy Res. Ctr., Juntendo Univ. School of Med., [2]Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo, [3]Grad. School of Engr., Kyoto Univ.)

【目的】高度好熱菌*Thermus thermophilus*は、真正細菌でありながら、ジアミノピメリン酸ではなくα-アミノアジピン酸(AAA)を経由し、54アミノ酸からなるキャリアタンパク質LysWを用いた新規なシステムでリジンを生合成する。この新規AAA経路の生合成遺伝子は好熱性古細菌のゲノム上にも存在しており、我々は最近、*Sulfolobus*属がアルギニン生合成経路においてもLysWが関与するシステムを用いていることを明らかにしている。*Sulfolobus*ではリジンとアルギニン生合成の基質であるAAAとグルタミン酸のアミノ基がそれぞれ、LysXとArgXの反応によってLysWによる修飾を受け、続く反応は一組の酵素がbifunctionalに担っていることが示されている。一方で、同じく古細菌である*Thermococcus kodakarensis*ではLysXホモログも含め、AAA以降の反応を担う酵素を一組しか持たないことから、全ての反応を一組の生合成酵素群で行うことで、リジンおよび、アルギニン生合成の中間体であるオルニチンが合成されると考えられた。そこで、これを明らかにするため、修飾酵素であるLysXホモログ、およびその次のリン酸化反応を担うLysZホモログの機能解析を行った。

【方法・結果】*T. kodakarensis*のLysWホモログ(TK0279)およびLysXホモログ(TK0278)、LysZホモログ(TK0276)の組換え酵素を調製し、LysX、LysZ活性の検出を試みた。LysXの活性は反応の際に生じる遊離リン酸を検出することで測定し、LysZ活性は反応後のリン酸化物をヒドロキシルアミンによりヒドロキサム酸誘導体とし、LC-MS, MS/MSにて産物を同定することで検出した。その結果、*T. kodakarensis*のLysXホモログはATP依存的にLysWをAAAあるいはグルタミン酸に付加することが明らかとなった。この反応により生じるLysW-AAAとLysW-Gluをそれぞれ基質としたところ、LysZホモログはこのどちらの基質もリン酸化することが明らかとなった。この結果は、*Thermus*のリジン生合成系で発見されたキャリアタンパク質LysWを用いるシステムが、*T. kodakarensis*においてはリジンだけでなくアルギニン生合成にも利用されていることを示している。「パッチワーク仮説」によればmulti-functionalな生合成酵素が遺伝子重複や機能分化を繰り返し進化することで、現在のファミリー酵素群が出来上がったとされる。生物の共通祖先に近縁であるとされる古細菌のリジンとアルギニンが基質特異性の寛容な同一の酵素群で生合成されていることを示した本研究は、基質特異性の寛容な酵素より構成される祖先型生合成・代謝系の存在を示す重要な発見であると考えられる。

Thermococcus kodakarensis, lysine biosynthesis, arginine biosynthesis

講演番号:2C09a11
講演日時、会場:3月23日11:10～ C校舎09会場

*Thermococcus kodakarensis*由来ホモイソクエン酸脱水素酵素ホモログの基質特異性の解析

Analysis of substrate specificity of homoisocitrate dehydrogenase homolog from *Thermococcus kodakarensis*

○尹　ルル[1]、富田　武郎[1]、跡見晴幸[2]、葛山　智久[1]、西山　真[1]（[1]東大生物工学セ、[2]京大院工）
○ Lulu Yin[1], Takeo Tomita[1], Haruyuki Atomi[2], Tomohisa Kuzuyama[1], Makoto Nishiyama[1] ([1]Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo and [2]Grad. School of Engr., Kyoto Univ.)

【Introduction】*Thermus thermophilus* has been proved to be a bacterium that synthesizes lysine through α-aminoadipate (AAA) as an intermediate. The first five-step reactions from 2-oxoglutarate to AAA are similar to those of leucine biosynthesis and a part of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. The latter five-step reactions from AAA to lysine are similar to the conversion of glutamate to ornithine in arginine biosynthesis. This suggests that the enzymes involved in the lysine biosynthesis have evolutionary relationships with the other metabolic pathways. Homoisocitrate dehydrogenase from *T. thermophilus* (TtHICDH) catalyzes the fourth step of lysine biosynthetic pathway and is a member of β-decarboxylating dehydrogenase family, which includes isocitrate dehydrogenase (ICDH) in the TCA cycle and 3-isopropylmalate dehydrogenase (IPMDH) in leucine biosynthesis. TtHICDH highly prefers isocitrate(IC) over homoisocitrate(HIC) as substrates, but no activity was detected on 3-isopropylmalate(3-IPM). A single amino acid mutation of TtHICDH caused a loss of activity toward IC but generated a new activity toward 3-IPM, suggesting that the minor differences in the primary sequence determine the substrate specificity. The genome survey of *Thermococcus kodakarensis* shows that gene cluster for lysine biosynthesis is present; however, the homologs for the TCA cycle, leucine, or a part of arginine biosynthesis are missing. It is thought that the lysine biosynthetic gene cluster serves for multi-metabolic pathways.

【Method and Result】To verify the above hypothesis, we chose HICDH homolog, TK0280, from *T. kodakarensis* as a target of this study. The *TK0280* gene was cloned and overexpressed in *Escherichia coli* and substrate specificity of the recombinant protein was investigated. TK0280 exhibits significant activity for isocitrate and homoisocitrate, and also for 3-isopropylmalate. This result indicates that TK0280 is a promiscuous enzyme that can recognize several related compounds as the substrates, and also suggests that lysine biosynthetic enzymes have a potential to synthesize leucine and glutamate in *T. kodakarensis*.

Thermococcus kodakarensis, β-decarboxylating dehydrogenase, substrate specificity

講演番号:2C09a12
講演日時、会場:3月23日11:21～ C校舎09会場

ロイシンによるグルタミン酸脱水素酵素のアロステリック調節機構の解析

Analysis of leucine-induced allosteric regulation of glutamate dehydrogenase

○富田　武郎、葛山　智久、西山　真（東大・生物工学セ）
○Takeo Tomita, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama (Biotechnol. Res. Center, Univ. of Tokyo)

【目的】グルタミン酸脱水素酵素(GDH)はNAD(P)(H)を用いてグルタミン酸と2-オキソグルタル酸の可逆的変換を行う酵素である。炭素、窒素代謝を連結する重要な反応を触媒するため、ほとんどの生物がGDHを有している。哺乳類由来のGDHについてはアンテナドメインを介したGTPによるアロステリック活性化機構について解析が進んでいるが、ロイシンによる活性化機構についてはほとんど解析が進んでいない。一方、高度好熱菌*Thermus thermophilus*由来のGDH (TtGDH)は互いに46%のアミノ酸配列相同性を有するGdhA(活性調節サブユニット)とGdhB (触媒サブユニット)から構成されるヘテロヘキサマー構造を有し、ロイシンにより活性化を受ける。最近、私たちは結晶構造解析により4つのGdhAと2つのGdhBから構成されるヘテロヘキサマー型TtGDHの構造を決定した。この複合体中で、６つのロイシンがサブユニット間領域に存在するポケットに結合していた。結合サイトを形成するアミノ酸残基の置換により活性化の程度が大きく減少したことからこのサイトがアロステリック調節に主要な役割を有していることが確認された。TtGDHのアミノ酸配列と立体構造を哺乳類由来のGDHと比較した結果、哺乳類由来のGDHはTtGDHと同じロイシン結合サイトを構成するアミノ酸残基が保存されており、調節機構の一部を共有している可能性が示唆された。

【方法と結果】神経細胞特異的に発現するヒト由来GDH (hGDH2)はロイシンにより顕著な活性化を受けることが知られている。hGDH2においてロイシン結合サイトを形成することが予想されるArg151とAsp185をそれぞれMet, Alaへ置換した変異酵素を作製し、ロイシンに対する感受性の変化を解析した結果、各変異体はロイシンによる活性可能を消失していることがわかった。このことから、哺乳類由来のGDHでもこのサイトがアロステリック結合サイトとして利用されていることが示された。

膵臓等で機能するhGDH1は、hGDH2に比べロイシン非添加時の比活性は高いがロイシンの感受性は低い。これらの間のロイシン感受性の違いの原因を解析するため、hGDH2のアミノ酸残基をhGDH1のタイプのものへ置換した変異酵素hGDH2(E142D), hGDH2(S498N)を作製し解析した結果、各変異酵素の特徴はhGDH2からhGDH1に類似したものへと変化した。このことから、これらの残基がロイシンに対する感受性を決定していることが示唆された。

Glutamate dehydrogenase, Leucine, allosteric regulation

講演番号:2C09p01
講演日時、会場:3月23日13:49～ C校舎09会場

D-アスパラギン酸酵素定量法の開発

Development of enzymatic quantification method for D-aspartic acid

○生田　智之、加藤　志郎、邊見　久、吉村　徹（名大院・生命農）
○Tomoyuki Ikuta, Shiro Kato, Hisashi Hemmi, Tohru Yoshimura (Grad. Sch. of Bioagr. Sci., Nagoya Univ)

【目的】近年、哺乳類を含む真核生物にもD-アミノ酸が存在し、様々な生理的役割を担うことが明らかとなってきた。例えば哺乳類の脳内には高濃度のD-セリンが存在しており、Ｎ－メチルD-アスパラギン酸レセプターのコアゴニストとして記憶や学習といった脳の高次機能にかかわっている。D-アスパラギン酸は松果体、下垂体、精巣、副腎といった内分泌組織中に高濃度存在し、松果体ホルモンであるメラトニンの分泌抑制、下垂体ホルモンであるプロラクチンの分泌促進、男性ホルモンであるテストステロンの合成や分泌の促進に機能することが知られている。またウサギへのD-アスパラギン酸の経口投与により精子の運動性が向上したとの結果や、コラーゲン生合成への関与なども報告されており、サプリメントへの応用も期待されている。このようなD-アミノ酸の生理機能が明らかになるにつれ、D-アミノ酸の食品中の含量や、生体内での動態が注目されるようになっている。

現在、D-アスパラギン酸の定量は一般的に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて行われている。この定量法は正確で感度が高いが、煩瑣でかつ一検体あたりの測定に時間がかかるため大量のサンプル測定には不向きである。そこで本研究では迅速かつ簡便なD-アスパラギン酸酵素定量法の開発を目的とした。

【方法】サンプル中に含まれているα-ケト酸を水素化ホウ素ナトリウムにより還元することで除去した。酵母由来のD-アスパラギン酸オキシダーゼ(DDO)によってD-アスパラギン酸をオキサロ酢酸に変換した。これをピルビン酸に変換した後、α-ケト酸特異的な蛍光試薬である1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzeneで標識し、分光蛍光光度計で検出した。D-アスパラギン酸の濃度算出はDDO処理サンプル、未処理サンプルの蛍光強度の差から求めた。

【結果】本手法によって１μMオーダーのD-アスパラギン酸の定量が可能であった。また海藻及び発酵乳製品についてD-アスパラギン酸含量を定量したところ本法とHPLCの結果はほぼ一致した。

なお、本研究は生研センターイノベーション創出事業「D-アミノ酸に着目した新規機能性食品の開発」の一環として行われた。

D-Aspartic acid, D-Aspartate oxidase, fluorometry

講演番号：2C09p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ C校舎09会場

Oenococcus oeni リジンラセマーゼの基質特異性に関する研究

Mutational analysis of lysine racemase from *Oenococcus oeni*

○加藤 志郎、邊見 久、吉村 徹（名大院生命農）
○Shiro Kato, Hisashi Hemmi, Tohru Yoshimura (Grad. Sch. of Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】細菌におけるD-アミノ酸の役割として、細胞壁および抗生物質の構成要素として機能することが古くから知られている。しかし近年になって、D-アミノ酸が細菌バイオフィルムの分散や定常期における細胞壁のリモデリングに関与することが報告され、細菌におけるD-アミノ酸の新たな役割に関心が集まっている。

我々は近年、食品とD-アミノ酸に関する研究の一環としてワイン発酵過程におけるD-アミノ酸生成について検討してきた。その過程で我々は、ワインのマロラクティック発酵に寄与する乳酸菌*Oenococcus oeni*が塩基性アミノ酸に極めて高い特異性を有する新規リジンラセマーゼを有していることを見出した。本酵素は、アミノ酸配列において既報の細菌アラニンラセマーゼと高い相同性を示し、立体構造も酷似しているにもかかわらず、専ら塩基性アミノ酸のみに作用し、アラニンには作用しない。本研究では、*O. oeni*リジンラセマーゼおよび細菌アラニンラセマーゼの構造を比較し、これら酵素の基質特異性を決定する機構の解明を試みた。

【方法】好熱菌*Geobacillus stearothermophilus*由来アラニンラセマーゼおよび乳酸菌*O. oeni*由来リジンラセマーゼの立体構造を比較し、アラニンラセマーゼ変異体をデザインした。アラニンラセマーゼ変異体を大腸菌にて発現させ精製した後、導入した変異が基質特異性に与える影響を検証した。

【結果】アラニンラセマーゼおよびリジンラセマーゼの構造比較を行い、アラニンラセマーゼの基質特異性に影響することが報告されているチロシン354がリジンラセマーゼにおいてはトリプトファンに、またアラニンラセマーゼにおいてPLPのリン酸基と水素結合を形成することが報告されているイソロイシン222が、リジンラセマーゼではトレオニンに置換されていることを見出した。これらの残基にそれぞれ単独の変異を導入したアラニンラセマーゼ（I222T変異体およびY354W変異体）の基質特異性は野生型酵素とほとんど変わらなかったものの、二重変異を導入した同酵素（I222T/Y354W変異体）は野生型酵素とは異なり、塩基性アミノ酸に対するラセミ化活性を有することが明らかとなった。なお、本研究は生研センターイノベーション創出事業「D-アミノ酸に着目した新規機能性食品の開発」の一環として行われた。

D-Amino acid, racemase, lactic acid bacteria

講演番号：2C09p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ C校舎09会場

緑藻*C. reinhardtii*由来アラニンラセマーゼ遺伝子のクローニングおよび発現と酵素学的諸性質

Gene cloning, expression, and enzymatic properties of alanine racemase from a green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

○佐久田　綾[1]，正井　三貴[1]，谷川　実[1]，西村　克史[1,2]（[1]日大・理工，[2]日大・短大応化）
○Aya Sakuta[1], Miki Masai[1], Minoru Tanigawa[1], Katsushi Nishimura[1,2] ([1]Coll. of Sci. & Technol, Nihon Univ., [2]Junior Coll. , Nihon Univ.）

【目的】*Volvox*目の緑藻は，単細胞の*Chlamydomonas*属から，*Gonium*属，*Pandorina*属，*Eudorina*属，*Pleodorina*属を経て，細胞数2000の群体を形成する*Volvox*属に進化したと考えられている．当研究室において，*Chlamydomonas, Gonium*, *Pndorina, Eudorina*, *Pleodorina*, *Volvox*のD-アラニン耐性とアラニンラセマーゼ活性を調べたところ，耐性と活性はともに*Eudorina*まで保存されており，*Pleodorina*へ進化するところで大きく変化したと考えられた（Amino Acids, 32, 59-62, Nishimura et al., 第6回D-アミノ酸研究会学術講演会，正井等）．

本研究では，*Volvox*目の進化の過程でアラニンラセマーゼ遺伝子がどのように変化したのかを明らかにすることを目的として，*Chlamydomonas reinhardtii* （*C. reinhardtii*） のアラニンラセマーゼ遺伝子をクローニングし，その遺伝子配列よりアミノ酸配列を決定し，相同性検索を行った．また，本酵素の発現制御や酵素学的諸性質について検討した．

【方法】*C. reinhardtii*細胞からmRNAを抽出し，これを鋳型としてRT-PCRを行い，アラニンラセマーゼ構造遺伝子のcDNAを得た．増幅断片の塩基配列を解析した後，pUC119に挿入し，*E. coli* JM109に導入した．得られた形質転換体からプラスミドを抽出し，PCRにより*Nde* I サイトと*Xho* I サイトを付加した後，pET41bにサブクローニングし，HMS174とBL21を用いて，アラニンラセマーゼの発現を試みた．

次に，TAP培地にD-アラニンあるいはL-アラニンを加えて培養した*C. reinhardtii*からmRNAを抽出し，Real Time PCRによりアラニンラセマーゼ遺伝子の発現量を調べた．また，比活性や基質特異性も検討した．

【結果】アミノ酸配列の相同性検索の結果，紅色細菌 *Octadecabacter* のアラニンラセマーゼ （推定） と最も高い相同性（37%）を示したが，既知のアラニンラセマーゼとの相同性はいずれも低かった （*E. coli*, 14%; *S. pombe*, 11%; *Cochliobolus carbonum*, 7.5%）．また，活性中心のリジン（PLP結合） やチロシン （H^+授受） に相当する残基は見いだせなかった．従って，本酵素は新奇の構造をもつアラニンラセマーゼであると考えられる．

D-アラニンを含む培地中では，酵素活性と mRNA 発現量がともに高くなったことから，*C. reinhardtii* においては D-アラニンによって本酵素が誘導されることが分かった．現在，酵素学的諸性質の決定と大腸菌による大量発現を試みている．

Chlamydomonas reinhardtii, alanine racemase, green algae

講演番号：2C09p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ C校舎09会場

生もと由来乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NBRC 102481 のヒスチジンラセマーゼ: 部位特異的変異導入による変異型酵素の調製とその酵素科学的性質

Histidine racemase from *Leuconostoc mesenteroides* NBRC102481 isolated from “kimoto”: prepartation of mutant enzymes by site-directed mutagenesis and their enzymological properties

○郷上 佳孝、老川 典夫（関大・化学生命工）
○Yoshitaka Gougami, Tadao Oikawa (Dept. Life Sci. & Biotech., Kansai Univ.)

【目的】先にわれわれは、生もと由来乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NBRC 102481に新規ヒスチジンラセマーゼ(HisR)を見出した。本酵素はピリドキサール5’-リン酸（PLP）を補酵素とし、ヒスチジンのラセミ化反応を特異的に触媒し、推定立体構造からPLP酵素のfold-type3に属すると考えられる。本研究では、部位特異的変異導入によりさまざまな変異型HisRを調製し、その酵素科学的性質を解明することを目的としている。
【方法】4種類の変異型HisR(F44Y/S45G HisR, F228Y HisR, H286Y/S287A HisR, V357Y/A358E HisR)は、pET21b-*hisr*を鋳型としてoverlap extension法で調製した。各変異型HisRの*Escherichia coli* BL21 (DE3)を宿主とする高発現系を構築後、得られたクローン株をそれぞれ培養し、その無細胞抽出液から4種類の変異型HisRをそれぞれNi-NTA superflowカラムで精製した。酵素活性は、L-アミノ酸を基質とし、反応(35℃, pH 9.5)の結果生成するエナンチオマーを高速液体クロマトグラフィーで定量し測定した。
【結果】さまざまなfold-type3のPLP要求性アミノ酸ラセマーゼとの相同性検索の結果に基づき、活性中心近傍に存在しかつHisRと異なるアミノ酸残基を変異導入部位として決定した(F44/S45, F228, H286/S287, V357/A358)。得られた4種の変異型酵素の活性を測定したところ、F44Y/S45G HisRにはHisR活性が無く、F44/S45はヒスチジンのラセミ化に必須なアミノ酸残基であることが明らかとなった。H286Y/S287A HisR, V357Y/A358E HisRは、HisR活性がそれぞれ89.2 U/mg, 1.3 U/mgに低下したが、F228Y HisRは野生型酵素(162.1 U/mg)と同程度のHisR活性を保持していた(161.1 U/mg)。スペクトル解析の結果、4種の変異型酵素はいずれも波長420 nm付近にPLPに由来する吸収極大が確認されたことから変異導入後もPLPを保持しており、またゲルろ過クロマトグラフィーの結果、いずれの変異型酵素も野生型酵素と同じ分子質量約89 kDaのホモダイマーであることが明らかとなった。基質特異性を検討したところ、F228Y HisR及びH286Y/S287A HisRは、L-Ala, L-Ser, L-Met, L-Asn, L-Gln, L-Arg, L-Lysのラセミ化反応を触媒したことから、低基質特異性アミノ酸ラセマーゼに変化したことが明らかとなった。またF44Y/S45G HisRとV357/A358 HisRはL-LysとL-Argのラセミ化反応のみを触媒したことから、リシンラセマーゼに変化したことが明らかとなった。以上の結果から、F44/S45、F228、H286/S287、V357/A358はfold-type3のPLP要求性アミノ酸ラセマーゼの基質特異性を制御する重要なアミノ酸残基であることが明らかとなった。

なお、本研究はイノベーション創出基礎的研究推進事業により実施したものである。

histidine racemase, site-directed mutagenesis, *Leuconostoc mesenteroides*

講演番号:2C09p05
講演日時、会場:3月23日14:33～ C校舎09会場

乳酸菌由来のアミノ酸ラセマーゼの機能解析

Functional analysis of amino acid racemase from lactic acid bacteria

○行本 丞太郎、松川 博昭[1]、土居 克実[1]、大島 敏久[1]（九大院・生資環、[1]九大院・農）

○Jotaro Yukimoto, Hiroaki Matsukawa[1], Katsumi Doi[1], Toshihisa Ohshima[1] (Grad. Sch Biore. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [1]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

【目的】生体中のD-アミノ酸は細胞壁の構成成分や抗生物質だけでなく、近年では、植物、貝類、昆虫などにも存在することが見出され、新たな機能が注目されている。我々は、食品中におけるD-アミノ酸の分析から、多くの乳酸菌がD-アラニンなどのD-アミノ酸を生産していることを明らかにした。本研究では、乳酸菌のD-アミノ酸の生成とその調節機構を明らかにするためにD-アミノ酸代謝関連酵素、特にラセマーゼの機能を解明することを目的とした。

【方法】ゲノム解析が完了している*Bifidobacterium longum* subsp.*infantis*が持つアミノ酸ラセマーゼに着目して、データベース検索から、alanine racemase domain protein(Bln_0232)、alanine racemase(Bln_1997)、glutamate racemase(Bln_0768)の遺伝子を見出し、それらの機能解析を行った。また、Bln_1997より100アミノ酸残基ほど大きい*Lactobacillus salivarius*のalanine racemase(LSL_0358)についても機能解析を行った。これらの遺伝子を大腸菌で発現させ、発現産物を精製した。酵素活性は、補酵素PLPおよび基質としてL-アミノ酸を含む反応溶液を用い、反応により生成するD-アミノ酸をHPLC（UPLC）で定量して行った。酵素の性質として、至適pH、至適温度、熱安定性、分子質量、基質特異性や反応速度的解析行った。また、B6阻害剤、金属イオンなどの酵素活性におよぼす影響についても調べた。

【結果】Bln_1997を均一に精製することに成功し、本酵素が高いアラニンラセマーゼ活性を有していることを明らかにした。本酵素は、活性の至適pHが 6.5、至適温度が30℃、温度安定性は35℃で30分間の熱処理でも失活せず、40℃での処理で残存活性が50％であった。本酵素の分子質量は79.7 kDaで、二量体構造を形成していた。また、アラニン以外にもセリンに対して、ラセマーゼ活性を示した。L-アラニンの基質に対するK_m値は25.2 mMであった。この酵素はPLP依存性の酵素阻害剤であるヒドロキシルアミン（0.1 mM）により顕著に阻害を受け、さらに、10 mMの種々の二価の金属イオンでも顕著に阻害された。一方、EDTAの添加において、酵素活性の増大が見られた。以上より、Bln_1997は補酵素PLP依存性で、二価の金属イオンにより阻害されるアラニンラセマーゼであることが判明した。また、同様にLSL_0358遺伝子を大腸菌で発現させ、発現産物を精製後、特徴を解析した結果、同様にPLP依存性のアラニンラセマーゼであることが分かった。両ラセマーゼの性質を比較すると、熱安定性や基質に対するK_m値などに違いが認められた。今後は、両乳酸菌のD-アラニン生産とその調節における両酵素の機能との関係性についての解析を進める予定である。一方、Bln_0232の大腸菌産物も同様に精製し、ラセマーゼ活性を検索したが、未だ検出に至っていない。さらにBln_0768の発現産物に関しては、現在、その詳細な性質を解析中である。

racemase, D-amino acid, lactic acid bacteria

講演番号:2C09p06
講演日時、会場:3月23日14:44～ C校舎09会場

*Streptomyces murayamaensis*由来の二次代謝産物生合成に関わるアスパラギン酸キナーゼ(NspJ)の機能解析

Functional analysis of aspartate kinase, NspJ, involved in secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces murayamaensis*

○辻本　舞、吉田　彩子、富田　武郎、大西　康夫[1]、葛山　智久、西山　真（東京生物工学セ、[1]東大院農生科応生工）

○Mai Tsujimoto, Ayako Yoshida, Takeo Tomita, Yasuo Ohnishi[1], Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama (Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo and [1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

【目的】放線菌*Streptomyces murayamaensis*は4-Hydroxy-3-nitrosobenzamide(4,3-HNBA)という二次代謝産物を産生する。4,3-HNBAはアスパラギン酸のリン酸化から始まる5段階の酵素反応により、生合成されると考えられている。アスパラギン酸のリン酸化酵素アスパラギン酸キナーゼ(AK)は、リジン、スレオニン、メチオニンなどのアミノ酸の生合成の初発酵素として知られ、ATPを用いてアスパラギン酸のγ-カルボキシル基のリン酸化を行う。こうした一次代謝のAKには、最終産物によるフィードバック阻害が知られている。一方、二次代謝に関わるAKの機能解析はほとんど行われていない。このため、本研究では*S. murayamaensis*の二次代謝産物である4,3-HNBAの生合成に関わるアスパラギン酸キナーゼ(NspJ)の構造機能相関の解明を目的とした。
【方法・結果】NspJの組換えタンパク質を、大腸菌を用いて発現し、精製した。NspJのAK活性は0.58 Unit/mgと測定された。当研究室で立体構造を解明した*Corynebacterium glutamicum*由来のAKと比較的高い相同性を有することから、NspJは$\alpha_2\beta_2$構造をとるheterooligomer型のAKである可能性が考えられた。そこで、α subunitと、β subunitをそれぞれ発現プラスミドにつなぎ、大腸菌で共発現をさせた。予想通り、両サブユニットは硫酸アンモニウムの存在下で$\alpha_2\beta_2$構造をとり、その活性はα subunitのみの場合より、約5倍高い値を示した。各種アミノ酸を始めとして生合成の最終産物や中間体など様々な化合物を阻害剤の候補として検討したが、現在まで活性に影響を与える物質は見出されていない。このため、NspJにおいては、β subunitは安定化と活性化に関与しているものと考えている。

aspartate kinase, *Streptomyces murayamaensis*, NspJ

講演番号：2C09p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ C校舎09会場

新規phosphoserine phosphataseの性状解析と生物内分布

Characterization of a novel phosphoserine phosphatase from an autotrophic and hydrogen-oxidizing bacterium and the distribution of the orthologs.

○千葉 洋子、堀田 彰一朗[1]、大塚 淳[1]、新井 博之、永田 宏次[1]、石井 正治、田之倉 優[1]、五十嵐 泰夫（東大院農生科・応生工、[1]東大院農生科・応生化）
○Yoko Chiba, Shoichiro Horita, Jun Ohtsuka, Hiroyuki Arai, Koji Nagata, Masaharu Ishii, Masaru Tanokura, Yasuo Igarashi (The University of Tokyo)

【背景・目的】先行研究において、絶対独立栄養性水素細菌*Hydrogenobacter thermophilus*は既知のphosphoserine phosphatase (PSP)とは進化系統的に全く異なる新規なPSP (metal independent PSP; iPSP)を有し、これを用いてL-phosphoserineからSerを生成し得ることが明らかになった。本iPSPはcofactor dependent phosphoglycerate mutase (dPGM)と高い相同性を示すタンパク質からなるホモ2量体タンパク質であり、実際配列ベースでdPGMとアノテートされていた。しかし本タンパク質はdPGM活性を示さず、L-phosphoserineに対して高い基質特異性を示すphosphataseであった。また、*H. thermophilus*同様にphosphoserine生合成経路がゲノムから予測できるものの、既知のPSPホモログを欠く生物がバクテリアを中心とした幅広い生物に存在し、少なくともこれらの一部はiPSPのホモログを有することを発見した。そこで、新規iPSPの生物内の分布を明らかにすることを目指し、以下の研究を行った。
【方法・結果】まず、*H. thermophilus*のiPSPにおいて基質の認識に重要な残基を予測するため、iPSPの立体構造解析を行った。大腸菌にて大量発現した本iPSPを結晶化し、基質非存在下で1.5Å、基質（L-P-Ser）存在下で2.3Åの分解能で構造を決定した。次に、他生物が有するiPSPのホモログが実際にPSP活性を示すか確かめるために、2生物由来のiPSPホモログを大腸菌にて異種発現し、PSP活性の有無を確認した。結果、2生物が有する3種類のiPSPホモログのうち、2つはPSP活性を有することが明らかになった。これらの結果に基づき、iPSP活性に重要な残基およびiPSPの生物内分布について議論する。

amino acid, biosynthesis, crystal structure

講演番号：2C09p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎09会場

大腸菌PIIウリジリルトランスフェラーゼ / リムーバーゼ（UTase / UR)の機能ドメイン解析

Functional Characterization of *E. coli* Uridylyltransferase/Uridylyl-removing enzyme, GlnD.

○坂口　葵、中村　絵美、石川　孝博、澤　嘉弘（島根大・生命工）
○Aoi　Sakaguchi, Emi Nakamura, Takahiro Ishikawa, Yoshihiro Sawa (Shimane Univ.)

【目的】PII ウリジリルトランスフェラーゼ / リムーバーゼ（UTase / UR, *glnD*）は、グルタミン合成酵素（GS）のアデニリル化活性調節機構において、生育環境から受け取る分子シグナルに依存し、PII (*glnB*) のウリジリル化/ 脱ウリジリル修飾反応を触媒する酵素である。PII のウリジリル化／脱ウリジリル反応とは、PII タンパク質の Tyr-51 残基の水酸基が UMP 修飾／脱修飾される反応を意味している。ウリジリル化修飾あるいは脱修飾された PII は、GS アデニリルトランスフェラーゼ（GS ATase, *glnE*）を介したシグナル伝達によって GS のアデニリル化 / 脱アデニリルを制御している。窒素制限条件下では、PII はウリジリル化され、複合体 GS ATase-PII-UMP は脱アデニリル反応を触媒し、窒素過剰条件下では、PII-UMP は脱ウリジリルされ、複合体 GS ATase-PII はアデニリル化反応を触媒することが知られている。

GS ATase は、N 末端ドメインに脱アデニリル活性部位を、C 末端ドメインにアデニリル化活性部位をもつ複合酵素であることが報告されているが、UTase / UR も、ATase 同様の類似したヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性を示すことから、明らかに二機能性の複合酵素であり、N 末端ドメインと C 末端ドメインで別々の活性を持つと予測されているが、これまで分子レベルでの詳細は明らかになっていない。今回は、UTase / UR の機能ドメインを明らかにすることを目的として、種々の UTase / UR 分断体を作製し、触媒性のドメイン解析を行ったので報告する。

【方法・結果】UTase / UR [*glnD* / pUC19 / JM109] および PII [*glnB* , *glnK*/ pUC19 / *E. coli* YMC26 (Δ*glnD*)] を LB 培地で培養・集菌後、各種クロマトグラフィーによりほぼ単一にまで精製した。ATase との相同性から、*glnD* 全長を二分割し、四種のコンストラクト UT-N1 (1-440 aa), N2 (83-440 aa), C1 (440-891 aa), C2(700-891 aa) 作製を試みた。さらに、NT 領域を含む UT-NT、HD 領域を含む UT-HD、HD と ACT1 領域を含む UT-HD-ACT1、ACT1 領域までを含む UT-ACT1、HD と二つの ACT 領域を含む UT-ACT2 の作製も試みた。これらのコンストラクトは pCold ベクターへサブクローニングをし、*E. coli* BL21 で発現を行った。すべてのコンストラクトは、Ni カラムにより精製した。これらの酵素および調節タンパク質を用いて、主に MALDI-TOF-MASS スペクトルにてウリジリル化 / 脱ウリジリル修飾反応の解析を行った。

野生型酵素UTase / URは、最適反応条件下ではPIIを完全にウリジリル化 / 脱ウリジリル反応させることを確認した。分断体解析の結果、N末端側の配列を含むもの（UT-N1, N2）においてウリジリル化反応が行われ、C末端側の配列を含むもの（UT-C1）において脱ウリジリル反応が行われることが確認できた。また、glnKもglnB同様にウリジリル化、脱ウリジル修飾されることが確認された。PII、NT領域、HD領域、ACT領域、低分子調節因子について考察する。

GlnD, uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme, glutamine synthetase

講演番号：2C09p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎09会場

ナメコ由来チロシナーゼのタンパク質およびペプチドに対する反応性

Catalytic activity of *Pholiota microspora* tyrosinase for protein and peptide

大田　睦月、庄田　和生、小原　涼太[1]、野田　文雄[1]、○小西　康子（石川県大・食品科学、[1]株式会社　スギヨ）

Mutsuki Ohta, Kazuo Shoda, Ryota Ohara[1], Fumio Noda[1], ○Yasuko Konishi (Ishikawakendai, [1]Sugiyo)

【目的】食品加工に使われる酵素には様々なものがあるが、そのほとんどは分解酵素であり、結合形成を行う酵素は少ない。現在使用されている、タンパク質重合化活性をもつ酵素としては、トランスグルタミナーゼがある。トランスグルタミナーゼは、タンパク質中のグルタミン残基に作用してリジン残基のε-アミノ基との間に架橋を形成する。一方、チロシナーゼは、タンパク質中のチロシン残基に作用し、生じた *o*-キノン性側鎖は求核性側鎖をもつ種々のアミノ酸残基と架橋を形成することができる。また、同様の官能基をもつ化合物との架橋形成も可能である。このように反応性が多様であるため、チロシナーゼは新規食品素材の作出に有利であると考えられる。我々は、ナメコにはチロシナーゼが多く含まれ、この酵素は他の食用キノコのチロシナーゼに比べてタンパク質重合化活性が強いことを見いだした。そこで本研究では、タンパク質とペプチドに対するナメコ由来チロシナーゼの反応性および架橋形成反応について、その特徴を明らかにすることを目的に実験を行った。

【方法】チロシナーゼはナメコ子実体から、硫安沈殿およびイオン交換カラムにより部分精製し、25℃で１分間に１μmol の *t*-butyl catechol を酸化する酵素活性を１Ｕとして用いた。タンパク質基質としては、カゼイン、大豆タンパク質、魚肉タンパク質、小麦タンパク質、ヘモグロビン、ミオグロビン、BSA、オボアルブミンを用いた。ペプチド基質としては、３および４アミノ酸からなり、そのうち１つがチロシンであるペプチドを用いた。タンパク質とペプチドに対する反応速度は、酸素電極法により測定した反応液の酸素濃度減少速度として求めた。タンパク質重合化活性は、反応液のSDS-PAGE後のゲルについてCBB染色されたバンド強度から重合化率として評価した。

【結果】タンパク質に対する反応速度と重合化率は、基質タンパク質の種類により異なった。反応速度が速いタンパク質は重合化率が高く、反応速度が遅いタンパク質は重合化率も低かった。このことから、チロシナーゼとの反応により生じた*o*-キノン性側鎖量に依存してタンパク質が架橋されることが示唆された。ペプチドに対する反応速度は中性付近で速く、*t*-butyl catechol に対する反応速度の pH 依存性とよく似ていたが、タンパク質重合化活性の pH 依存性とは違っていた。また、反応速度はペプチドのアミノ酸配列に依存し、いずれもチロシンに対する反応速度よりも速かった。従って、チロシナーゼは、フリーのチロシンよりもペプチド中のチロシン残基への反応性が高いことがわかった。

Pholiota micropora, tyrosinase, cross-linking

講演番号：2C09p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎09会場

ニワトリ初期胚における血管形成と(プロ)レニン受容体の関係

Relationship between angiogenesis and (pro)renin receptor in the chick early embryo

○波多野大樹[1]、荻野寛子[2]、山下賢仁[1]、BISWAS BORON KAZARL[1]、荒井由江[1]、海老原章郎[1]、中川寅[1]、 鈴木文昭[1]（[1]岐大・応生、[2]岐大院・応生）

○Hiroki Hatano[1], Hiroko Ogino[2], Kento Yamashita[1], Biswas Boron Kazarl[1], Yoshie Arai[1], Akio Ebihara[1], Tsutomu Nakagawa[1], Fumiaki Suzuki[1]([1]Gidai, [2]Gidaiin)

【目的】(プロ)レニン受容体((P)RR)は、mRNAの発現が脳や腎臓などあらゆる組織で確認され、酵素レニンとその不活性前駆体プロレニンをリガンドとする受容体である。その作用として、レニン・アンジオテンシン系(RA系)とは独立してMAPKの活性化といった各種の細胞内シグナル伝達に関与することが示唆されている。また、AngⅡを介さない直接作用において、プロレニンは(P)RRと結合して血管平滑筋細胞の肥大・増殖を引き起こすことも報告され、(P)RRと血管形成との関係が注目されている。本研究では，血管形成と(P)RRの関係を検討するため、ニワトリ初期胚に(P)RR阻害ペプチド(PRRB)、アンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)をそれぞれ添加した場合の血管形成への影響を観察した。また血管形成とレニン・アンジオテンシン系(RA系)の関連を示す指標として関連因子のmRNA量を経時的に測定した。

【方法】脈管形成初期(孵卵18時間) に0.8μM PRRB(RIFLKRMPSI)を胚に添加し再び血管新生初期(42時間)まで孵卵した。その後、NBT/BCIP染色液で血管(管腔)染色し血管形成の様子を対照区と比較した。1,0.1μM ARBにおいても同条件で添加・孵卵した。その後、血管の染色を行い、血管形成の様子を対照区と比較した。また、孵卵を開始して6時間ごとの胚・血島領域を対象とし、RA系関連因子、血管形成因子のmRNA量をRTリアルタイムPCR法により経時的に測定した。

【結果】脈管形成期の孵卵18、24時間において、(P)RRとレニンmRNAは検出されたが，RA系関連因子であるAngN mRNAは検出されなかった。このことから、脈管形成期で(P)RRとレニンはAngNを初発物質とするRA系に依存せず、独立した働きを持つと考えられた。脈管形成初期の孵卵18時間において(P)RRBを添加し、孵卵42時間に血管染色をした結果、対照区と比べて血管(管腔)形成が抑制された。一方、ARB添加個体では対照区と比べて卵黄血管系の形成が抑制された傾向がみられた。これらの結果から、(P)RRはAngⅡがない状態で卵黄血管系の形成に関係していること、AT1受容体はAngⅡがない状態でも卵黄血管系の形成に関係しているのではないか、という可能性が考えられた。

(pro)renin receptor, angiogenesis, (pro)renin

講演番号:2C09p11
講演日時、会場:3月23日15:49～ C校舎09会場

酵素を用いて合成したL-システイン重合ペプチドのHPLCによる解析

HPLC analysis of enzymatically synthesized poly-L-cysteine

○奈良井　朝子、花石　智子、麻生　慶一（日獣大・応生）
○Asako Narai, Tomoko Hanaishi, Keiichi Aso (NVLU)

【目的】重金属捕捉能や抗酸化力を示すシステイン(Cys)側鎖のSH基に着目し、Cys重合ペプチド(PLCys)やCys含有ペプチドを酵素法で簡便に合成し利用することを目的に研究を進めてきた。これまで、L-システインエチルエステル(Cys-OEt)とα-キモトリプシンを低温凍結下、リン酸緩衝液（pH 8）中で反応させると、基質に対して高収量のPLCysを合成できることを見出した[1)]。MALDI-TOFMS分析によってPLCysの重合度が6-10であることを明らかにしたが、重合度別の収率やPLCys中の遊離SH基とS-S結合に関する定量的な解析は十分におこなわれていなかった。そこで、HPLCによるPLCysの分離・精製を試み、PLCys中に存在するSH基の安定性や反応性について調べるとともに、PLCysの定量方法についても検討をおこなった。
【方法と結果】PLCys合成反応を塩酸で停止した後、冷却遠心により白色沈殿性のPLCysを回収した。PLCysはDMSO、DMF、モノエタノールアミン、pH 10以上のアルカリ水溶液に溶解するが、高pH条件ではSH基の反応性が高まり分子内や分子間でS-S結合を生成すると予想されたため、DMSOに溶解後、希釈した試料をC18カラムと0.1% TFA含有水／アセトニトリルを用いた逆相HPLCに供し、分離・溶出した成分をUV220nmで検出した。その結果、DMSOが未吸着画分で溶出するにも関わらず、カラムに吸着したPLCysを重合度別に分離することができた。DMSOについては、Cys含有ペプチドにS-S結合を形成する酸化剤としての用途が知られているとおり、水で希釈して暗所下冷蔵または室温に保存した試料では、PLCysの減少と同時にS-S結合を介した生成物の増加が検出された。しかし、DMSOに溶解したPLCys試料を冷凍することで酸化物の生成を抑えることができた。次に、分取したPLCysをDMSO溶液中でSH基修飾試薬と反応させて生成物を解析したところ、HPLCで分離・精製が可能なPLCysを構成しているCys残基において、SH基は全て遊離型であることが示唆された。以上の結果に基づき、HPLCを用いたPLCysの定量解析について検討を進めている。

1) 日本食品科学工学会第58回大会（2011年）講演集 p.132

poly-L-cysteine, peptide synthesis

講演番号：2C09p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎09会場

部位特異的変異導入によるAMV逆転写酵素αサブユニットの熱安定性の向上

Increase in Thermal Stability of AMV Reverse Transcriptase α Subunit by Site-directed Mutagenesis

○小西 篤、保川 清、井上 國世（京大院・農）
○Atsushi Konishi, Kiyoshi Yasukawa, Kuniyo Inouye (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（AMV RT）とモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素（MMLV RT）は高い熱安定性と転写の正確性を有していることから、分子生物学的研究や臨床診断の場において広く用いられている。AMV RTは分子量63,000のαサブユニットと分子量95,000のβサブユニットから成るヘテロダイマーであり、MMLV RTは分子量75,000のモノマーである。RNAは高温では二次構造をとらないため、逆転写反応は高温で行うことが望まれるが、逆転写酵素の熱失活が問題となる。我々はMMLV RTの鋳型プライマーとの結合領域に部位特異的変異導入により正電荷を導入することにより、熱安定性の向上した変異型MMLV RT E286R/E302K/L435R/D524A（MM4）を作製した[1)]。本研究では、MM4の作製のためにMMLV RTに導入した変異に相当する変異をAMV RTに導入することにより、熱安定性の向上したAMV RT αサブユニット（Thr1-Tyr572）を作製することを目的とした。

【方法】①組換えAMV RT αサブユニットの調製：AMV RTとMMLV RTのアミノ酸配列は23%の相同性をもつ。MMLV RTのアミノ酸残基E286、E302、L435、D524は、AMV RT のV238、K254、L388、D450に相当する。C末端に$(His)_6$をもつ野生型AMV RT αサブユニット（WT）と変異型AMV RT αサブユニットV238R/L388R/D450A（AM4）を昆虫細胞Sf9で発現させ、細胞の可溶性画分から精製した。②poly(rA)-$p(dT)_{15}$（T/P）へのdTTPの取込み：AMV RT αサブユニットを42-50ºCで0-30分間熱処理した。その後、25 μM T/P（濃度は$p(dT)_{15}$のモル換算）、0.2 mM [^{3}H]dTTP存在下、37ºCで反応を行い、経時的に反応液を採取し、酸不溶性画分への放射能の取込みから初速度を求めた。③cDNA合成：16 pgのモデルRNA（1,014塩基）存在下、44-66ºCでcDNA合成反応を行った後、PCRを行った。PCRの反応物をアガロース電気泳動にかけ増幅産物を解析した。

【結果】①T/PへのdTTPの取込み活性を指標とした熱安定性：T/P非存在下および存在下におけるT_{50}（10分間の熱処理により逆転写活性を50%に低下させる温度）は、AM4では50ºCであり、WTでは44ºCであった。②cDNA合成活性を指標とした熱安定性：PCRで増幅産物が得られたcDNA合成反応の反応温度の上限は、AM4では64ºCであり、WTでは60ºCであった。

【結論】AM4はWTよりも高い熱安定性を有した。このことから、部位特異的変異によりT/Pとの結合領域に正電荷を導入して逆転写酵素の熱安定性を向上させる方法は、MMLV RTに対してだけではなくAMV RTに対しても有効であると考えられた。

【文献】1. K. Yasukawa, M. Mizuno, A. Konishi, and K. Inouye, *J. Biotechnol*. **150**, 299-306, 2010

AMV, reverse transcriptase, thermal stability

講演番号：2C09p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ C校舎09会場

組換えHIV-1逆転写酵素の調製と性状解析

Preparation and Characterization of Recombinant HIV-1 Reverse Transcriptase

保川 清、○篠村 まゆ[1]、井上 國世（京大院・農、[1]京大・農）
Kiyoshi Yasukawa, ○Mayu Shinomura[1], Kuniyo Inouye
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [1]Fac. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】ヒト免疫不全ウイルス1型逆転写酵素（HIV-1 RT）は分子量51,000のp51と66,000のp66から成るヘテロダイマーで、エイズ治療薬であるHIV-1 RT阻害剤の開発のツールとして実用化されている。モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素（MMLV RT）は分子量75,000のモノマーで、分子生物学的研究や臨床診断におけるcDNA合成酵素として実用化されている。本研究では、HIV-1 RTのcDNA合成酵素としての可能性を検討するために、大腸菌を宿主として組換えHIV-1 RTを調製し、その性状を解析しMMLV RTと比較した。

【方法】①組換えHIV-1 RTの調製：HIV-1タイプMのRT遺伝子を用いて、N末端に$(His)_6$をもつp51（Pro1-Trp426）（a）、$(His)_6$を含まないp66（Pro1-Leu561）（b）、N末端に$(His)_6$をもつp66（c）をそれぞれ大腸菌BL21(DE3)で発現させた。aを含む菌体の可溶性画分からp51のホモダイマー（$(p51)_2$）を、aあるいはbを含む菌体の可溶性画分の混合物からp51とp66のヘテロダイマー（p51/p66）を、cを含む菌体の可溶性画分からp66のホモダイマー（$(p66)_2$）をそれぞれ精製した。②組換えMMLV RTの調製：C末端に$(His)_6$をもつMMLV RT（Thr24-Leu670）をBL21(DE3)で発現させ、菌体の可溶性画分からMMLV RTを精製した。③poly(rA)-$p(dT)_{15}$（T/P）へのdTTPの取込み：25 μM T/P（濃度は$p(dT)_{15}$のモル換算）、0.2 mM [^{3}H]dTTP存在下、37℃で反応を行い、経時的に反応液を採取し、酸不溶性画分への放射能の取込みから初速度を求めた。37℃で10分間反応させた時に、T/Pに1 nmolのdTTPを取り込ませる酵素量を1 unitとした。④cDNA合成：16 pgのモデルRNA（1,014塩基）存在下、46℃でcDNA合成反応を行った後、PCRを行った。PCRの反応物をアガロース電気泳動にかけ増幅産物を解析した。⑤熱安定性の評価：RTを42、44、46、48℃で10分間熱処理した後に、37℃でT/PへのdTTP取込み活性を測定した。

【結果】①T/PへのdTTP取込み活性：$(p51)_2$、p51/p66、$(p66)_2$、MMLV RTの比活性はそれぞれ660、4,400、4,500、31,000 units/mgであった。②cDNA合成活性：いずれのRTもcDNA合成反応時の濃度が7×10^{-5}-7×10^{-2} μMではPCRで増幅産物が得られたが、0.7 μM以上では得られなかった。$(p51)_2$を用いたときの増幅産物の量は他のRTを用いたときよりも顕著に少なかった。③熱安定性：$(p51)_2$、p51/p66、$(p66)_2$、MMLV RTのT_{50}（10分間の熱処理により活性が50%に低下する温度）はそれぞれ<42、44、44、45℃であった。

【結論】$(p51)_2$、p51/p66、$(p66)_2$はいずれも逆転写活性を有した。p51/p66と$(p66)_2$の活性と熱安定性は$(p51)_2$よりも高かった。p51/p66と$(p66)_2$のT/PへのdTTP取込み活性はMMLV RTより低かったが、cDNA合成活性と熱安定性は同程度であった。

HIV-1, MMLV, reverse transcriptase

講演番号：2C09p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎09会場

好塩性酵素の触媒反応に及ぼす塩の効果

Effects of salts on catalysis of halophilic enzymes

○若井　暁、城所　俊一[1]、正木　和夫[2]、三本木　至宏（広島大院・生物圏、[1]長岡技大・生物、[2]酒類研）
○Satoshi Wakai, Shun-ichi Kidokoro[1], Kazuo Masaki[2], Yoshihiro Sambongi (Hiroshima Univ., [1]Nagaoka Univ. Tech., [2]Natl. Res. Inst. Brewing)

【目的】

高濃度塩環境下で機能する好塩性酵素の触媒反応を熱力学的に測定することで、その触媒反応に対する塩の効果を明らかにすることを目的とする。

高度好塩性菌は、細胞内外の浸透圧を調節するために細胞内に飽和濃度の塩を取り込んでおり、その局在によらず酵素は高塩環境に曝されている。本研究では、このような高塩環境で機能する酵素を好塩性酵素として使用する。

水は生物にとって必須であり、生命を支える多くの酵素が加水分解という水を伴う触媒反応を担っている。したがって、高塩環境がもたらす低水分活性という条件は、加水分解反応に対してクリティカルに影響するはずである。そこで、本研究では、高エネルギー化合物であるATPおよびピロリン酸（PPi）の加水分解に対する塩の効果を調べる。

【方法・結果】

高度好塩性菌は*Haloarcula japonica* TR-1株を使用し、3.4 M NaCl入りの培地を用いて培養した。菌体を高塩環境下でフレンチプレスにより破砕し、得られた膜画分および可溶性画分を用いて、ATPase活性およびピロリン酸加水分解（PPase）活性を測定した。膜ATPaseおよび可溶性PPaseの活性は、それぞれ2.5 M Na_2SO_4および4 M NaClで最大となった。

ATPおよびPPi加水分解に対する熱量変化を等温滴定マイクロカロリメトリ（ITC）により測定した。酵素溶液にATPもしくはPPiを滴定し、pH 8.0のTris緩衝液中、37 ºCで加水分解の反応熱（ΔH）を測定した。ATPの加水分解に対して、2.0 M Na_2SO_4存在下でのΔHは－39 kJ/molであった。また、PPiの加水分解に対するΔHは、2～4 M と大きくNaCl濃度を変えても、ほぼ一定の－35 kJ/molとなった。

【考察】

*H. japonica*の膜ATPaseおよび可溶性PPaseは好塩性を示し、その活性は高濃度の塩によって発現する。また、PPaseは、高塩濃度下で水分活性が変化しても加水分解のΔHを一定に保っている。一般的には、ATPおよびPPiの化学的な加水分解に対する自由エネルギー（ΔG）は、低水分活性下では大きく減少することが報告されている。したがって、$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$であることを考慮すると、好塩性酵素は、$\Delta S$項の部分で高塩環境に適応して低塩環境と同等の触媒反応をしていると考えられる。今回、膜ATPaseの活性が低く、塩濃度を変化させた状態でのITC測定ができなかったため、今後は比活性の高い精製酵素を使用して検討する。

ATP, Water activity, Isothermal titration calorimetry

講演番号：2C09p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ C校舎09会場

*Aspergillus oryzae*フェルラ酸エステラーゼBの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析

Mutational analysis of *Aspergillus oryzae* feruloyl esterase B involved in substrate discrimination

○河本 かずさ、鈴木 健太郎[1]、伏信 進矢[1]、若木 高善[1]、塩野 義人、小関 卓也（山形大・農、[1]東大院農・応生工）

○Kazusa Kawamoto, Kentarou Suzuki[1], Shinya Fushinobu[1], Takayoshi Wakagi[1], Yoshihito Shiono, Takuya Koseki (Yamagata Univ., [1]Toyko Univ.)

【目的】フェルラ酸エステラーゼは植物細胞壁ヘミセルロースに存在するフェルラ酸と糖のエステル結合を加水分解する酵素で、効率的な植物バイオマス分解や生理機能を有するフェルラ酸の酵素抽出に寄与している。*Aspergillus oryzae*由来フェルラ酸エステラーゼB(AoFaeB)の結晶構造から明らかとなった触媒残基に隣接するジスルフィド結合が、本酵素活性に重要であることを昨年の本大会において発表した。今回は、本酵素の基質認識に関与するアミノ酸残基について検討した。

【方法】AoFaeBのアミノ酸配列はタンナーゼに類似し、タンナーゼファミリーに分類される。AoFaeBの立体構造から触媒残基のcatalytic triad近傍にあり、フェルラ酸との相互作用が推定されたLeu235、Tyr348、Phe354、Tyr356の部位特異的変異を行った。アミノ酸置換は*A. oryzae*タンナーゼとのアミノ酸配列の比較で、L235Q、Y348E、F354V、Y356Kの一重変異とその組み合わせによる多重変異を行い、変異酵素は*Pichia pastoris*を用いて生産させた。培養上清からそれぞれの酵素を精製し、精製酵素を用いて解析を行った。

【結果】L235Q、Y348E、F354V、Y356K変異酵素の熱安定性は、エステラーゼ基質のα-ナフチル酪酸に対していずれも野生型酵素と同程度で、アミノ酸置換による構造の不安定性には影響ないものと考えられた。基質特異性はフェルラ酸エステラーゼの基質に用いられるフェルラ酸、*p*-クマール酸、カフェ酸それぞれのメチルエステルに対する活性で評価した。その結果、F354V変異酵素は野生型酵素と比べて、活性は低くなるものの、3種類の基質に対する活性を保持していた。一方、L235Q、Y348E、Y356K変異酵素の場合、いずれの基質に対しても活性は検出されず、Leu235、Tyr348およびTyr356はフェルラ酸、*p*-クマール酸、カフェ酸の認識に関わることが示唆された。現在、多重変異酵素について解析を行っている。

Aspergillus oryzae, Feruloyl esterase, Substrate specificity

講演番号：2C09p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ C校舎09会場

水溶性フェルラ酸誘導体の酵素合成に関する研究

Enzymatic synthesis of water soluble ferulic acid derivatives using feruloyl esterase.

○菊川 昌希[1]、井田 智章[2]、甲斐　建次[1]、居原 秀[2]、阪本 龍司[1]
（[1]阪府大院　生環科、[2]阪府大院　理）
○Masaki Kikugawa[1], Tomoaki Ida[2], Kenji Kai[1], Hideshi Ihara[2], Tatsuji Sakamoto[1]
([1,2]Osaka Prefecture University)

【目的】フェルラ酸（FA）は植物細胞壁に偏在するポリフェノールである。抗酸化能や抗炎症能などを併せ持つ多機能物質であり、近年ではアルツハイマー病（AD）などの脳疾患の予防効果が注目されている。しかし FA の問題点として、水に難溶性であるため産業での利用は制限され、またサプリメントとしては嚥下の弱い高齢患者の服用に問題を抱えている。本研究では、フェルラ酸エステラーゼ（FAE）による水溶性フェルラ酸エステルの酵素合成を試みた。

【方法・結果】ペクチナーゼ製剤より精製した FAE を用いて、FA に対してグリセロール及びジグリセロール（DG）をアシル基受容体にエステル縮合反応を行った。主生成物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより精製し、白色粉末のグリセロールエステル（GFA）及び黄色シラップ状のジグリセロールエステル（DG-FA）を単離した。

得られたエステル体の水溶性は GFA では約 20 倍、DG-FA では約 1,000 倍と大幅な上昇が見られ、さらに FA の持つ抗酸化能はエステル体でも保持されていた。

次に、水溶性の向上が特に見られた DG-FA に焦点をあてて、合成反応の最適化を行った。種々のパラメータの最適化を行ったところ、反応で発生する水を反応系外へ除去することにより、収率 90%（対 FA 比）の DG-FA 合成系を確立した。さらに、反応途中の溶液に FA を数回に分けて添加する Fed-Batch 法を採用することにより、高収率に加え、高収量での DG-FA 合成系を実現させた。

Fed-Batch 合成反応では DG-FA だけでなく、1 分子のジグリセロールに 2 分子の FA がエステル結合したジフェルロイル-ジグリセロール（DG-diFA）も同時に合成された。これは反応液中で大量に合成された DG-FA が、未反応の DG と同様に FA のアクセプターとして認識されるためだと考えられた。獲得した DG-diFA の性質解明は現在検討中である。

最後に、獲得した DG-FA の AD 改善効果を AD モデルマウス用いて評価した。AD の原因因子である β-アミロイドペプチド（Aβ）を側脳室内に注入したコントロールマウスでは記憶障害が生じた。一方、FA 及び DG-FA を 6 週間事前投与することで、Aβ注入マウスの記憶障害が軽減された。また同マウスでは海馬神経細胞脱落の軽減も観察された。よって DG-FA は FA と同様に Aβ誘導性ストレスから神経細胞を保護することで AD 改善効果を示すことが示唆された。

本研究では FAE を用いて、高収率・高収量で水溶性フェルラ酸エステルを合成することに成功した。また DG-FA には FA とほぼ同様の AD 予防効果が動物実験により認められた。

Ferulic acid esterase, Alzheimer disease, Enzymatic synthesis

講演番号:2C09p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ C校舎09会場

ビタミンK_2(メナキノン4)生合成酵素UBIAD1の酵素化学的性質の解析

Enzymatic properties of human UBIAD1: a novel menaquinone-4 synthase

○澤田 夏美、廣田 佳久、中川 公恵、須原 義智[1]、岡野 登志夫
神戸薬大・衛生、[1]横浜薬大・環境
○Natsumi Sawada, Yoshihisa Hirota, Kimie Nakagawa, Yoshitomo Suhara[1], Toshio Okano
Kobe Pharm. Univ., [1]Yokohama College of Pharm.

【目的】ビタミンKには植物由来のビタミンK_1(phylloquinone: PK)、微生物由来のビタミンK_2(menaquinone-n: MK-n)、人工化合物のビタミンK_3(K_3)などがある。K_3は側鎖をもたない2-メチル-1,4-ナフトキノンであり、PKはK_3にフィチル側鎖を、MK-nはK_3にイソプレン単位がn個繰り返したイソプレニル側鎖を付加した構造をもつ。微生物由来のMK-nは主にn=6～9であり、納豆菌のMK-7などがよく知られている。

ヒトが食事から摂取するビタミンKのほとんどがPKやMK-nであるにもかかわらず、組織中に高濃度に存在するのはメナキノン4(MK-4)であることが知られており、機能としてもMK-4が活性型であると考えられている。我々は、PKおよびMK-nを生体内でMK-4に変換する酵素として*UbiA prenyltransferase domain containing 1* (UBIAD1)を同定した[1)]。UBIAD1は大腸菌のメナキノン合成系の酵素の1つであるMenAと相同性が高く、複数回膜貫通構造を持つプレニル化酵素であると予測されるが、その機能の詳細はまだわかっていない。本研究では、バキュロウィルス-昆虫細胞発現系を用いて、ヒトUBIAD1を大量発現させ、酵素化学的な性質の解析を試みた。

【方法】ヒトUBIAD1をバキュロウィルスを用いて昆虫細胞で発現させ、ミクロソーム画分に発現していることをウエスタンブロットで確認した。そこでUBIAD1発現細胞ミクロソーム画分を含む反応系に重水素標識K_3(K_3-d_8)およびゲラニルゲラニル-2-リン酸(GGPP)を添加し、生成した重水素標識MK-4(MK-4-d_7)量をLC-APCI-MS/MSにより解析した。

【結果】ヒトUBIAD1のMK-4-d_7生合成活性の至適pHを調べたところ、pH8.5-9.0付近であり、その活性はDTTにより活性化された。K_3-d_8およびGGPPに対するK_m値、V_{max}値を求めたところK_m値はそれぞれ10.7、30.2 nMでありV_{max}値は0.17、0.23 nmol/min/mg proteinであった。それぞれのK_m値がnMオーダーと低いことからも、UBIAD1は生理的に重要なMK-4生合成酵素であることが示唆された。現在、基質特異性、金属依存性などに関して詳細な解析を進めている。

1) Nakagawa K. *et al.*: *Nature*, **468**, 117(2010)

vitamin K, menaquinone, prenyltransferase

講演番号：2C09p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ C校舎09会場

水圏から分離した *Burkholderia* 属細菌が生産する新規フィチン酸加水分解酵素の酵素学的解析
Biochemical Characterization of a Novel Phytase Produced by *Burkholderia* sp. Isolated from the Aquatic Environment.

○Eduardo GRAMINHO、高谷　直樹、中村　顕、星野　貴行（筑波大生命環境）
○Eduardo GRAMINHO, Naoki Takaya, Akira Nakamura, Takayuki Hoshino (Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

[目的] *myo*-イノシトールの６リン酸エステルであるフィチン酸は、植物組織の主要なリンの貯蔵形態であり、穀物や豆類などの種子に特に多く含まれている。

穀物や豆類は家畜・家禽の飼料としても広く用いられている。動物は自身ではフィチン酸分解酵素（フィターゼ）を有していないが、牛などの反芻動物ではルーメン中に存在するフィターゼ産生微生物の働きによりフィチン酸が分解され、リンが動物に利用可能となる。これに対して非反芻動物では、フィターゼ産生微生物がほとんど存在しないため、フィチン酸に含まれるリンは吸収されず、そのまま体外に排泄され、環境中のリン負荷を増大させる原因の一つとなっている。

また、フィチン酸は鉄・亜鉛などの主要なミネラルに対して強いキレート作用を有するため、動物消化管内でのミネラルの吸収を阻害し、動物の成長に影響を及ぼすことも知られている。

我々は筑波大学に隣接する霞ヶ浦をフィールドとして、魚類消化管内微生物叢の解析[1)]や、魚類用プロバイオティクスの開発を目指した研究を行っている[2,3)]。淡水魚用の飼料の主成分は穀物であるが、それに含まれるフィチン酸の挙動についてはこれまでほとんど考慮されてこなかった。そこで、水圏および水圏生物の消化管内を対象として、フィターゼ産生微生物の検索を行うこととした。

[方法および結果] 霞ヶ浦に生息する魚類の消化管内容物、霞ヶ浦各所の底泥などを分離源として、フィチン酸を単一リン源とする培地での集積培養を行った。同組成の寒天培地上に得られたコロニーについて、上記培地での液体培養を行い、無機リン酸の蓄積量の多い菌株を選択した。得られた菌株について 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析により簡易同定を行うとともに、各菌株の菌体内、菌体外のフィターゼ活性を測定した。その結果、すべての株でフィターゼ活性が菌体内に検出されたが、*Burkholderia* 属細菌と同定された a13 株が最も高い活性を示した。*Burkholderia* 属細菌由来のフィターゼはほとんど報告されていないため、本酵素の精製を行った。得られた酵素は分子量約 44 kDa のモノマー酵素であり、N-末端のアミノ酸配列は既知のフィターゼ類縁酵素と全く相同性を示さなかった。本酵素の酵素学的諸性質について詳細に報告する。

1) Hagi et al., Aquaculture, 234, 335-346 (2004)
2) Hagi and Hoshino, Biosci. Biotechnol. Biochem., 73(7), 1479-1483 (2009)
3) Sugimura et at., Biosci. Biotechnol. Biochem., 75(3), 511-515 (2011)

phytase, *Burkholderia,* aquatic environment

講演番号：2C09p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ C校舎09会場

Organophosphorus hydrolaseのアミノ酸置換による改良と精製法の検討

Modification of the activity by amino acid substitution and purification of organophosphorus hydrolase

○中山　公介、大森　毅[1]、瀬戸　康雄[1]、有路　沙織、石川　暁志、川原　一芳（関東学院大・工・物質生命、[1]科警研）

○Kosuke Nakayama, Takeshi Omori[1], Yasuo Seto[1], Saori Ariji, Satoshi Ishikawa, Kazuyoshi Kawahara（Kanto Gakuin University, [1]National Research Institute of Police Science）

【目的】Organophosphorus hydrolase（OPH）は *Sphingobium fuliginis* などの好気性グラム陰性細菌が産生する有機リン系化合物の分解酵素である。本酵素は有機リン系農薬だけではなく、これと類似の構造を有する神経剤の分解にも有効であるので、化学テロで用いられる可能性のある神経剤の除染という観点から研究が進められている。しかし神経剤の中でも、化学的に安定で強力な毒性を有する VX に対しては活性が低いため、変異の導入による改良が必要とされている。そこで本研究では既報をもとに活性中心のアミノ酸を置換する事により VX 分解活性が上昇した変異酵素を作製し、さらにその精製法を検討した。

【方法と結果】*S. fuliginis* ATCC 27551のゲノムDNAからシグナルペプチドを除くOPH遺伝子をPCRで増幅し、pTV118Nの*Eco*RⅠ、*Hin*dⅢ部位に連結したプラスミドを作製した。このプラスミドを鋳型として、N末端から254番目と257番目のアミノ酸に対応するコドンにPCRを利用して部位特異的に変異を導入し、得られた変異遺伝子をプラスミド上に持つ大腸菌を3株作製した。それぞれの菌株から粗酵素液を調製し、化学剤分解活性を一定時間後の残存量を測定する方法で調べた。その結果、254番目と257番目のアミノ酸がともにヒスチジンとなった変異酵素がVX分解活性が最も高いことが示された。この変異酵素を精製するためにタンパク質高発現用ベクターであるpET15bを利用し、OPHのN末端にヒスチジン6分子からなるHis-Tagが付加されるプラスミドを作製した。しかし、このプラスミドをもつ大腸菌では産生されたOPHが封入体を形成し不溶物となり、不溶物の可溶化も難しいことがわかった。そこでプラスミド上のHis-Tag配列を含む領域をPCRで増幅し、この断片をpTV118Nのマルチクローニングサイトにフレームを合わせて連結したプラスミドを作製した。このプラスミドを持つ菌株が産生するOPHは、活性は弱いものの可溶性だったので、このOPHをNiカラムを用いて精製した。しかし、精製画分には29 kDaの夾雑タンパク質が含まれていたので、このタンパク質を除去するためにDEAE-Sephadexのカラムクロマトグラフィーにより精製した。この操作により、夾雑タンパクをほとんど含まない変異OPHを得ることができた。

Keyword1, Organophosphorus hydrolase Keyword2, *Sphingobium fuliginis* Keyword3, neurotoxic chemical agent

講演番号:2C09p20
講演日時、会場:3月23日17:48～ C校舎09会場

タイトル *Sphingobium* sp. MI1205 由来ハロアルカンデハロゲナーゼLinBの結晶構造解析
Title Crystal structure of haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingobium* sp. MI1205

○岡井 公彦、大塚 淳、今井 ファビアナ リカ、間瀬 朋子、森内 良太[1]、永田 裕二[1]、永田 宏次、田之倉 優（東大院・農生科、[1]東北大院・生命科）
○Masahiko Okai, Jun Ohtsuka, Fabiana Lica Imai, Tomoko Mase, Ryota Moriuchi[1], Yuji Nagata[1], Koji Nagata, Masaru Tanokura (Grad. Sch. of Agri. Life Sci., The Univ. of Tokyo [1]Grad. Sch. of Life Sci., Tohoku Univ.)

【目的】我が国ではHCH（hexachlorocyclohexane）やDDT（dichloro diphenyl trichloroethane）などの有機塩素化合物を農薬として使用していたが、これらは毒性が強く、難分解性、生物蓄積性を有する化合物であったため、1970年代初頭に製造や使用が禁止された。これらの化合物は使用が禁止された後、地中への埋設処理が実施されたため、現在も尚、汚染を引き起こす可能性が危惧されている。HCHは有機塩素系殺虫剤の一種であり、塩素の位置により異性体が存在する。殺虫剤としての機能は γ-HCHのみが持っており、製造過程でβ-HCHも作られる。β-HCHは６つの塩素がエクアトリアルの位置にあるため異性体の中で最も安定に存在している。近年、β-HCHをPCHL（3,4,5,6-pentachlorocyclohexanol）を介してTCDL（2,3,5,6-tetrachlorocyclohexane-1,4-diol）まで分解するデハロゲナーゼ$LinB_{MI}$が見つかった。これまでに見つかっている$LinB_{UT}$はPCHL への反応を触媒するのみで、この２つの酵素はアミノ酸が７つ異なるだけである。本研究では$LinB_{MI}$の構造解析より$LinB_{UT}$との反応の違いを明らかにすることを目的としている。
【方法】目的遺伝子を組み込んだ発現用ベクターを大腸菌に導入し、IPTGによる発現誘導を行った。可溶性に発現が確認されたタンパク質はアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製し、結晶化用サンプルとした。得られた結晶は２次スクリーニングよって最適化した後、放射光施設でX線回折データを取得し、分子置換法により1.6Åの分解能で構造決定した。$LinB_{UT}$と異なる７アミノ酸を１つずつ置換した変異体についても同様に構造解析をおこなった。
【結果】$LinB_{MI}$は結晶中では単量体で、α/β-hydrolase foldを持つコアドメインと基質特異性に関わるヘリックスから成るキャップドメインより構成されており、全体構造は$LinB_{UT}$と非常に類似していた。変異体の構造解析より、$LinB_{UT}$と異なる７アミノ酸が、基質の結合に直接関与するアミノ酸・周辺のアミノ酸の位置を変えることで活性に影響を与えるアミノ酸・基質トンネルを形成しているアミノ酸にそれぞれ分類されることが示唆された。

crystallography, haloalkane dehalogenase, hexachlorocyclohexane

講演番号：2C09p21
講演日時、会場：3月23日17:59～ C校舎09会場

超好熱性古細菌由来の推定ハロ酸デハロゲナーゼPH0459の機能解析

Functional analysis of the putative haloacid dehologenase PH0459 from hyperthermophilic archaeon

○殷　梓蘭、中村　卓（長浜バイオ大学院・バイオサイエンス）
○Zilan Yin, Takasi Nakamura (Nagahama Institute of Bio-Science and Technolgy)

【目的】
本研究では、沖縄海溝内の熱水鉱床付近から単離された超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3株由来の推定のハロ酸デハロゲナーゼPH0459について機能解析を行った。PH0459の活性部位は、既知の*Pseudomonas* sp. YL株由来のL-2-ハロ酸デハロゲナーゼ（L-DEX YL）と類似なアミノ酸残基を有するため、L-DEX YLと同様のデハロゲナーゼ活性を持つことが期待された。しかし、活性測定の結果、PH0459のデハロゲナーゼ活性は既知のL-DEX YLの1/100程度であった。PH0459はハロ酸デハロゲナーゼ（HAD）スーパーファミリーに属し、そのファミリーには、脱リン酸化酵素（フォスファターゼ）も属するため、PH0459のフォスファターゼ活性についても検討した。
【方法】
PH0459 の遺伝子をタンパク大量発現用の pET11a ベクターに導入し、大腸菌 BL21（DE3）を使って、PH0459 大量発現を行った。菌体抽出液を超音波破砕して、95℃、20 min で熱処理を行った。その熱処理後のサンプルについて、*p*-ニトロフェノール法とマラカイトグリーン法の二つの比色定量法で PH0459 のフォスファターゼ活性について調べた。*p*-ニトロフェノールによる比色定量法で Mn^{2+}、Mg^{2+}に対しての金属依存性と温度、pH 依存性を調べた。マラカイトグリーン法で、ピロリン酸に対するフォスファターゼ活性を測定した。
【結果】
pET11aベクターと大腸菌BL21（DE3）の系でPH0459の大量発現に成功し、熱処理により高純度のPH0459を精製することができた。その熱処理後の菌体抽出液を用いて、フォスファターゼ活性測定を行った結果、*p*-ニトロフェノールリン酸とピロリン酸に対するフォスファターゼ活性が見られた。金属依存性の結果として、Mn^{2+}よりMg^{2+}に対する依存性が見られた。また、温度、pH依存性を調べたところ、70℃、pH8～9.5の間で高いフォスファターゼ活性が見られた。以上のことから、PH0459はデハロゲナーゼではなくて、フォスファターゼであると考えられた。

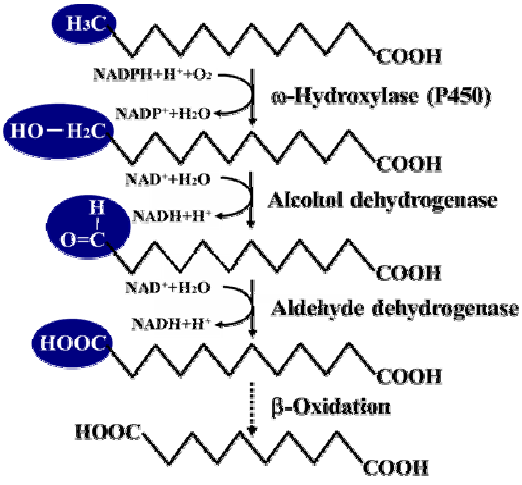
Pyrococcus horikoshii, PH0459, phosphatase activity

講演番号：2C10a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ C校舎10会場

脂肪酸ω酸化におけるアルコール脱水素酵素アイソザイムの役割

Functional roles of alcohol dehydrogenases in fatty acid ω-oxidation pathway

〇宮尾　夕子、山本　覚（福山大生命工・生物工）
〇Yuko Miyao, Satoru Yamamoto (Fukuyama dai)



ω-Oxidation Pathway

【目的】脂肪酸 ω 酸化は脂肪酸の ω 位をカルボキシル基にまで酸化する経路である。脂肪酸ω酸化経路は脂肪酸 ω 水酸化酵素（Cytochrome P450）による脂肪酸の ω 位への水酸基導入に始まり、この反応が、同経路において律速段階となっている。続いてアルコール脱水素酵素およびアルデヒド脱水素酵素により酸化反応を受けて脂肪酸のジカルボン酸誘導体を生成する。この経路の生理的な意義には不明な点が多いが、糖尿病や飢餓時などに、脂肪酸 ω 水酸化酵素が、強く誘導されることから糖質および脂質代謝に関与していると推定している。これまでに著者らはウサギ肝において同経路に関与する脂肪酸 ω 水酸化酵素（CYP4）、アルデヒド脱水素酵素の基質特異性について詳細に報告してきた。今回、同経路で働くアルコール脱水素酵素（ADH）アイソザイムを特定することを目的に、定量的 PCR を用いてウサギ各種臓器における同酵素アイソザイムの発現量を定量し、特に肝に分布する種々の ADH（Class I、Class Ⅱ isozyme1 および isozyme 2、Class Ⅲ）の基質特異性を検討したので報告する。

【方法】ウサギ肝、腎、胃に存在する種々の ADH アイソザイム mRNA の発現量の定量は、定量的 PCR により、相対定量法を用いて解析した。次に、肝に分布する 4 種の ADH アイソザイム cDNA を RT-PCR 法によりクローニングし、大腸菌発現系を用いて発現させた。4 種の ADH アイソザイム発現タンパク質を精製し、ω ヒドロキシ脂肪酸に対する親和性を検討した。ADH Class I について抗 ADH Class I 抗体を作成し、ウサギ肝細胞質画分に対して抗体阻害実験を行った。

【結果】4 種の ADH のうち Class I、Class Ⅱ isozyme1 および isozyme 2 は、肝に特異的に発現し、Class Ⅲはすべての臓器で発現していた。また、発現させた 4 種の ADH アイソザイムの中で Class I が最も ω ヒドロキシ脂肪酸に基質特異性の高いことが明らかとなった。抗 ADH Class I 抗体用いたウサギ肝細胞質画分に対する抗体阻害実験結果では、肝細胞質画分中のアルコール脱水素酵素活性は、抗 ADH Class I 抗体では完全に阻害されず、他の ADH 関与も示唆された。ω ヒドロキシ脂肪酸に対する Km、Kcat および Kcat /Km の値を求めた結果、ADH アイソザイムの中で、Class I だけでなく Class Ⅲも ω ヒドロキシ脂肪酸に高い親和性を有し、脂肪酸 ω 酸化経路において重要な働きをしている可能性が示唆された。

Alcohol dehydrogenase, ω-oxidation, Fatty acid

講演番号：2C10a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ C校舎10会場

タイトル ココヤシ由来Acyl-ACPチオエステラーゼは中鎖脂肪酸の生産に関与する

Title Characterization of Acyl-ACP thioesterase derived from coconut

○東條 卓人、遠藤 圭二[1]、瀧村 靖、尾崎 克也[1]、萩原 浩（花王 エコ研、[1]花王 生物研）

○Takuto Tojo, Keiji Endo[1], Yasushi Takimura, Katsuya Ozaki[1], Hiroshi Hagihara (Kao Eco-Innovation lab, [1] Kao Biological Science lab)

【目的】

脂肪酸は脂質の主要構成成分の１つであり、生体内においては膜脂質やトリアシルグリセロール等の貯蔵脂質を構成している。動植物内に蓄えられた脂肪酸は、食用又は工業用として広く利用されており、食品の中間原料やその他各種の工業製品などに用いられている。ココヤシ(*Cocos nucifera* L.)の果実から採取されるヤシ油は、洗浄用界面活性剤などに適する炭素数 12 の飽和脂肪酸(ラウリン酸)を主成分とするラウリン系油脂を豊富に含んでおり、食品用途だけでなく工業用原料としても非常に重要な位置を占める植物油脂である。一方で植物が貯蔵する油脂の多くは炭素数 16～18 の長鎖脂肪酸を主成分とするものがほとんどであり、ココヤシのように中鎖脂肪酸を主成分とする油脂を高度に蓄積する植物種はかなり限定される。そこでココヤシが中鎖脂肪酸を蓄積する機構を解明することを目的として本研究を行った。

【方法】

生体内での脂肪酸及び脂質の生合成に重要な役割を担っている酵素である Acyl-ACP チオエステラーゼ(以下 TE)に着目した。TE は葉緑体内や色素体内において脂肪酸生合成過程の中間体である遊離の脂肪酸を生成する酵素である。TE の作用によって遊離した脂肪酸は色素体から輸送されトリグリセリド合成に供される。TE は合成途中の脂肪酸の鎖長に対して反応特異性を示すものがあることが知られており、生体内での脂肪酸組成を決める重要なファクターである。本研究ではココヤシから新規の TE をコードする遺伝子を単離し、各種モデル生物において TE を発現させてその性質の解析を行った。

【結果】

ココヤシ由来TE遺伝子を導入した形質転換大腸菌において、高いレベルの中鎖脂肪酸の蓄積が確認され、ココヤシ由来TEが高い中鎖脂肪酸生産能力を有することを確認した。また、ココヤシ由来TEを導入した形質転換シロイヌナズナ種子においても野生型種子には見られない中鎖脂肪酸を含む油脂の蓄積が確認され、この酵素が植物内でも中鎖脂肪酸を生産する能力を有していることが確認された。また、今回取得したココヤシ由来TEのココヤシ組織における発現挙動を解析したところ、ラウリン系油脂を豊富に含む種子中の胚乳組織において高い発現が認められ、本酵素がココヤシでのラウリン系油脂の蓄積に関与していることが強く示唆された。

Coconut, Acyl-ACP thioesterase, medium chain fatty acid

講演番号：2C10a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ C校舎10会場

Bacillus sp. SP-04株由来のファミリーVIII カルボキシエステラーゼに属するテレフタル酸ジエチル加水分解酵素の構造および生化学的解析

Structural and Biochemical Analysis Reveals the Diethyl Terephthalate Hydrolase from *Bacillus* sp. SP-04 Belongs to Family VIII Carboxylesterase

○中村 元、村島 惇、牧村美幸、竹原宗範、井上吉教、熊谷 勉 (滋賀県大・工)
○Gen Nakamura, Atsushi Murashima, Miyuki Makimura, Munenori Takehara, Yoshinori Inoue, Tsutomu Kumagai (Dept. of Materials Sci., The Univ. of Shiga Prefecture)

【目的】当研究室では、土壌細菌*Bacillus* sp. SP-04株からテレフタル酸ジエチル(DET)を加水分解する新規エステラーゼ遺伝子を単離し、大腸菌でのクローニング、大量発現、および組換え酵素の精製に成功した[1, 2]。また、アミノ酸配列解析により、本酵素はSxxKモチーフとYx(x)NループをもつファミリーVIII カルボキシエステラーゼに属することが考えられた。本研究では、精製した組換え酵素について、芳香族カルボン酸エステル類に加え、β-ラクタム基質に対する酵素活性を測定した。また、本酵素の二次構造を予測し、相同性を示すエステラーゼやβ-ラクタマーゼと比較することで、これらの保存領域の妥当性を検討した。部位特異的突然変異導入で得られた変異酵素の精製と活性評価を行った。
【方法】加水分解活性はpHスタット(pH 8.0, 35 °C)による酸-塩基滴定法で、またβ-ラクタマーゼ活性はヨウ素滴定法(ペニシリン類)および分光光度法(セファロスポリン類)により求めた。PredictProtein、MAFFT (ver. 6)、およびMEGA (ver. 5) により、それぞれ二次構造予測、マルチアラインメント解析、および系統解析を行った。S69AおよびY180F変異導入酵素はNiアフィニティーカラムで精製した。
【結果】本エステラーゼは用いたいずれのβ-ラクタム基質(Ampicillin, Penicillin G, Penicillin V, Cephalothin, およびCephalexin)に対しても活性を示さなかった。二次構造予測より、本酵素はα,β-フォールド トポロジーを示すファミリーVIII カルボキシエステラーゼ、クラスC β-ラクタマーゼやDD-ペプチダーゼと類似の構造を示すことがわかった。推定上の活性セリン残基を含むS69xxKモチーフは、エステラーゼ分子の中央に配置する逆平行β-シートに隣接したα-ヘリックス(H2)の開始部位に存在していることが示された。また、Y180xxNループは上記のカルボキシエステラーゼ等と同様に、H5ヘリックスの開始部位に存在することが予測され、酵素の活性部位を構成している可能性が示された。S69AおよびY180F変異酵素を生産する組換え大腸菌は、DETを分散させた寒天培地上でハローを形成できず、エステラーゼ活性を失っていた。精製した変異導入酵素について、酵素活性の定量を行い、またY180の酵素のアシル化過程への寄与を検討した。

1) 宮本ら、2006年度農化大会講演要旨集、p. 296
2) 矢野ら、2011年度農化大会講演要旨集、p. 47

carboxylesterase, aromatic carboxylic acid esters, site-directed mutagenesis

講演番号：2C10a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ C校舎10会場

Streptomyces albidoflavus 由来金属イオン非要求性 phospholipase A_1 の大量発現、キャラクタリゼーション、X 線結晶構造解析

Overexpression and characterization, X-ray crystallography of metal ion independent phospholipase A_1 from *Streptomyces albidoflavus*

○加納功大、村山和隆*、杉森大助（福大院理工、*東北大院医工）
○Kota Kano, Kazutaka Murayama*, Daisuke Sugimori (Fukushima Univ. , *Tohoku Univ.)

【緒言】Phospholipase A_1(PLA_1)はリン脂質の*sn*－1位の脂肪酸エステル結合を加水分解し、脂肪酸とリゾリン脂質を生成する酵素である。PLA_1は広く生物界に分布し、特に豚膵臓や蛇毒、*A. oryzae*や*Serratia* sp.などの微生物由来のものについて至適温度やpHなどの特性が調べられている。しかし、基質認識機構やPLA_1とphospholipase A_2(*sn*－2位の脂肪酸エステル結合を加水分解)の違いは未だ明らかにされていない。そこで本研究では、それらについて解明することを目指し、*Streptomyces albidoflavus*由来phospholipase A_1の大量発現、キャラクタリゼーション、X線結晶構造解析を行った。

【結果と方法】*Streptoverticillium cinnamoneum*由来phospholipase Dのプロモーター、シグナル、ターミネーター間にPLA_1遺伝子を導入した発現ベクターpUC702/*pla*を用いて宿主*S. lividans*を形質転換し、培養上清中にPLA_1を大量発現させた。その結果、野生株と比較して約33倍のPLA_1活性を示した(46.4 U/mg)。発現株の培養上清からPLA_1を精製し、キャラクタリゼーションを行った結果、本PLA_1はphosphatidic acid(以下PAと略す)に最も良く作用した(Fig. 1)。速度論的解析によりPAにおける Km = 2.38 mM、V_{max} = 1.39 mmol/min/mg protein、k_{cat} = 6.3×10^2 s^{-1}を決定した。BLAST searchの結果、本PLA_1のアミノ酸配列はlipase_GDSLと予測されているsecreted hydrolaseと100%一致したが、本PLA_1はlipase活性を示さなかった。X線結晶構造解析の結果、分解能2.2Åで結晶構造解析に成功し、本PLA_1には7つのα - helix、6つのβ - sheet、3つのジスルフィド結合が存在し、触媒反応にはSer11とSer216、His218が関与していると予測された(Fig. 2)。部位特異的変異導入によりPLA_1変異型Ser11AlaとSer216Ala、His218Alaを作成した結果、すべての変異型が失活したことからSer11、Ser216、His218の3つのアミノ酸が触媒反応に関与していることが明らかとなった。

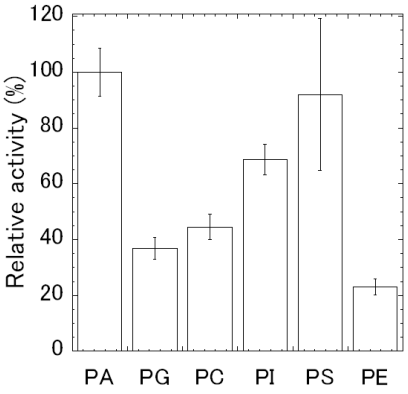


Fig. 1. PLA_1 の基質特異性

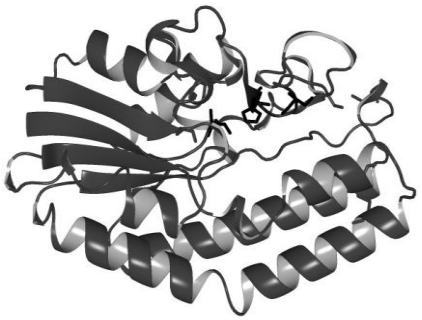


Fig. 2. PLA_1 の立体構造

Phospholipase A_1, characterization, X-ray crystallography

講演番号：2C10a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ C校舎10会場

Streptomyces sp. NA684由来新規ホスホリパーゼBの大量発現とその特性解析

Overexpression and characterization of a novel phospholipase B from *Streptomyces* sp. NA684

○松本　優作、杉森 大助（福島大院・理工）
○Yusaku Matsumoto, Daisuke Sugimori (Fukushima Univ.)

【目的】ホスホリパーゼB（PLB）はグリセロリン脂質の*sn*-1位および2位の脂肪酸エステル結合の加水分解を触媒する酵素である。PLBはリゾリン脂質あるいはglycero-3-*sn*-phosphocholine (GPC)などの製造、油脂精製への利用が期待されているが、産業上有用なPLBは開発されていない。これまでに当研究室では、スクリーニングにより*Streptomyces* sp. NA684由来新規PLBを見出し、精製、キャラクタリゼーション、クローニングを行った。本発表では本酵素の速度論解析、大量発現系の構築、反応過程におけるリゾリン脂質の生成について報告する。
【方法】速度論解析にはNA684株培養上清から精製したPLBを用い、ジミリストイルホスファチジン酸の加水分解におけるK_m、V_{max}、k_{cat}を求めた。*Streptoverticillium cinnamoneum*由来phospholipase Dのプロモーター、シグナル、ターミネーター間に本PLB構造遺伝子を連結した発現ベクターpUC702/*plb*を用いて宿主*S. lividans*を形質転換し、組換え大量発現株を得た。また、酵素反応における反応生成物である脂肪酸とGPCの経時変化を比色法により調べた。
【結果】Hanes-Woolf plotにより、K_m =14.5 mM、V_{max} =15.8 mmol/min/mg - protein、k_{cat} =1.02×10^4 s^{-1}を明らかにした。既知PLBと比較すると、本PLBは基質との親和性は低いものの、k_{cat} は極めて高かった。発現株はPLBを構成的に分泌生産し、培養2日目に100 U/ml (204 U/mg)の活性値を示した。また、培養上清1 L中に17 mgのPLBを生産し、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーと陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、培養上清から19倍まで精製できた（3840 U/mg)。
*Penicillium notatum*等の真菌由来PLBはリン脂質の加水分解過程でリゾリン脂質を生成しないと報告されている。一方、本PLBでは反応初期において脂肪酸を遊離しているものの、GPCをほとんど生成せず、リゾリン脂質を主に生成していることを示唆する結果が得られた（Fig. 1)。この特性は真菌由来PLBとは明らかに異なっていた。

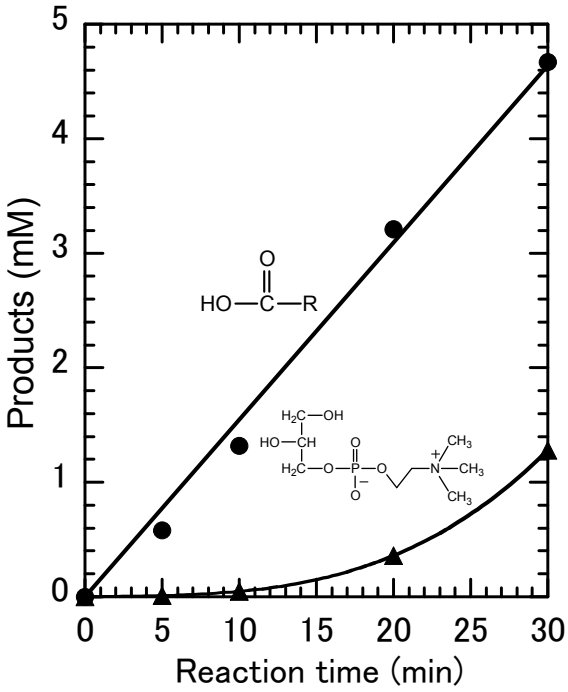


Fig. 1. Time course of hydrolytic reaction by PLB

phospholipase B, overexpression, characterization

講演番号:2C10a06
講演日時、会場:3月23日10:05～ C校舎10会場

ジアシルグリセロールキナーゼθの機能解析

Analysis of alternative splicing variants of diacylglycerol kinase theta

○上田修司、桐村悠佑、山之上稔、白井康仁（神戸大院・農）
○Shuji Ueda, Yusuke Kirimura, Minoru Yamanoue, Yasuhito Sirai (Kobe University・Grad. School Agric. Sci.)

【背景・目的】ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は、ホスホリパーゼによって産生されるセカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロール（DG）をリン酸化し、ホスファチジン酸（PA）に変換する脂質キナーゼである。DGKによる細胞内DGの減少とPAの増加は、プロティンキナーゼCなどセカンドメッセンジャーに応答する細胞内シグナル伝達因子を制御し、様々な生体内機能の発現に関わっていることが報告されている。DGKには10種類のアイソフォームが存在し、5種類のサブタイプに分類される。このうちDGKθは、タイプVに分類される唯一のDGKであり、その機能には不明な点が多い。そこで、本研究ではDGKθの機能解析を目的として以下の実験を行った。
【方法・結果】まず、DGKθの発現組織を調べるため、組織免疫染色を行った。マウス胎児16.5日のパラフィン切片を使用し、酵素標識ポリマー法で染色を行った結果、DGKθは、脳、胃、副腎、腎臓、腸管などで陽性反応が見られた。さらに詳細な組織免疫染色では、胃の粘膜、腎臓の尿細管、集合管、腸管の絨毛などに陽性反応が見られた。これらの組織分布から発達した刷子縁構造を持つ上皮細胞においてDGKθは強く発現することが示唆された。一方、全脳の可溶画分を用いたウエスタンブロッティングでは、分子サイズの異なる複数のバンドが確認され、DGKθのスプライシングバリアントの存在が示唆された。そこでヒトのESTライブラリーを用いてDGKθの相同性検索を行ったところ、第1エキソンに選択的なスプライシングが存在することが判明した。現在、選択的スプライシングバリアントの発現プラスミドを作製し、DGKθのスプライシングバリアントの発現及びその機能について検討を行っている。

Keyword1 diacylglycerol, Keyword2 DGK, Keyword3 splicing variant

講演番号：2C10a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ C校舎10会場

tRNAアグマチニル化反応の構造的基盤

Structural basis of tRNA agmatinylation essential for AUA codon decoding

○大澤　拓生、木村　聡[1]、寺坂　尚紘[1]、稲永　英子、鈴木　勉[1]、沼田　倫征（産総研・バイオメディカル、[1]東大院・工）

○Takuo Osawa, Satoshi Kimura[1], Naohiro Terasaka[1], Hideko Inanaga, Tsutomu Suzuki[1], Tomoyuki Numata (AIST, [1]Tokyo University)

古細菌においてイソロイシンコドンの１つである AUA は、アンチコドンに CAU をもつ tRNA（$tRNA^{Ile2}$）によって解読される。このアンチコドンの第一塩基であるシチジン（C34）はポリアミンであるアグマチンによって修飾を受けており、生体内では 2-アグマチニルシチジン（agm^2C）の形で存在している。この修飾は、翻訳過程におけるコドン-アンチコドンの誤った塩基対形成を阻害し、正しいタンパク質合成を保証する上で非常に重要である。

Agm^2C 合成は TiaS （$tRNA^{Ile}$-agm^2C synthetase）と呼ばれる酵素によって ATP 依存的に行われる。この反応過程で、C34 はリン酸化により一旦活性化されることが報告されている。しかしながら、TiaS には既知の ATP 結合モチーフが存在せず、また、一次構造上相同性のあるタンパク質も存在しないことから修飾反応を触媒する仕組みは全く理解されていなかった。そこで我々は、TiaS-$tRNA^{Ile2}$-ATP 三者複合体、TiaS-$tRNA^{Ile2}$-ATP アナログ-アグマチン四者複合体の構造機能解析を通して、$tRNA^{Ile2}$ にアグマチンが導入される仕組みの解明を試みた。

TiaS は４つのドメイン（TCKD、FLD、OBD、ZRD）から構成され、主にアクセプターアームとアンチコドンアームを認識する形で $tRNA^{Ile2}$ と結合していた。アクセプターアームは ZRD によって塩基配列特異的に認識されており、基質選択においてこの相互作用が極めて重要であることが明らかとなった。ZRD 以外のドメインは $tRNA^{Ile2}$ のアンチコドンアームを認識していた。アンチコドンアームは TiaS の結合に伴って大きく構造変化しており、特に修飾を受ける C34 は三者複合体構造において、FLD に存在するポケットにとらえられる形で完全にフリップアウトしていた。

Agm^2C 合成活性に不可欠である ATP は TCKD に結合していた。三者複合体構造において、ATP のγリン酸と C34 間の距離は 10Å も離れていた。この結果は、agm^2C 合成過程で C34 リン酸化中間体が生成するという生化学的実験結果と異なるものであった。一方で、アグマチンを含む四者複合体構造では、三者複合体構造において C34 がとらえられていた FLD のポケットにアグマチンが結合することで、C34 がγリン酸から 3Å の距離に配置されていた。この結果は、アグマチンの TiaS への結合の有無が C34 リン酸化中間体生成を制御していることを示している。即ち、アグマチン非存在下では、リン酸化 C34 をもつ $tRNA^{Ile2}$ が細胞内に蓄積するのを防ぐため、C34 をリン酸化が起きない場所にトラップしておく仕組みが TiaS に存在することを示唆している。このようなメカニズムは他の tRNA 修飾酵素では報告されておらず、本研究は tRNA 修飾における新規の知見を与えるものである。

tRNA, TiaS, agmatine

講演番号:2C10a08
講演日時、会場:3月23日10:27～ C校舎10会場

超好熱性アーキア*Thermococcus kodakarensis* のDNA polymerase Bは細胞の生育に必須ではない

DNA polymerase B is not essential for the cell viability of hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○櫛田 卓志[1]、倉内 康行[2]、鳴海 一成[3]、藤原 伸介[4]、今中 忠行[5]、東端 啓貴[1、2、6]（[1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・生命科学、[3]原子力機構・量子ビーム応用研究部門、[4]関西学院大・理工、[5]立命館大・生命科学、[6]東洋大・バイオナノ）

○ Takashi Kushida[1], Kurauchi Yasuyuki[2], Issay Narumi[3], Shinsuke Fujiwara[4], Tadayuki Imanaka[5], Hiroki Higashibata[1, 2, 5] ([1]Graduate school of Life Sciences, Toyo University, [2]Faculty of Life Sciences, Toyo University, [3]Quantum Beam Science Directorate, JAEA, [4]School of Science and Technology, Kwansei-Gakuin University, [5]College of Life Sciences, Ritsumeikan University, [6]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University.)

【目的】 超好熱性アーキア*Thermococcus kodakarensis* には、2種のDNAポリメラーゼがそれぞれ1つずつ見出されている。すなわち、ファミリーB型であるTK0001(PolB)とファミリーD型に分類される小サブユニットTK1902および大サブユニットTK1903(PolD)である。ファミリーB型のPolB（TK0001）は高い伸長能と正確性を持つなどの特徴から、主にリーディング鎖の合成を担っていると考えられてきた。我々は、*T. kodakarensis* の*polB* 遺伝子について解析を進める過程で、*polB* 遺伝子破壊株（Δ*polB* 株）を取得し、PolBが細胞の生育に必須ではないことを発見した。これは従来のユーリアーキオータ門に属するアーキアにおいて提唱されているDNA複製機構モデルに修正を迫る発見である。そこで本研究では、*T. kodakarensis* 細胞内におけるPolBの真の役割・機能を明らかにすることによって、ユーリアーキオータ門のDNA複製機構の全容を解明することを目的とした。

【方法・結果】 *T. kodakarensis* DAD株（Δ*pyrF*, Δ*pdaD* ）をホスト株として*polB* 遺伝子の破壊を試み、これに成功した（Δ*polB* 株)。Δ*polB* 株について、対数増殖期（5時間培養）および定常期（17時間培養）の菌体にUV、メチルメタンスルホン酸（MMS)、マイトマイシンC（MMC)、放射線（γ線）といったDNA損傷ストレスを与え、プレート上で培養した。その結果、ホスト株に比してΔ*polB* 株は、試みたすべてのDNA損傷ストレスに対し高い感受性を示すことを確認した。

【考察】 *T. kodakarensis* において*polB* 遺伝子は必須遺伝子ではないが、そのDNA修復に重要な役割を果たしていることが示唆された。

archaea, DNA polymerase B, *Thermococcus kodakarensis*

講演番号:2C10a09
講演日時、会場:3月23日10:38～ C校舎10会場

Rhodococcus rhodochrous J1株由来推定Vsrエンドヌクレアーゼの機能解析

Functional analysis of putative very short patch repair endonuclease from *Rhodococcus rhodochrous* J1

○大内 優彦、桑原 ふみ[1]、渡辺 文昭[1]、喜多 恵子（京大農・応用生命、[1]三菱レイヨン）
○Masahiko Ouchi, Fumi Kuwabara[1], Fumiaki Watanabe[1], Keiko Kita (Kyoto Univ., [1]MITSUBISHI RAYON)

【目的】*Rhodococcus*属細菌は、高GC含量のゲノムをもつグラム陽性菌であり放線菌の一種である。その多くが有機溶媒耐性をもち、4-35℃という広範囲な温度域で増殖可能である。*Rhodococcus rhodochrous* J1株はニトリルヒドラターゼおよびニトリラーゼを生産する産業微生物として知られており、次世代宿主候補としても期待されている。だが、宿主-ベクター系の開発において、制限酵素等の制限修飾系の存在は障害となることがある。

我々は、これまでに本菌の制限修飾系酵素について解析を行い、塩基配列GCCGGCを認識する制限酵素を単離して諸性質を明らかにした。さらに本菌では複数の制限修飾系の存在が示唆されている。その中で、5-メチルシトシンの脱アミノ化によって生じるT/Gミスマッチ配列を認識してDNAにニックを入れる、塩基除去修復機構の一端を担うvery short patch repair (vsr) endonucleaseと推察されるタンパク質の機能解析を本研究の目的とする。

【方法】*R. rhodochrous* J1株のゲノムDNAより目的のvsr endonuclease遺伝子をPCR法を用いてクローニングし、pUC18ベクターを用いて大腸菌JM109株内でN末端にHisタグを付加した融合タンパク質として発現させた。その後、Hisタグアフィニティーカラムを用いて目的タンパク質を精製した。1ヶ所のみT/Gミスマッチを持ち、片方の鎖の5'末端をビオチン標識した2本鎖オリゴDNAを基質として用いて、本酵素のDNA切断活性を測定した。

【結果】1Lの培養液から集菌した菌体より4.49mgの均一なタンパク質標品を得た。さまざまな配列を持つ基質DNAを合成し、酵素反応を行い、以下の3種類の基質において有意な結果を得た。GCCGGCを持つ基質では、ミスマッチを持たないGCCGGCおよび、ミスマッチを持つGTCGGCとGCCGGT（ミスマッチのTに下線を施した）に対しては、酵素活性は見られなかった。ところが、本酵素はGCTGGCに対しては切断活性を示した。CTCGAGとGTCGACを持つ基質に対しても反応を行なった結果、同様に有意な活性が得られた。現在、認識配列の特異性、反応に必要な金属イオン等の因子や反応温度等の諸条件についてより詳細な解析を行っている。

Rhodococcus rhodochrous, very short patch repair, endonuclease

講演番号：2C10a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ C校舎10会場

制限酵素EcoT38Iのドメイン結合リンカー領域の機能解析

Functional analysis of a linker region of EcoT38I restriction endonuclease

○喜多　恵子（京大院農・応用生命）
○Keiko Kita (Kyodai)

【目的】制限酵素（EC. 3.1.21.4）は2価金属イオンの存在下で2本鎖DNA上の特異的な配列を認識してホスホジエステル結合の加水分解反応を触媒する酵素である。遺伝子マニピュレーションに汎用されるパリンドローム配列を認識する制限酵素のほとんどは、同一のサブユニットからなるホモダイマーを形成して2本鎖を同時に切断することが知られている。大腸菌TH38株の生産する制限酵素EcoT38IはG(G/A)GC(C/T)／Cを認識して／の位置を切断する。我々はこれまでに酵素単体およびDNA複合体のX線結晶構造解析を行い分子モデルを作成した結果、本酵素のサブユニットはDNA認識ドメインと切断ドメインがリンカーを介して結合した構造をもち、DNA切断ドメインを介してホモダイマーを形成していること、DNAと結合することにより片方のサブユニットの活性中心のみがDNAの切断部位と相互作用することを明らかにした。立体構造情報に基づき反応機構を解析した結果、2本鎖DNAを1本ずつシーケンシャルに切断するユニークな性質を示すことを報告した(1)。本研究では、EcoT38Iの触媒機構とリンカー領域のアミノ酸残基の相関を明らかにすることを目的として、さまざまな変異酵素を構築して野生型酵素の性質と比較を行った。
【方法】リンカー領域のアミノ酸残基数を変化させた変異型酵素遺伝子を作成して、無細胞タンパク質合成系および大腸菌を宿主としてタンパク質を発現させた。発現したタンパク質は、Hisタグ特異的なアフィニティーカラムを用いて精製した。さまざまなDNAを基質として用いて切断反応を行い、ゲル電気泳動を用いて生成物を分離・解析した。DNA結合活性はゲルシフト法を用いて解析した。
【結果】変異型EcoT38I酵素は無細胞タンパク質合成系において良好に発現し、精製することなく切断活性の有無を解析することができた。大腸菌を用いて発現させた変異型酵素をほぼ均一に精製して特異性を調べた結果、無細胞タンパク質合成系で発現させた酵素と同様の活性を示した。リンカー領域のアミノ酸残基を3残基欠損させた変異型酵素はDNA切断活性を示さなかったが、4残基を挿入した変異型酵素は野生型と同じ認識特異性をもち、ほぼ同程度の比活性を示した。DNA結合活性については現在解析中である。

(1) 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(2010), 1T17-11

restriction endonuclease, DNA-binding protein, protein engineering

講演番号：2C10a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ C校舎10会場

タイトル　超好熱古細菌RNase Pタンパク質のRNA作用様式の解析

Title　On the functional effect of RNase P proteins on RNA in the hyperthermophilic archaea

○石原 雅人[1]、西本 悦子[2]、山下 昭二[2]、角田 佳充[1,2]、木村 誠[1,2]（[1]九大院・システム生命、[2]九大院・農）

○Masato Ishihara[1], Etsuko Nishimoto[2], Shoji Yamashita[2], Yoshimitsu Kakuta[1], Makoto Kimura[1]
([1]Dept. Systems Life Sciences, Kyushu Univ, [2]Dept. Agr., Kyushu Univ)

【目的】RNAの構造形成に関わるRNA結合タンパク質は、その作用様式により4つに分類されている。１）RNAに非特異的に結合し塩基対を解くRNAシャペロン、２）RNAに非特異的に結合し塩基対の形成を促進するRNAアニーラー、３）ATP依存的にRNAの塩基対を解くRNAヘリカーゼ、４）RNAに塩基特異的に結合するRNA特異的結合タンパク質である。超好熱古細菌（*Pyrococcus horikoshii*）RNase P は触媒活性を持つRNA（*Pho*pRNA）と5種のタンパク質（*Pho*Pop5, *Pho*Rpp21, *Pho*Rpp29, *Pho*Rpp30, *Pho*Rpp38）から構成されている。我々は、紫外吸収スペクトルの測定から、タンパク質複合体*Pho*Pop5 - *Pho*Rpp30と*Pho*Rpp21 - *Pho*Rpp29が*Pho*pRNAの塩基スタッキングを減少するのに対して、*Pho*Rpp38は*Pho*pRNAの2本のステムループ構造に特異的に結合し、塩基スタッキングを増加することを報告した。本研究では、5種のタンパク質のRNAに対する作用様式を蛍光標識RNAを用いて、蛍光共鳴エネルギー移動を測定することにより検討した。

【方法】タンパク質の存在下あるいは非存在下で、蛍光標識した相補的塩基配列を持つRNA(Cy3-5'-ACUGCUAGAGAUUUUCCACAU-3'と Cy5-5'-AUGUGGAAAAUCUCUAGCAGU-3')を 50mM Tris-HCl, pH7.5, 3mM $MgCl_2$, 1mM DTTにおいて室温で混合後、日立蛍光分光光度計によりCy3を励起波長λ=535nmで照射し、λ=590nmの蛍光強度の消光を2秒間隔で測定しアニーリング活性を評価した。一方、上記の系に未標識のRNA（5'-AUGUGGAAAAUCUCUAGCAGU-3'）を加え、上記と同様に蛍光強度の回復を測定することにより、ディスプレイスメント活性（RNAシャペロン活性）を評価した。

【結果】タンパク質非存在下では、アニーリングに要する時間は240秒で、ディスプレイスメントは検出されなかったが、タンパク質複合体*Pho*Pop5 - *Pho*Rpp30と*Pho*Rpp21 - *Pho*Rpp29の存在下では、アニーリング時間はそれぞれ80秒と104秒に短縮され、未標識のRNAの添加後には顕著なRNAシャペロン活性（112秒と200秒）が検出された。一方、タンパク質*Pho*Rpp38の存在下では、アニーリングに要する時間は396秒で、ディスプレイスメントも検出されなかった。この結果より、両タンパク質複合体はRNAシャペロンとして機能するとともにRNAアニーラーとしても機能しているのに対して、タンパク質*Pho*Rpp38は両活性を持たないことが分かった。次に、*Pho*Pop5 - *Pho*Rpp30を構成する各タンパク質のアニーリング活性とRNAシャペロン活性を測定したところ、*Pho*Pop5は*Pho*Rpp30より強いアニーリング活性を示すのに対し、*Pho*Pop30は*Pho*Pop5より強いRNAシャペロン活性を有していることが明らかになった。この結果より、*Pho*Pop5と*Pho*Pop30は複合体を形成し、異なった作用様式により*Pho*pRNAを活性化していることが示唆された。現在、*Pho*Rpp21と*Pho*Rpp29についてもアニーリング活性とRNAシャペロン活性を検討している。

fluorescence resonance energy transfer, ribonuclease P, RNA chaperone

講演番号:2C10a12
講演日時、会場:3月23日11:21～ C校舎10会場

タイトル　超好熱古細菌RNase Pタンパク質Rpp38 - RNA複合体の熱力学的性質と結晶化

Title　Thermodynamic analysis and crystallization of RNase P protein - RNA complex in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*

○大嶋浩介[1]、中島崇[2]、濱崎真人[1]、角田佳充[2]、木村誠[2]（[1]九大院・生資環・[2]九大院・農）

○Kosuke Oshima[1], Takashi Nakashima[1], Masato Hamasaki[1], Yoshimitsu Kakuta[1] Makoto Kimura[1]
([1] Dept. of Biores., Kyushu Univ., [2]Dept. of Agr., Kyushu Univ.)

【目的】リボヌクレアーゼＰ（RNase P）は前駆体tRNAの5’-末端余剰配列の切断を触媒するエンドヌクレアーゼで、触媒活性を持つRNAと補助因子であるタンパク質から構成されている。超好熱古細菌(*Pyrococcus horikoshii*)RNase P構成タンパク質Rpp38は、RNAサブユニット（*Pho*pRNA）のヘリックスP12とP15を含むステムループ構造（SL1: A116 - G201 とSL2: G229 - C276）に結合し、その構造形成に関与している。本研究では、Rpp38と*Pho*pRNAの相互作用を等温滴定カロリメトリー（ITC）（iTC200、MicroCal社製）により解析するとともに複合体の結晶化を試みた。
【方法】*Pho*pRNA、SL1とSL2を欠失した変異体ΔSL1とΔSL2、さらにSL1とSL2を試験管内転写により調製し、ポリアクリルアミド電気泳動およびDEAE-Sepharoseイオン交換カラムにより精製した。ITC測定では、Rpp38溶液(10 μM)をセルに入れ、RNA溶液（pRNA、ΔSL1、ΔSL2、SL1、およびSL2：各100-200 μM)）との相互作用を40° Cで測定した。Rpp38への結合能を保持したSL1由来最小RNA断片の検索は、ゲルシフトアッセイにより検討した。SL1由来RNA断片とRpp38の複合体の結晶化は各種結晶化スクリーニングキットを用いて行った。
【結果】ITCの結果、*Pho*pRNAとRpp38との結合定数(Ka)は1.56 x 107 M^{-1}で結合比は1:1とあった。また、*Pho*pRNAの二つのステムSL1あるいはSL2を欠失させた変異体ΔSL1とΔSL2を調製し、Rpp38への結合定数をITCにより測定した。その結果、ΔSL1とRpp38の相互作用は、Ka ＝ 6.71 x 106 M^{-1}で結合比は2 : 1、ΔSL2とRpp38のそれは、5.08 x 106 M^{-1}と1 : 1であった。この結果より、Rpp38は２つのRNA結合部位(site1とsite2)を持ち、site1はSL1特異的に結合し、site2はSL1とSL2ともに結合ができることが推定された。
次に、Rpp38とSL1由来RNA断片の結晶構造解析を目指し、Rpp38への結合能を保持した最小RNA断片を検索したところ、RNA断片（U131－A182）がSL1と同等の結合能を持っていることから、Rpp38との結晶化を行った。その結果、数種の条件で微小結晶が生成された。得られた結晶に対してX線を照射したところ、CrystalScreen E10の結晶化条件で得られた結晶が最も良好な回折パターンを与えたが、その分解能は7Åであった。現在、CrystalScreen E10の結晶化条件を基に最適化を試みている。

crystallization, isothermal titration calorimetry, ribonuclease P

講演番号：2C10a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ C校舎10会場

タイトル　シロイヌナズナ細胞小器官前駆体tRNAプロセシング酵素・PRORP1の調製と結晶化

Title　Preparation and crystallization of the pre-tRNA processing enzyme PRORP1 in *Arabidopsis thaliana* organelle

○今井　崇喜、中山　郁、角田　佳充[1]、木村　誠[1]（九大院・生資環、[1]九大院・農）

○Takayoshi Imai, Nakayama Kaoru, Yoshimitsu Kakuta[1], Makoto Kimura[1](Dept. of Biores., Kyushu Univ., [1]Dept. of Agr., Kyushu Univ.)

【目的】リボ核タンパク質酵素・リボヌクレアーゼP(RNase P)は、真正細菌から真核生物まで、すべての細胞において前駆体tRNAの5’末端余剰配列のプロセシングに関与している。しかし、植物や細胞内小器官では、RNase Pの存在は不明であった。最近、ヒトミトコンドリアでは、3つのタンパク質サブユニットからなるタンパク質複合体酵素（MRPP1, MRPP2, MRPP3）が、またシロイヌナズナ細胞小器官では、MRPP3のホモログであるタンパク質PRORP1が、前駆体tRNAのプロセシングを触媒していることが報告されている。本研究では、シロイヌナズナ細胞小器官前駆体tRNAプロセシング酵素・PRORP1の大腸菌内での発現と精製および結晶化を試みた。

【方法】酵素遺伝子の発現は、大腸菌発現ベクターpET-15bと宿主大腸菌BL21-CodonPlus(DE3)-RILを用いて行った。SP-Sepharose FastFlow(GE Heathcare)による陽イオン交換クロマトグラフィー、COSMOGEL His Accept(nacalai tesque)によるアフィニティークロマトグラフィー、HiLoad 16/60 Superdex 200(GE Healthcare)によるゲルろ過クロマトグラフィーにより組み換えタンパク質を精製した。タンパク質の結晶化には、各種結晶化スクリーニングキットを用いた。

【結果】PRORP1は36アミノ酸残基からなる葉緑体移行シグナルを含む572アミノ酸残基からなり、N末端側にRNA結合に関与する3つのPentatricopeptide repeat protein(PPR)モチーフとC末端側に金属ヌクレアーゼドメインを持っている。まず、葉緑体移行シグナルを除去したdes38（pos. 38-572)と金属ヌクレアーゼドメインのみからなるdes220（pos. 221-572)をコードする遺伝子断片をPCRにより増幅し、大腸菌発現ベクターpET-15bと宿主大腸菌BL21-CodonPlus(DE3)-RILを用いて発現誘導したところ、37 ℃の培養では両組み換えタンパクとも封入体として発現されたが、16 ℃の培養では、ほとんどのタンパク質は可溶性画分に発現されていた。続いて、可溶性タンパク質を各種クロマトグラフィーにより精製したところ、両酵素断片とも収率は3 mg/lであった。次に、結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化条件を検索したところ、des220が0.1 M HEPES, pH 7.5, 10 % PEG8000, 8 % ethylene glycolや0.1 M CHES, pH 9.5, 20 % PEG8000等の条件で結晶化した。現在、des38の結晶化条件の検索を継続するとともに、des220の結晶のX線回折実験を行っている。

Arabidopsis thaliana, crystallization, tRNA processing

講演番号：2C10a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ C校舎10会場

電子顕微鏡による超好熱古細菌リボヌクレアーゼPの三次元再構成

Reconstruction of the hyperthermophilic archaeal RNase P by electron microscopy

○山口 浩輝[1]、真柳 浩太[2]、角田佳充[1]、木村 誠[1]（[1]九大院・農、[2]九大・生医研）
○Hiroki Yamaguchi[1], Kota Mayanagi[2], Yoshimitsu Kakuta[1], Makoto Kimura[1] ([1] Faculty of Agriculture, Kyushu University Graduate School , [2]Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University)

【目的】リボヌクレアーゼ P (RNase P) は前駆体t-RNA（pre-tRNA）の5'末端余剰配列を切断するエンドリボヌクレアーゼで全ての生物種に存在しているが、そのサブユニット構成と酵素化学的性質は、進化系統ドメイン（真正細菌、古細菌、真核生物）で異なっている。超好熱古細菌 (*Pyrococcus horikoshii*) の RNase P は、触媒活性をもつRNA（*Pho*pRNA）と５種のタンパク質から構成されていることを明らかにするとともに、５種のタンパク質の結晶構造を決定した。本研究では、*Pho*pRNAの高次構造モデルを塩基配列比較と既知の細菌RNase P RNAの構造情報に基づき作製するとともに、*Pho*pRNAと５種のタンパク質複合体の電子顕微鏡による単粒子構造解析を行い、超好熱古細菌RNase Pの高次構造を検討した。
【方法】既知のRNase P RNAの塩基配列の比較から、*Pho*pRNAの二次構造を再検討し。*Pho*pRNAの高次構造モデルは、この二次構造と真正細菌RNase P RNAの結晶構造に基づき、RNA構造作成プログラム（ERNA-3D）を用いて作製した。*Pho*pRNAと５種のタンパク質複合体は、*Pho*pRNAと各タンパク質（モル比1:3）を55℃で混合後、グリセロール密度勾配遠心法（5% ～30%）にて精製した。また、酵素基質複合体は、*Pho*pRNAの活性残基（A40とA41）を変異した変異体*Pho*pRNA、５種のタンパク質、pre-tRNAを混合後、上記と同様グリセロール密度勾配遠心法にて精製した。
【結果】*Pho*pRNAの高次構造モデルを作製したところ、それは16本のステムループを持つディスク様（110 Å x 95 Å x 21 Å）の高次構造であることが推定された。次に、*Pho*pRNAと５種のタンパク質複合体の電子顕微鏡画像を検討したところ、頻出する平均画像は得られたものの、不均一な画像が多く見られるため三次元再構成はできなかった。そこで、変異体*Pho*pRNAを用いてpre-tRNAを加えた酵素基質複合体を精製し、電子顕微鏡画像を検討したところ、電子顕微鏡画像は均一性が高く三次元再構成モデルを作製する事が出来た。続いて、この三次元再構成モデル構造に対し、各タンパク質の結晶構造と*Pho*pRNAのモデル構造を当てはめたところ、三次元再構成モデルに良く一致する事が分かった。しかし、今回の複合体にはpre-tRNAの電子密度は観察されず、pre-tRNAは解離していることが推定された。現在、酵素基質複合体の電子顕微鏡画像の再現性を確認するとともに、各タンパク質の帰属を検証している。

archaeal ribonuclease P, electron microscopy, reconstruction

講演番号:2C10p02
講演日時、会場:3月23日14:00～ C校舎10会場

乳酸菌由来生澱粉分解α-amylaseの機能解析

Functional Analysis of Lactic-Acid-Bacterium Origin Raw-Starch-Hydrolyzing alfa-Amylase

○齊藤　三保、小林　達矢、岡田　早苗、佐藤　英一（東農大応生科・化学）
○Mitsuho Saitoh, Tatsuya Kobayasi, Sanae Okada, Eiichi Satoh （Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr.,）

【目的】当研究室では*Streptococcus bovis* 148が分泌するα-amylase（AmyA）の研究が行われている。これまでにAmyAの生澱粉吸着部位（SBD）を欠失したAmyAは生澱粉分解能を消失することや、SBD自身も生澱粉表面に水膨れの様な特徴的な構造体を生じさせることを報告した[1)]。しかし、その詳しい作用機構は明らかにされておらず、AmyA SBDの吸着活性部位を特定することで未だ不明な吸着・分解機構の解明を目的とした。
【方法と結果】生澱粉分解能を有するα-amylaseのSBDに共通するアミノ酸配列をもとに、SBDの吸着に関すると予測した3つの芳香族アミノ酸残基を選抜した。このアミノ酸残基をそれぞれprolineに置換したΔW-P（W548P・W644P)、ΔY1-P（Y535P・Y630P)、ΔY2-P（Y537P・Y632P）を作成した。吸着試験において全ての変異型酵素の吸着速度が低下し、その中でもΔW-PとΔY1-Pの吸着率はAmyAに比べ20%程度と大きく低下した。そのため、これらのアミノ酸残基を澱粉吸着活性部位と推定した。また電子顕微鏡で澱粉表面を観察したところ、それぞれAmyASBDと同様に水膨れの様な特徴的な構造体が観察でき、ΔW-Pにおいては膨らみの面積が他に比べて小さかった。更に、AmyAの吸着活性部位のこれら芳香族アミノ酸残基は立体構造予測モデルにより、タンパク質立体表面上に並ぶと予測されているため、芳香環と吸着活性部位の構造が澱粉吸着に際し大きく関係していると考えた。そのため吸着活性部位と推定した芳香族アミノ酸残基を立体構造への影響が少ない芳香族アミノ酸であるphenylalanineへと置換したΔW-F（W548F・W644F)、ΔY1-F（Y535F・Y630F)、ΔY2-F（Y537F・Y632F）を作成し澱粉吸着試験に供した。この結果、作成したΔW-F、ΔY1-F、ΔY2-Fは吸着活性部位をprolineに置換したAmyAと比べ澱粉吸着活性が大きく回復した。このことからAmyAの生澱粉吸着には吸着活性部位の芳香族アミノ酸残基と立体構造が大きく関与している可能性が示唆された。
1）柳屋ら、日本農芸化学会2009年度大会講演要旨集、p130

raw-starch,　alfa-amylase,　starch binding domein

講演番号：2C10p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ C校舎10会場

*Lumbricus rubellus*由来アミラーゼの諸性質の検討

Purification and characterization of two amylases from earthworm, *Lumbricus rubellus*

五十嵐 佑樹、雪 真弘[1]、森川 康[1]、小笠原 渉[1]、○赤澤 真一（長岡高専・物質工、[1]長岡技科大・生物系）

Yuki Ikarashi, Masahiro Yuki[1], Yasushi Morikawa[1], Wataru Ogasawara[1], ○Shin-ichi Akazawa（Dept. Mat. Eng., Nagaoka Natl. Col. Tech., [1]Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech.）

【目的】近年，化石資源の使用に伴う環境悪化や資源の枯渇が問題となっており，持続可能な循環型資源としてバイオマスを用いたエネルギー開発が盛んに研究されている．中でも小麦フスマや籾殻等セルロース系バイオマスを活用したバイオエタノールの生産は，食糧と競合せずリグニン含量も少ないことから，これらの酵素糖化技術の開発は盛んに行われている．我々が着目しているミミズは，古くからセルラーゼ，アミラーゼ等の糖質加水分解酵素群を豊富に含むことが知られており，食糧廃棄物のコンポスト化にも幅広く利用されていたにもかかわらず，これら酵素群に関する知見は少なかった．また，我々はアカミミズである*Lumbricus rubellus*粗酵素溶液が効率良く小麦フスマを糖化できる事を見出しており[1]，ミミズ糖質加水分解酵素群の解明は，小麦フスマのようなソフトセルロースの糖化に応用可能である．そこで，これまでにアカミミズに含まれるエンドグルカナーゼ2種の諸性質の解明を行い，今回新たに2種のアミラーゼ（*Lr*Amy1，*Lr*Amy2）をについても精製し，諸性質について明らかにしたので報告する．

【方法】*L. rubellus*凍結乾燥粉末より粗酵素を抽出し，硫安分画により得られた活性画分を各種クロマトグラフィーにより精製した．酵素活性は2-クロロ-4-ニトロフェニル 6^5-アジド-6^5-デオキシ-β-マルトペンタオシド（N3-G5-β-CNP）を基質として用い，1分間にN3-G5-β-CNPから1 μmolの2-クロロ-4-ニトロフェノール（CNP）を遊離する酵素量を1 Uとして定義した．また，タンパク質量はBradford法により定量した．

【結果】*L. rubellus*粗酵素溶液中に見出した2種のアミラーゼはSDS－PAGEにおいて単一バンドにまで精製され，比活性は*Lr*Amy1が69.2 U/mg，*Lr*Amy2が40.4 U/mgを示し，各々約64 kDaのモノマーであることが明らかになった．*Lr*Amy1及び*Lr*Amy2の至適温度は各々45°C及び35°C．至適pHは両酵素共にpH 5.5であった．また，これまでにシマミミズ*Eisenia foetida*が有する2種のアミラーゼが低温で活性を有する特徴を持つことが報告されている．本研究で精製した両酵素も4°Cの低温条件において至適活性の約40%の活性を示し，低温耐性を有することが明らかとなった．現在は*Lr*Amy1の全長クローニングを試みている．

本研究は科学技術振興機構研究成果最適展開支援事業（A-STEP）の一環として行われた．

[1] 赤澤真一，五十嵐佑樹，遣水潤，横山大地，中澤光，森川康，小笠原渉．*Lumbricus rubellus*に含まれるエンドグルカナーゼの諸性質とバイオマス糖化能力の検討．日本生物工学会．2010年10月．要旨集p. 70．宮崎．

Keywords: *Lumbricus rubellus*, amylase, earthworm

講演番号：2C10p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ C校舎10会場

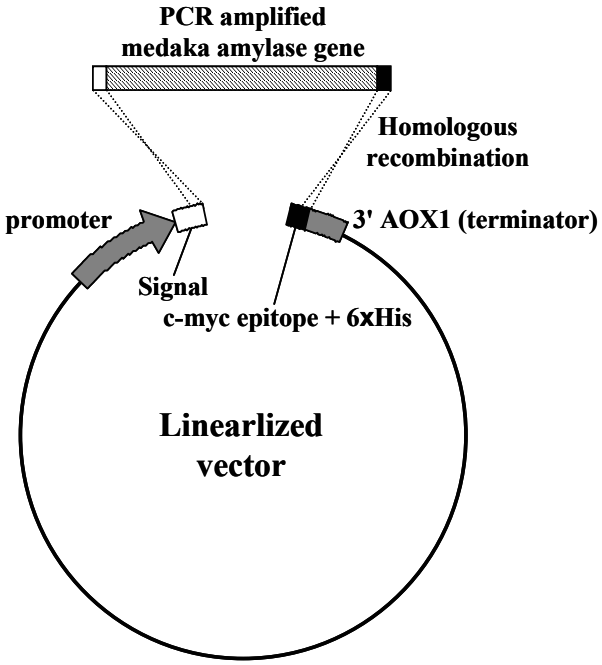
酵母*Pichia pastoris*で発現した、組換えメダカαアミラーゼの結晶構造解析

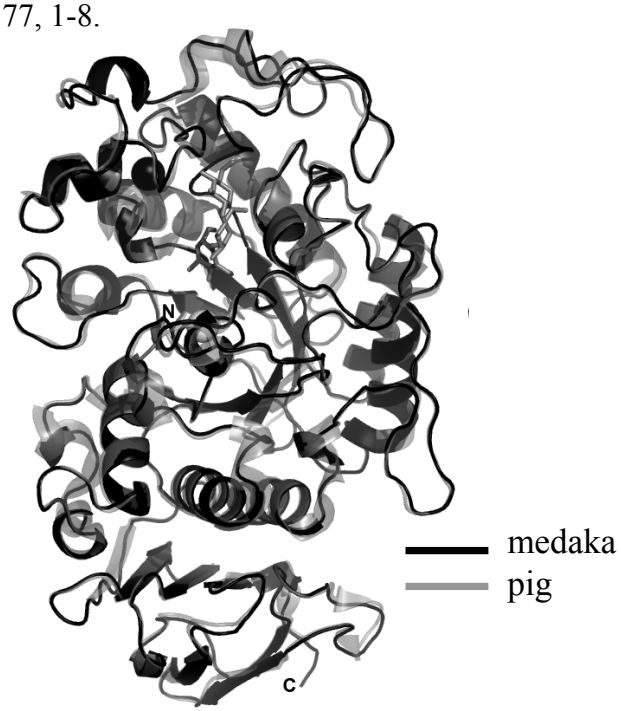
Crystal structure of recombinant medaka alpha-amylase expressed in yeast *Pichia pastoris*

○水谷 公彦、豊田 真悠子、吉岡 宗嗣、大竹 雄一郎、三上 文三（京大院農・応用生命）
○Kimihiko Mizutani, Mayuko Toyoda, Soshi Yoshioka, Yuichiro Otake, Bunzo Mikami (Kyoto Univ.)

【目的】メダカは様々な放射線の影響の解析などの生物学的研究のための理想的なモデル生物として知られている。しかし、メダカのタンパク質の構造や機能に関する研究は充分に進んでいない。本研究では、組換えメダカαアミラーゼの構造決定を試みた。【方法】発現系はメタノール資化性酵母*Pichia pastoris*とNBRP（ナショナルバイオリソースプロジェクト）medakaから入手したαアミラーゼのcDNAを用いて構築した。【結果】組換えタンパク質は培地中に分泌され、ニッケルアフィニティーカラムなどで簡単に精製が可能であった。精製したαアミラーゼはデンプン分解活性を保持しており、至適pH、K_m、V_{max}値などを決定した。また、塩素イオンが活性に必要であり、これらの性質はほ乳類の膵臓αアミラーゼと非常によく似ていた。さらに、精製したタンパク質を結晶化し2.85オングストローム分解能で構造決定を行った。その構造は$(\alpha/\beta)_8$バレルで構成され、（ヒトを含む）ほ乳類のタンパク質と非常に近いものであった。このことから、メダカのタンパク質の研究は、対応するヒトのタンパク質が引き起こす病気の研究にも応用可能であると示唆され、メダカはヒトの病気を研究する上でも理想的なモデル生物であると考えられる。また、本研究では新しい発現プラスミドを開発し、（以前に膜タンパク質について報告した）*P. pastoris*細胞内での相同組換えを用いたハイスループット発現系構築法が分泌タンパク質にも応用可能であることを示した。

Reference: K. Mizutani et al., (2011) Protein Expr. Purif. 77, 1-8.





α-amylase, X-ray crystallography, *Pichia pastoris*

講演番号：2C10p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ C校舎10会場

微生物由来プルラナーゼのフレキシブルループ変異酵素の性質

Characterization of flexible loop mutant of bacterial pullulanase

○岩本博行、佐藤孝憲、Malle Dominggus[1]、三上文三[2]（福山大・生命工、[1]Pattimura Univ.、[2]京大院・農）

○Hiroyuki Iwamoto, Takanori Sato, Dominggus Malle[1], and Bunzo Mikami[2]（Faculty of Life Sci. Biotech., Fukuyama Univ., [1]Faculty of Agriculture, Pattimura Univ., [2]Grad. Sch. of Agriculture, Kyoto Univ.,）

【目的】デンプン枝切り酵素であるプルラナーゼは、デンプン糖化工程に使用される産業的に重要な酵素である。*Klebsiella*や*Streptococcus*など肺に感染する病原菌では、細胞表面に結合したプルラナーゼが、標的組織のグリコーゲンを認識することにより病原性の発現に大きく関わっていることが知られている。一方、植物由来の酵素は、発芽時におけるデンプンの分解や、アミロペクチンの生合成に部分的に関与している。この様に多様な生理機能を持つプルラナーゼは、著者らによる*Klebsiella*由来プルラナーゼの結晶構造解析[1)]を嚆矢に、現在では多くの関連酵素の立体構造が明らかにされてきた。著者らはこれまで、*Klebsiella*由来酵素の活性中心に存在するフレキシブルループが、基質の結合によりコンフォメーション変化（induced-fit motion）を起こし、ループ上に位置するTrp708がサブサイト＋２に結合したグルコース残基とスタッキング相互作用するとともに、Glu706が触媒位置に移動する事を見いだした。そこで、フレキシブルループに変異を導入したところ、基質特異性の変化と耐熱性の向上が認められる変異酵素が見いだされた。そこで本研究では、フレキシブルループに変異を導入した酵素の熱安定性について調べるとともに、フレキシブルループ付近の構造を他起源のプルラナーゼと比較した。

【方法】変異酵素は、大腸菌で発現させたものを精製して用いた。酵素活性は、反応に伴って上昇する還元力の増加を指標に測定した。基質にはプルラン、アミロペクチン、グリコーゲンに加え、工業的な反応条件に近い高濃度のクラスターデキストリン（CD）を用い、野生型およびフレキシブルループ変異酵素の熱安定性と、低濃度および高濃度基質下における耐熱性について調べた。また野生型、変異酵素に対するカルシウムイオン添加の影響についても調べた。

【結果】フレキシブルループ変異酵素の中には、野生型酵素に比べて基質特異性が変化したものが見られた。また、変異酵素は熱安定性には有意な違いが見られなかったが、高濃度CD存在下では著しい耐熱性の向上が認められた。カルシウムイオンの添加に関しては、野生型酵素ではカルシウムイオン添加によって熱安定性が大きく上昇するのに対して、フレキシブルループ変異酵素ではカルシウムイオンを添加しても熱安定の向上は認められなかった。一方、著者らが構造解析を進めている*Bacillus* sp. 由来プルラナーゼでは、ループ部分に存在するTrp側鎖のフリップは認められたが、主鎖のコンフォメーション変化は認められなかった。

1) Mikami, Iwamoto *et al.* (2006) *J. Mol. Biol.*, **359**(3), 690-707

2) Malle *et al.*, (2011) 投稿中

Pullulanase, thermostability, flexible loop

講演番号：2C10p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ C校舎10会場

コムギβ-アミラーゼの特性解析ならびに溶媒工学による酵素活性および安定性の向上

Characterization and solvent engineering of wheat β-amylase for enhancing its activity and stability

○Bedada Tadessa, 兒島憲二, 井上國世 (京大院・農)

○Bedada Tadessa, Kenji Kojima, Kuniyo Inouye (Grad. Sch. of Agric., Kyoto univ.)

[Introduction] β-Amylase (α-1,4-glucan maltohydrolase or BA) hydrolyzes α-1,4-glucosidic bonds in starch from the non-reducing end and produces maltose. Himaltosin is an industrially-applicable commercial preparation of wheat BA from wheat bran. Wheat BA is generally neither active nor stable at high temperatures compared with BAs from other sources.

[Objective] The kinetic and thermodynamic parameters of wheat β-amylase were characterized and various additives were evaluated for enhancing its activity and thermal stability.

[Methods and Results] The catalytic activity and heat stability of wheat BA or Himaltosin (purchased from HBI Enzymes, Osaka) were studied following neocuproine method. Soluble starch was used as a substrate in 20 mM sodium acetate buffer at pH 5.4 to measure the activity. The Michaelis constant (K_m) and molecular activity (k_{cat}) values of wheat β-amylase were determined to be 1.66±0.14% (w/v) and 3.11±0.10 s^{-1}, respectively, at pH 5.4 and at 25°C. The optimum temperature (T_{opt}) for wheat β-amylase activity was 55°C and the temperature at which it loses half of its activity (T_{50}) after 30 min of incubation was 50±1°C. The T_{50} was increased by 5°C via modification of the solvent with 182 mM of glycine and 0.18% (w/v) gelatin. Glycerol, ethylene glycol, dimethylformamide (DMF) and dimethyl sulfoxide also slightly enhanced the thermal stability of wheat β-amylase. Ethanol and low concentration of DMF activated wheat β-amylase by up to 24% at 25°C. Its half-life at 55°C was improved by 25 min using 182 mM glycine. Most of the other evaluated additives had deactivation effect. The thermodynamic parameters indicate that wheat β-amylase is thermo-labile and slight stabilization was achieved through solvent modification with the additives.

β-amylase, solvent engineering, thermal stability

講演番号：2C10p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ C校舎10会場

Ｘ線結晶構造解析によるダイズβ-アミラーゼの反応機構の解明

Elucidation of reaction mechanism of β-amylase by X-ray crystallography

○三上　文三[1]、奥村　覚二[1]、山田　壮介[1]、安達　基泰[1]、水谷　公彦[1]、高橋　延行[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]原子力機構）

○Bunzo Mikami[1], Kakuji Okumura[1], Sousuke Yamada[1], Motoyasu Adachi[2], Kimihiko Mizutani[1], Nobuyuki Takahashi[1]　([1]Division of Applied Life Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Japan Atomic Energy Agency)

【目的】

β－アミラーゼの活性中心付近には触媒残基である二つのGlu残基の他に、最大11Å移動する9残基のフレキシブルループと構造が切り換わる5残基のインナーループの二つの可動ループが存在する。また、触媒残基の近くに存在するLys残基は基質の結合状態によってその側鎖の構造を変化させる。今回はダイズβ-アミラーゼの二つの触媒残基（Glu186とGlu380）の変異体およびLys295の変異体の結晶を用いて、基質アナログ複合体のX線結晶構造解析を行った結果について報告する。

【方法】

Glu186とGlu380の変異体としてE186AとE380Aを、Lys295の変異体として、k295A、K295M、K295Qを作製し、それらの結晶化と構造解析をマルトース複合体について行った。回折データの収集にはSPring-8でのBL38B1およびBL26B1のIPデテクターを用い、構造の精密化は分解能1.0～1.3Åまでのデータを用い、SHELXLによって行った。ループ開閉のマルトース濃度依存性は各変異体の結晶に異なる濃度のマルトースをソーキングした後に構造解析を行うことによって調べた。

【結果】

硫酸アンモニウムを沈殿化剤としてpH5.4でハンギングドロップによって得られたダイズβ-アミラーゼの結晶の空間群は$P3_121$であり、非対称単位に一分子の酵素を含む。Glu186、Glu380およびLys295の変異体では残存酵素活性が0.1%以下に減少した。E186AとE380Aの結晶中ではマルトースはサブサイト－２と－１および＋２と＋３の２箇所に結合し、－１サイトの糖のコンフォメーションは野生型で見られたボート型からイス型へ変化していた。一方、k295Aの結晶中ではマルトースは野生型と同様にサブサイト－２と－１および＋１と＋２に連続して結合し、－１サイトの糖のコンフォメーションは野生型で見られたボート型と同じであったが、－２と－１に結合するマルトースの結合は低下していた。これらの変異体のフレキシブルループとインナーループの構造変化のマルトース濃度依存性を調べ、それぞれの残基の基質結合における役割について考察した。

β-amylase, x-ray crystallography, enzyme mechanism

講演番号：2C10p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎10会場

デキストラナーゼに見出された『プロ酵素を介する活性化現象』の分子機構

Molecular mechanism of "proenzyme-mediated activation" found in dextranase

キムヨンミン、清水涼子、中井博之、森春英、奥山正幸、カンミンソン、藤本瑞[1]、舟根和美[2]、キムドマン[3]、○木村淳夫（北大・院農、[1]農生資研、[2]農研機構・食総研、[3]全南大・生科工）

Young-Min Kim, Ryoko Shimizu, Hiroyuki Nakai, Haruhide Mori, Masayuki Okuyama, Min-Sun Kang, Zui Fujimoto[1], Kazumi Funane[2], Doman Kim[3], ○Atsuo Kimura (Hokkaido Univ., [1]NIAS, [2]NFRI・NARO, [3]Chonnam National Univ.)

【目的】細菌由来デキストラナーゼ（Dex）は、糖加水分解酵素ファミリー（GH）49と66に属す。GH66型のDexは、アイソフォームやイソ酵素で形成された数多くの分子種として報告される例が多い。*Streptococcus mutans* ATCC 25175株のDex（GH66酵素）を大腸菌の発現系を用いて生産・酵素精製を試みた。分子サイズが90 kDaと95 kDaの２つの酵素分子（それぞれSmDex90とSmDex95）が認められ、前者のみを精製でき4°Cで保存した。約半年後にSDS-PAGEによる純度検定に供すると、SmDex90のバンドは消失し20～70 kDaの７つ以上の蛋白質バンドが観察された。活性を有する分子種も２つあり、比活性に変化がなかった。精製されたSmDex90標品に極僅か含まれていたプロテアーゼの切断によるものと理解した。比活性の低下がない点に着目し分子解析を試みたので報告する。また長期保存が可能なDexを得ることは、酵素利用や基礎研究の観点から重要であり、プロテアーゼ切断がないSmDexの作製も目的とした。

【方法と結果】SmDex90とSmDex95の他にプロテアーゼ切断体７つも含め、N末端配列解析・EMS-MS・アミノ酸分析に供し、N末端決定とC末端予測を行った。切断はX-Asn間で行われ、報告例がないAsn-Nプロテアーゼの存在が示唆された。GH66型のDexは、N末端にシグナル配列を有し、さらに「N末低相同性領域（N-VR）・保存領域・多糖結合領域・C末低相同性領域（C-VR）」の４領域からなることが想定されている。プロテアーゼ切断で、N-VRとC-VRを失った分子種のみに酵素活性があり、末端部分が欠落したSmDexが親酵素（SmDex90）よりも高い活性を示すと予想した。本予想の確認のため、両末端領域の削除体（ΔNC体およびΔC体; それぞれN末C末削除体およびN末削除体）を作製し、精製酵素標品を得た。高分子基質（デキストランT2000）や低分子基質（４糖や重合度８の環状イソマルトオリゴ糖）に対する酵素活性を求めると、SmDex90より２～７倍も高い値を示し、ΔNC体の方が大きな活性値を与えた。両削除体を用いてデキストランT2000に対する速度パラメータを求めた。２つの削除体のk_{cat}値はSmDex90のそれと同様な値であったが、$1/K_m$値がΔC体で約1.6倍に、ΔNC体で約６倍に増加した。従って『両末端領域の切断（翻訳後修飾）が基質分子への親和力向上を介したプロ酵素型の活性化機構に貢献』が解明された[1)]。なおΔNC体は、4°C・約60日間の保存で分解がなかったため結晶化に使用され、X線構造解析に成功した。 本研究は、生研センターイノベーション創出事業の支援のもとで行われた。

1) Kim YM ら: **Appl Microbiol Biotechnol**, 91(2): 329-339, 2011.

Dextranase, Truncation, Proenzyme

講演番号：2C10p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎10会場

*Streptococcus mutans*由来デキストラナーゼのX線結晶構造解析

Crystallographic analysis of dextranase from *Streptococcus mutans*

○鈴木 喜大[1]、金 泳珉[1,2]、藤本 瑞[1]、門間 充[1]、奥山 正幸[2]、森 春英[2]、舟根 和美[3]、木村 淳夫[2]
([1]農生資研、[2]北大・院農、[3]農研機構・食総研)
○Nobuhiro Suzuki[1], Young-Min Kim[1,2], Zui Fujimoto[1], Mitsuru Momma[1], Masayuki Okuyama[2], Haruhide Mori[2], Kazumi Funane[3], and Atsuo Kimura[2] ([1]NIAS, [2]Hokkaido Univ., [3]NFRI NARO)

【目的】*Streptococcus mutans* ATCC25175由来のエンド型デキストラナーゼ(SmDex; EC3.2.1.11)は、糖加水分解酵素ファミリー66に属し、デキストランを加水分解することでイソマルトオリゴ糖を産生する。SmDexを含む細菌由来のデキストラナーゼは活性のある多型を示し、大腸菌で発現させた全長のSmDexはプロテアーゼによる分解を受けたが、比活性に変化がなかった。最近我々は、活性を保持しプロテアーゼ分解を受けないN末端及びC末端領域を欠損した均一な変異体(SmDex-TM)の発現に成功した。本研究はSmDexの触媒機構を明らかにするため、SmDex-TMを用いたX線結晶構造解析を行った。

【方法】大腸菌で発現させたSmDex-TM及びそのSe-Met置換体の結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構においてデータを取得し、多波長異常散乱法で立体構造を決定した。

【結果】SmDex-TMは免疫グロブリン様構造のドメインN、$(\beta/\alpha)_8$バレルのドメインA、グリークキーモチーフのドメインCで構成されていた。ソーキング法によりSmDexとイソマルトトリオース(IG3)との複合体を作製し、その結晶構造解析からドメインAの中心部の触媒溝にある活性アミノ酸残基を決定した。結晶中ではIG3から逆反応によりイソマルトテトラオースかそれ以上の重合度のイソマルトオリゴ糖が生成され、触媒溝のサブサイト-1から-4においてイソマルトオリゴ糖由来と思われる電子密度が確認され、SmDexの基質認識機構を明らかにできた。
本研究は、生研センターイノベーション創出事業の支援のもとで行われた。

Dextranase, isomaltooligosaccharide, 3D structure

講演番号:2C10p10
講演日時、会場:3月23日15:38～ C校舎10会場

環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼの活性向上と生成物サイズ特異性の制御

Enhancement of enzyme activity and alteration of product-size specificity of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase

○鈴木龍一郎、鈴木喜大[1]、藤本瑞[1]、門間充[1]、木村啓太郎、木村 淳夫[2]、舟根和美（農研機構・食総研、[1]農生資研、[2]北大・院農）

○Ryuichiro Suzuki, Nobuhiro Suzuki[1], Zui Fujimoto[1], Mitsuru Momma[1], Keitarou Kimura, Atsuo Kimura[2], Kazumi Funane (NFRI NARO, [1]NIAS, [2]Hokkaido Univ.)

【目的】*Bacillus circulans* T-3040株由来の環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ（CITase; EC 2.4.1.248)は、糖加水分解酵素ファミリー66に属し、デキストランを基質とし環状イソマルトオリゴ糖(CI-n; nは重合度)を産生する分子内糖転移反応を触媒する。CIは、グルカンスクラーゼを阻害することにより歯垢形成を低下させる作用を有し、オリゴ糖型CI(CI-7, -8, -9）とメガロ糖型CI（CI-10以上）に分類される。また、オリゴ糖型CIでは顕著な包接能が見出されていないが、CI-10はビクトリアブルーBに対して高い包接能が観察されるなど、メガロ糖型CIにおいて大きな包接能の存在が示唆されている。しかしながら、CITaseはCI-8を主に生産し、メガロ糖型CIをほとんど生産しない。昨年度の本大会では、CITaseの立体構造情報に基づいた部位特異的変異を導入することで、メガロ糖型CIを効率良く生産する改変CITaseの創出を報告した。本研究ではさらに同変異を複数導入し、昨年度に改良した酵素よりもメガロ糖型CIの生産量が向上した変異体を創出したので報告する。

【方法】CITase遺伝子にアミノ酸置換を複数導入した。酵素生産を大腸菌内で行い、各変異酵素をNiアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。デキストラン40を基質とした酵素反応を行い、生成したCIをHPLCによって定量分析した。

【結果】CITaseは、触媒ドメイン近傍に糖質結合モジュールファミリー35に属する基質結合ドメイン(CBM35ドメイン)を有している。基質近傍に位置しているCBM35ドメインのTyrをSerに置換した変異体(Y477S)は、CI-8の生産能力を減少させ、メガロ糖型CIの生産量を向上させた。この結果から、CBM35ドメインがCI-8産生のサイズ特異性に関与することが示唆された。そこで、CBM35ドメインの基質結合部位に複数変異を導入し、CI-10の生産量を向上させたMutantRの創出に成功した。MutantRは、Y477Sに比べメガロ糖型CIをより効率良く生産するだけでなく、野生型CITaseを上回る総CI生産活性を示した。

本研究は、生研センターイノベーション創出事業の支援のもとで行われた。

Cycloisomaltooligosaccharide (CI), Cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase (CITase), Structure-based mutagenesis

講演番号：2C10p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ C校舎10会場

*Schwanniomyces occidentalis*由来α-glucosidaseの変異体による位置選択性の改変と新規糖転移産物の合成

Alteration of regioselectivity and synthesis of novel transglycosylation product by mutant α-glucosidase from *Schwanniomyces occidentalis*

○宋敬模，　西村茉利子，　奥山正幸，　森春英，　木村淳夫（北大院農）
○Kyung-Mo Song, Mariko Nishimura, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura (Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

【Aim】 α-Glucosidase from *Schwanniomyces occidentalis* (SOG) belongs to glycoside hydrolase family 31 (GH31). SOG displays broad substrate specificity in hydrolysis and transfers glucose moiety of donor substrate with generation of α-1,4-glucosidic linkage and α-1,6-glucosidic linkage. In order to elucidate the structural factor responsible for regioselectivity of SOG, we focused attention on amino acid residues which forms subsite +1. These residues are highly conserved in GH31 α-glucosidases. However, a corresponding residue to Trp324 of SOG varies in GH31 α-glucosidases, which have Trp or Tyr. Hence, we constructed and characterized Trp324 mutant SOG (W324Y) in order to elucidate the significance of the divergence between two aromatic residues.

【Methods & results】 The substrate specificity of W324Y was examined by determining kinetic parameters toward various α-glucobioses. The k_{cat}/K_m values for maltose, kojibiose, nigerose, and isomaltose were 4, 13, 42, and 140 times lower than those for wild type enzyme, respectively. The hydrolytic activity toward isomaltose was significantly decreased compared with other α-glucobioses. This result indicates that Trp324 is critical for the hydrolysis of α-1,6-glucosidic linkage.

Transglycosylation of W324Y was characterized using maltose as substrate. The results of TLC and HPLC analyses revealed that W324Y generated α-1,4- and α-1,2-glucosidic linkages and lost the ability of the formation of α-1,6-glucosidic linkage. These results indicate that Trp324 is important for the generation of α-1,6-glucosidic linkage in SOG-catalyzed transglycosylation. Since a novel product was detected with considerable amount, we tried to determine its structure. Reaction mixture was treated with glucoamylase, followed by fermentation using yeast cells for removing extra products. Mass spectrometry and NMR determined its structure as 2.4-di-α-glucosyl glucose.

α-glucosidase, regioselectivity, transglycosylation product

講演番号：2C10p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎10会場

Functional implication of amino acid residues in conserved region II of European honeybee α-glucosidase on substrate specificity, transglucosylation and substrate inhibition.

○Lukana Ngiwsara, Gaku Iwai, Haruhide Mori, Masayuki Okuyama, and Atsuo Kimura.
Res. Fuc. Agr.・Hokkaido Univ.

[Purpose] Honeybees (*Apis mellifera*) possess three isozymes of α-glucosidase (HBGI, II, and III), which belong to glycoside hydrolase family 13 (GH13). In spite of the high sequence similarity, the isozymes exhibited different kinetic behavior specific for their biological functions. HBGI, found in ventriculus of honeybees, catalyzes transglucosylation more efficiently than the others do. HBGII, present in ventriculus and haemolymph, shows broad substrate specificity and substrate inhibition. HBGIII is secreted from hypopharyngeal glands into nectar to hydrolyze sucrose in it. HBGIII acts on sucrose and maltose with high k_{cat} and K_m without substrate inhibition. To investigate the molecular basis of the unique properties of the isozymes, we focused on amino acids on the C-terminal side of catalytic Asp224 in the regions II, which were conserved in GH13 enzymes.

[Methods] Eleven HBGIII mutants and three HBGII mutants were produced in *Pichia pastoris* and purified by anion exchange chromatographies to homogeneity. Kinetic constants for various substrates were determined. Transglucosylation products were measured by HPAEC-PAD.

[Results] Single and double mutations introduced in 225-LPYIC-229 of HBGIII caused drastic change in the catalytic behavior. In particular, the Y227H mutant showed remarkable improvements in activity towards α-1,4- and α-1,6-glucosidic substrates due to increase in k_{cat} and $1/K_m$ with the retention of activity on sucrose. The Y227H mutation caused increase in transglucosylation with an altered regioselectivity of the formation of α-1,6 linkage rather than α-1,4. The other mutant P226N exhibited on the contrary a decrease in catalytic activity toward maltose and the transglucosylation ratio for sucrose. The counter mutants of HBGII, N226P, H227Y, and the double mutant (PY) of HBGII, also exhibited marked changes in enzymatic properties. The substrate inhibition observed in HBGII was drastically reduced, and the substrate specificity was altered remarkably. The PY mutant, for instance, acted on sucrose and isomaltose with the highest and very low activity respectively, while wild-type HBGII catalyzed the both with the half rate (k_{cat}/K_m) for maltose. Regioselectivity of the transglucosylation products was changed towards α-1,4 from α-1,6. PY produced exclusively erlose from sucrose, although the wild type formed theanderose predominantly. The results suggest that the amino acids in the regions II, particularly P226-Y227 in HBGIII and the equivalents, are one of the critical factors to determine the enzymatic properties of HBGs and probably of other GH13 enzymes.

Keywords: *Apis mellifera*, α-glucosidase, glycoside hydrolase family 13

講演番号：2C10p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ C校舎10会場

高活性α-グルコシダーゼの創出とその酵素特性

Production and characterization of highly activated α-Glucosidase

○岡本 武、丹尾 式希[1]（味の素㈱食品研、味の素㈱イノベーション研[1]）
○Takeshi Okamoto, Noriki Nio[1] (Institute of food sciences & technologies, Ajinomoto Co., Inc., Institute for innovation, Ajinomoto Co., Inc. [1])

【目的】
我々はこれまでに、澱粉の老化に伴う食品劣化の解決策として、麹菌由来α-グルコシダーゼを澱粉に反応させることで老化が抑制されることを見いだし報告してきた。また、麹菌由来α-グルコシダーゼとの反応により、デンプンの構造がどのように変化し、老化抑制効果が得られるのかを明らかにしてきた。麹菌由来α-グルコシダーゼはアミラーゼ類と比べると高価な酵素であるため、高活性化α-グルコシダーゼの創出とその酵素特性を明らかにすることを目的として検討を行った。
【方法】
各種プロテアーゼ処理によるα-グルコシダーゼの活性変化を比較し、高活性化するプロテアーゼ処理条件を見出した。次いで、各プロテアーゼによるα-グルコシダーゼタンパク質切断位置の確認と、得られた高活性化α-グルコシダーゼの酵素特性（温度安定性・依存性、pH 安定性・依存性）及び、実食品系（炊飯米）での効果を官能と物性測定により評価した。さらに、オリゴ糖を基質とした際の反応速度パラメータを求め、分解前の元のα-グルコシダーゼと比較し、高活性化α-グルコシダーゼの反応特性を検証した。
【結果】
麹菌由来α-グルコシダーゼを適切な条件下、各種のプロテアーゼで処理することで、ある特定の範囲での切断が起こることが確認された。プロテアーゼ処理後の酵素活性は、元の酵素よりも高くなり（最大で約1.5倍）、高活性化することが明らかとなった。また、高活性化酵素の至適温度、pHは元の酵素とほとんど変わらず、安定性についてもほぼ同等の特性示した。また、実食品系評価での有用性評価結果も分解前のα-グルコシダーゼの2/3量で同等以上の老化抑制の効果を示した。各反応速度パラメータは、Km，Vmax値がそれぞれ上昇するという結果となった。産業上利用される場合、基質濃度が十分に高い反応系が多いことから、Vmax値（最大反応速度）が高くなることで、より有用性の高い酵素へ変換されていると考えられた。

Keyword1： α-Glucosidase, Keyword2：enzymatic properties, Keyword3：highly activated enzyme,

講演番号：2C10p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎10会場

Bacteroides thetaiotaomicron 由来α-galactosidase の求核残基変異酵素が触媒する糖転移反応の解析

Characterization of transgalactosylation catalyzed by catalytic nucleophile mutant derived from *Bacteroides thetaiotaomicron* α-galactosidase

○渡辺　健一、奥山　正幸、森　春英、木村　淳夫（北大院農）
○Kenichi Watanabe, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura (Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ.)

【目的】アノマー保持型機構で加水分解反応を触媒する *Bacteroides thetaiotaomicron* 由来α-galactosidase は加水分解とともに糖転移反応を触媒する。しかしながら糖転移産物は加水分解され、ほとんど蓄積されない。我々は本酵素の求核触媒残基変異酵素（D415G）が外用求核性試薬存在下で、α-フッ化ガラクトース（α-GalF）を供与体基質に、単糖・二糖類を受容体基質に利用しα-ガラクトシルオリゴ糖（GOS）を高収率で合成できることを発見した。この糖転移反応の詳細について報告する。すなわち外用求核性試薬の種類の検討、反応速度に対する受容体濃度依存性、合成された GOS の収率測定および構造解析を行った。

【方法と結果】α-GalF を供与体、ラクトースを受容体として、外用求核性試薬にギ酸イオン・アジ化物イオン・酢酸イオン・フッ化物イオンのいずれかを用いた場合の反応生成物を TLC で確認した。ギ酸イオンでは GOS の蓄積を確認できた。アジ化物イオン・酢酸イオン・フッ化物イオンでは GOS はほとんど生成されなかったが、アジ化物イオンではβ-ガラクトシルアザイドの蓄積を観察できた。ギ酸イオン存在下でのα-GalF 分解反応速度の各種受容体濃度依存性を調べることで、受容体特異性を評価した。反応速度はフッ素イオンの遊離から求めた。D415G はラクトース・グルコース・キシロース・マルトース・セロビオースを受容体として糖転移反応を触媒した。速度パラメーターを求めると、セロビオースが最も高い特異性を示す受容体基質であった。前述した 5 種の単糖・二糖類をそれぞれ受容体として用いた際に得られた GOS の収率測定および構造解析を行った。GOS の収率は HPAEC-PAD 分析による受容体消費から算出した。HPLC で単離した GOS の構造決定は MS・NMR を用いて行った。ラクトースを受容体とした場合、1 種の新規な非還元三糖類であるα-ガラクトピラノシル β-ガラクトピラノシル-(1→4)- α-グルコピラノシドを収率 91%で合成した。現在、グルコース（4 種の GOS を収率 77%）、キシロース（3 種を収率 92%）、マルトース（6 種を収率 92%）、セロビオース（2 種を収率 72%）から合成した各種オリゴ糖の構造解析を進めている。

transgalactosylation, catalytic nucleophile mutant, external nucleophile

講演番号:2C10p15
講演日時、会場:3月23日16:43～ C校舎10会場

β-アロシド加水分解活性を示す新規グリコシダーゼの探索

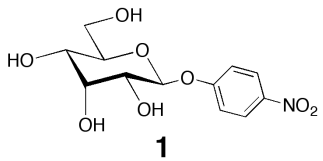
Search of novel glycosidase that show a β-alloside hydrolytic activity

○矢吹 悠[1]、三井 彩詠子[2]、塚越 匠[1]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化）

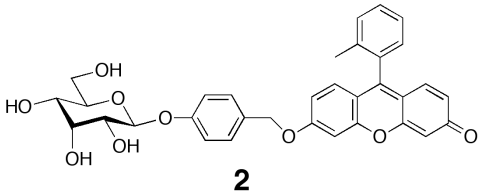
○ Yu Yabuki[1], Saeko Mitsui[2], Takumi Tsukagoshi[1], Takako Hirano[2], Wataru Hakamata[1,2], Toshiyuki Nishio[1,2]（[1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. And Life Sci., Bioresource Sciences. Nihon Univ.）

【目的】自然界にはごく少量しか存在しない希少糖があり、その一つにD-アロースが挙げられる。D-アロースには、がんの発生要因の一つである活性酸素種の産生を抑制する作用や、がん細胞増殖抑制作用といった生物活性が見いだされている。また、基質グリコンとしてD-グルコースやその2位エピマーであるD-マンノース、4位エピマーであるD-ガラクトースを認識するグリコシダーゼはα体、β体ともに多数発見されているが、3位エピマーであるD-アロースを認識するグリコシダーゼはα体、β体のどちらも未だ報告されていない。しかしながら、当研究室で行われてきた研究で*p*-Nitrophenyl-α-D-alloside に対して有意な加水分解活性を示すα-グリコシダーゼが報告されている。また、自然界からはD-アロースを構成糖とした植物由来のβ型の配糖体がいくつか見つかっている。このことから我々は自然界にはD-アロースを利用する生物がおり、これを特異的に認識しβ-アロシドに対し加水分解活性を示す酵素が存在しているのではと考えた。新規のグリコシダーゼの有用性として、糖転移反応による特殊オリゴ糖の酵素利用生産が挙げられる。我々はまず初めに土壌放線菌からβ-アロシド加水分解活性を示す酵素を有する菌体のスクリーニングを行うこととした。

【方法と結果】基質としてグリコン部分にはアロース、アグリコン部分には蛍光基質を導入したアロシドを合成し、β-アロシド加水分解活性により遊離した蛍光基質の吸光度あるいは蛍光光度の測定を行った。すでに市販されている様々なグリコシダーゼによるβ-アロシド加水分解活性を測定するために、蛍光基質として*p*-Nitrophenolをβ-グリコシド結合により導入したアロシド(**1**)を合成し、β-アロシド加水分解活性により遊離した*p*-Nitrophenolの405 nmの吸光度を測定した。また、蛍光基質として*p*-Nitrophenolより感度の高い2-Me TokyoGreenをβ-グリコシド結合により導入したアロシド(**2**)を合成し、これを液体培地に添加して放線菌を培養し、得られた培養上清の蛍光光度をExcitation:491 nm, Emission:510 nmで測定することによりスクリーニングを行った。また同様に、培養によって得られた菌体による菌体内酵素についてもβ-アロシド加水分解活性を測定した。今回は本スクリーニングで得られた結果について報告する。



1



2

β-alloside hydrolase, screening, actinomycetes

講演番号:2C10p16
講演日時、会場:3月23日16:54～ C校舎10会場

Cellvibrio sp. OA-2007由来のα-アガラーゼの精製とその諸特性

Purification and characterization of alpha-agarase from *Cellvibrio* sp. OA-2007

○岡本直樹,有賀　修,播本奈央望,中崎清彦[1]（高知工大・環境理工、[1]東工大・国際開発）

○Naoki Okamoto, Osamu Ariga, Naomi Harimoto, Kiyohiko Nakasaki[1] (Kochi Univ. of Tech., [1]Tokyo Tech.),

【目的】寒天オリゴ糖に有用性が知られており、我々もこれまでβ-アガラーゼのクローニングを行ってきた。しかし、α-アガラーゼに関する研究は非常に少ない。そこで、α-アガラーゼのクローニングを目的に、本研究では,寒天分解菌(*Cellvibrio* sp.)由来のα-アガラーゼの精製を試み,その諸特性を調べた。

【方法】寒天分解菌(*Cellvibrio* sp.)の菌体破砕液から,ハイドロキシアパタイトを用いた前処理の後,陰イオン交換カラム,ゲル濾過カラムを用いて,FPLCによりα-アガラーゼの精製を行った。β-アガラーゼを生産する組み換え大腸菌を用いて,アガロースの分解を行い,ネオアガロオリゴ糖混合液を調製し,分取クロマトグラフィーを用いて,ネオアガロビオース及びネオアガロテトラオースを精製した。精製した寒天オリゴ糖をα-アガラーゼの分解基質として用いた。β-アガラーゼを用いて得た寒天オリゴ糖混合物を含む20mMリン酸緩衝液に,分画により得られた酵素液を添加し,ネオアガロビオースを分解する画分をα-アガラーゼ活性画分として回収した。

所定時間に0.4%(wt/vol)ネオアガロビオースを分解し,ガラクトースを生産する酵素活性をα-アガラーゼ活性と定義し,ガラクトースの生産量をHPLCを用いて測定した。また,0.4%(wt/vol)ネオアガロビオースを含む20mMリン酸緩衝液(pH7)に精製α-アガラーゼを添加し,25℃において,1分間に1μmolのガラクトースを生成する酵素活性を1Uと定義した。精製α-アガラーゼによるネオアガロビオース及びネオアガロテトラオースの分解パターンの分析には,HPLC及びTLCを用いた。α-アガラーゼの精製度の確認及び分子量の推定にはSDS-PAGEを用いた。タンパク質量をBCA protein assay kitを用いて測定した。

【結果】0.5M NaClを用いたグラジエント溶出を行った陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製後,活性画分にはいくつかのバンドが見られたが,ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製後,活性画分には単一のバントのみが見られ,均一に精製されたものと思われた。HPLC及びTLC分析の結果,精製α-アガラーゼは,ネオアガロビオースを分解し,ガラクトースとアンヒドロガラクトースを生成するとともに,ネオアガロテトラオースを分解し,アンヒドロガラクトースとアガロトリオースを生産することが分かった。ネオアガロビオースを基質とした場合,精製α-アガラーゼのKm値は6.0mM,最大反応速度は19U/mg-proteinであった。また,反応の最適温度は32℃だった。ゲル濾過クロマトグラフィーの結果から,精製したα-アガラーゼの分子量は約93kDaであったが,SDS-PAGEでは約40kDaと推定され,精製α-アガラーゼは2量体であると思われる。２次元電気泳動を行ったところ、同じ分子量の２つのサブユニットが見られた。そこで、サブユニットの一つのN-末端アミノ酸配列を調べたところ、GDLPEKKLSKであり,これまでに報告されているアガラーゼとの相同性は見られなかった。

agarase, agarooligosaccharides, Cellvibrio

講演番号:2C10p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ C校舎10会場

1,3-1,4-α-L-フコシダーゼの結晶構造解析に基づく基質特異性の構造学的基盤

Structural basis for the substrate specificity of 1,3-1,4-α-L-fucosidase

○櫻間 晴子、伏信 進矢[1]、北岡 本光[2]、日高 將文[1]、芦田 久[3]、片山 高嶺、山本 憲二、熊谷 英彦（石川県立大・資源研、[1]東大院農生科・応生工、[2]農研機構・食総研、[3]京大院生命・統合生命）

○Haruko Sakurama, Shinya Fushinobu[1], Motomitsu Kitaoka[2], Masafumi Hidaka[1], Hisashi Ashida[3], Takane Katayama, Kenji Yamamoto, Hidehiko Kumagai (Ishikawa Pref. Univ., [1]Tokyo Univ., [2]NARO, [3]Kyoto Univ.)

【目的】*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* 由来の 1,3-1,4-α-L-フコシダーゼ(*Bi*AfcB)は Glycoside Hydrolase (GH) family 29 に属している．我々は，GH29 が分子系統樹解析によって 2 種のサブファミリー(GH29-A および GH29-B)に分類されること，またこの分類が基質特異性を良く反映していることを見出した．すなわち，GH29-A の酵素は *p*-ニトロフェニル-α-L-フコピラノシドを含む種々のフコシル結合に作用する(EC 3.2.1.51)のに対し，*Bi*AfcB が属する GH29-B の酵素は 1,3/4-α-L-フコシル基を特異的に切断する(EC 3.2.1.111)厳密な基質特異性を有する．本研究では *Bi*AfcB の複合体の X-線結晶構造解析を行うことで，その基質認識機構を明らかにするとともに，GH29 の基質特異性を規定する構造基盤を解明することを目的とした．

【方法】*Bi*AfcBはT7発現系を用いて大腸菌で発現させ精製した．複合体の結晶化はフコシダーゼ阻害剤であるデオキシフコノジリマイシン(DFJ)および基質であるラクト-*N*-フコペンタオース II [Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc, LNFP II] を用いて，ハンギングドロップ蒸気拡散法にて20℃で行った．回析データの収集はKEK-PF (NW12A)にて行い，構造決定はligand-free *Bi*AfcB(3MO4, Midwest Center for Structural Genomics)を用いた分子置換法にて行った．

【結果と考察】野生型のDFJ複合体(WT-DFJ)および触媒残基2重変異体のLNFP II複合体(D172A/E217A-LNFP II)の構造をそれぞれ1.6 Åおよび1.8 Åの分解能で決定した．WT-DFJ複合体ではDFJとエチレングリコール(抗凍結剤)の，D172A/E217A-LNFP II複合体ではLNFP IIのうちLewis a[Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc, Le^a]3糖構造の電子密度が活性中心において観察された．興味深いことに，*Bi*AfcBにおいては，リガンド結合に伴い活性中心近傍のループが大きく構造変化し，触媒残基が適切な位置に配置される(induced-fit)ことが明らかとなった．また，*Bi*AfcBはフコースが結合しているGlcNAc残基よりも，枝分かれしたGal残基と強く相互作用していた．これらの構造的な特徴は，*Bi*AfcBがLe$^{a/x}$のようなGal残基を持つ3糖構造によく作用し，Gal残基を有しない2糖構造 (Fucα1-3/4GlcNAc) にはほとんど作用しないことと一致した．一方，GH29-Aに属する*Thermotoga maritima*由来の酵素では，induced-fitは見られず，R253がGal結合部位に相当する位置に存在し，基質及び触媒残基と水素結合していた．Gal結合部位を形成するアミノ酸残基はGH29-Bの酵素で，R253はGH29-Aの酵素でそれぞれよく保存されており，このGal結合部位の存在およびinduced-fitがGH29の基質特異性を規定する分子機構であることが明らかになった．

α-L-Fucosidase, crystal structure, substrate specificity

講演番号:2C10p18
講演日時、会場:3月23日17:26～ C校舎10会場

Aspergillus sp. N-a株α-ガラクトシダーゼの酵素的性質

Enzymatic properties of α-galactosidase from *Aspergillus* sp. N-a strain

○倉掛　昌裕、奥村　匠、森本　裕一郎（福山大・生命栄養科学）
○Masahiro Kurakake, Takumi Okumura, Youichirou Morimoto (Fukuyama Univ. Life & Nutrition)

【目的】グアガムはマメ科植物種子から得られる多糖であり、増粘剤として広く利用されている。マンノースがβ-1,4結合した主鎖に、ガラクトースがα-1,6結合した構造をしており、その比率はマンノース：ガラクトース＝2：1である。この多糖を分解する酵素系としては、α-ガラクトシダーゼ、β-マンノシダーゼおよびβ-マンナナーゼがある。特にα-ガラクトシダーゼは生理活性物質の作用とも関連し、その用途が期待できる。グアガム平板培地を用い、土壌より分離した*Aspergillus* sp. N-a株は、高いα-ガラクトシダーゼ生産性を有した。このα-ガラクトシダーゼの精製を行い、糖転移性等の酵素的性質について調べた。
【方法】グアガム分解菌の分離には、１％グアガム(Sigma Ltd)、1.5%寒天培地を用いた。酵素生産のためのN-a株の液体培養には1%グアガム、0.5%酵母エキス、0.2%リン酸水素２ナトリウム12水和物、水100mlの培地を用いた。500ml容三角フラスコにて30℃、150rpmで4日間培養した。培養ろ液に 80%飽和になるように硫安を溶解させ、得られた塩析物を粗酵素標品として、各種クロマトカラムによる分画に供した。α-ガラクトシダーゼ活性測定には、1mM *p*-ニトロフェニル-α-D-ガラクトピラノシドを基質として用い、pH5、40℃で10分間作用させ、生成する*p*-ニトロフェノールを定量することで求めた。　酵素活性1Uは1分間1μmolの*p*-ニトロフェノールを生成する酵素量と定義した。
　糖転移反応には、基質として8%メリビオース(Gal-α-1,6-Glc)を用い、受容体として同量のメタノール、エタノール、キシリトール、マンノース、トレハロース、グリセリンおよびエチレングリコールを用いた。pH5、40℃で24時間反応させ、生成物をHPLCで分析した（カラム:GL-C610[日立化成]、カラム温度 60℃、キャリアー：蒸留水、流速 1ml/min、または、カラム:NH2P-50[旭化成]、カラム温度 25℃、キャリアー:アセトニトリル：水＝76：24、)。
【結果】*Aspergillus* sp. N-a株の液体培養液の各種酵素活性は、α-ガラクトシダーゼ 0.82 U/ml、β-マンノシダーゼ 0.027 U/ml、β-マンナナーゼ 0.050 U/mlであり、α-ガラクトシダーゼの生産性が非常に高いものであった。N-a株α-ガラクトシダーゼの最適pHは5付近で、安定pHは2～6となり酸性側で安定な酵素であった。最適温度は60℃で、安定温度は50℃以下であり、比較的耐熱性を有することがわかった。基質にメリビオースを用い、メタノール、エタノール、キシリトール、マンノース、トレハロース、グリセリン、エチレングリコールへのガラクトース転移性について調べたところ、トレハロースを除いて、HPLC分析において糖転移物のピークが検出された。しかし、いずれもわずかなものであった。これはα-ガラクトシダーゼの基質として用いたメリビオースへの反応性が低かったためである。そこで、より反応性が高い基質の選択を行い、糖転移性についての検討を行った。

α-galactosidase, guar gum, transglycosylation

講演番号:2C10p19
講演日時、会場:3月23日17:37～ C校舎10会場

Arthrobacter sp. K-1由来β-fructofuranosidaseのX線結晶構造解析

Crystal structure of β-fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. K-1

○ 横井岳、玉城彰子、宮崎剛亜、市川めぐみ、伊藤哲也[1]、藤田孝輝[1]、大田ゆかり[2]、秦田勇二[2]、西河淳、殿塚隆史（東農工大院農、[1]塩水港精糖、[2]JAMSTEC）

○ Gaku Yokoi, Akiko Tamaki, Takatsugu Miyazaki, Megumi Ichikawa, Tetsuya Ito[1], Koki Fujita[1], Yukari Ohta[2], Yuji Hatada[2], Atsushi Nishikawa, Takashi Tonozuka (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [1]Ensuiko Sugar Refining, [2]JAMSTEC)

【目的】 β-フルクトフラノシダーゼ (EC 3.2.1.26)は、スクロースを加水分解する酵素であるが、β-フルクトフラノシダーゼには高い糖転移反応を有するものが存在することが知られている。*Arthrobacter* sp. K-1株由来β-フルクトフラノシダーゼ(以下 *Ar*FFase)は、Glycoside Hydrolase family (GH) 68に属する酵素であり、スクロースのみが基質の場合ほとんど加水分解反応しか見られないが、ラクトースとスクロースの混合物に対しては、スクロースのフルクトース残基をラクトースに転移させ、ラクトスクロース (Gal-β(1→4)-Glc-α(1→2)β-Fru) を生成する糖転移反応を触媒する。ラクトスクロースは、難消化性のオリゴ糖であり、整腸作用やカルシウムの吸収促進などの生体調節機能を持つ機能性オリゴ糖として知られている。今回、X線結晶構造解析によって*Ar*FFaseのリガンドなしの構造、および、フルクトースとの複合体構造を決定したので報告する。

【方法と結果】 *Ar*FFaseの粗酵素液の調製は枯草菌による宿主発現系によった。硫安分画、疎水クロマトグラフィによって精製し、結晶化を行った。位相の決定は、既知のGH68に属するレバンスクラーゼの立体構造を用いた分子置換法によって行い、リガンドなしの構造を1.9Å分解能で、フルクトースとの複合体の構造を1.97Å分解能で決定した。

*Ar*FFaseの全体構造は5枚の逆平行β-シートから構成されるβ-プロペラ構造を有していることが分かった。このβ-プロペラ構造はβ-フルクトフラノシダーゼが分類されているGH32およびGH68に共通して見られる構造である。枯草菌由来レバンスクラーゼなどグラム陽性菌が産生するGH68に属する酵素の多くはカルシウム結合部位が存在しているが、グラム陰性菌のGH68の酵素ではカルシウム結合部位の代わりにジスルフィド結合が存在していることが多い。本酵素にはカルシウム結合部位はなく、相当する部位にジスルフィド結合が存在していることが分かった。

*Ar*FFaseの活性中心は*Gluconacetobacter diazotrophicus*由来レバンスクラーゼと高い相同性を有していた。*G. diazotrophicus*レバンスクラーゼの構造において、活性中心と推定される部位には負の電荷を持つ深いポケットがあることが報告されているが、*Ar*FFaseにおいても、β-プロペラ構造の中心に同様の深いポケットが存在し、本部位にフルクトースが結合していることが判明した。

beta-fructofuranosidase, *Arthrobacter* sp. K-1, lactosucrose

講演番号：2C10p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ C校舎10会場

新規加リン酸分解酵素，3-*O*-α-D-グルコシル-L-ラムノースホスホリラーゼの発見

Discovery of a Novel Phosphorylase, 3-*O*-α-D-Glucosyl-L-Rhamnose Phosphorylase

○仁平 高則[1,2]，中井 博之[1,3]，北岡 本光[2]（[1]新潟大・農，[2]農研機構・食総研，[3]新潟大院・自然）
○Takanori Nihira[1,2], Hiroyuki Nakai[1,3], Motomitsu Kitaoka[2] ([1]Niigata Univ., [2]NARO, [3]Niigata Univ.)

【目的】加リン酸分解酵素ホスホリラーゼは，その厳密な基質特異性と反応の可逆性から，オリゴ糖合成に有効な酵素の一つである。しかし既知のホスホリラーゼは17種類のみで，新たな基質特異性を有する新規ホスホリラーゼの発見が強く望まれている。我々はこれまでに，*Clostridium phytofermentans* 由来の2種の新規酵素を含む4種の反転型ホスホリラーゼホモログをクローニングし，それらが示す諸性質について明らかにしてきた[1,2]。本報では，Glycoside hydrolase family 65（GH65）に属するホスホリラーゼホモログ遺伝子*cphy1019* に注目し，クローニングおよび組換え酵素の反応について検討を加えた。

【方法】当該菌由来の*cphy1019* 遺伝子をPCRにて増幅後pET-24aベクターに連結し，大腸菌BL21(DE3)を宿主としたHis-Tag付加の組換えタンパク質Cphy1019を調製した。酵素活性は，ドナー基質としてβ-グルコース1-リン酸，アクセプター基質として各種糖質を酵素に作用させた際に生じるリン酸を定量することにより算出した。

【結果】Cphy1019をリン酸存在下において既知GH65ホスホリラーゼの基質である各種α-グルコ2糖に作用させたところ，いずれの基質に対しても加リン酸分解活性を示さなかった。リン酸非存在下においてβ-グルコース1-リン酸および各種糖質を酵素に作用させたところ，L-ラムノースをアクセプターとした際にのみ合成活性を示した。反応生成物の構造をNMRにて確認したところ，3-*O*-α-D-グルコシル-L-ラムノースであったことから，当該酵素はこれまで報告のなかった新規加リン酸分解酵素3-*O*-α-D-グルコシル-L-ラムノースホスホリラーゼであることが判明した。詳細な諸性質および反応速度論的解析についても報告する。

1. M. Nakajima, M. Nishimoto, M. Kitaoka, *J. Biol. Chem.*, **284**, 19220-19227 (2009).
2. T. Nihira, H. Nakai, K. Chiku, M. Kitaoka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (2011) in press.

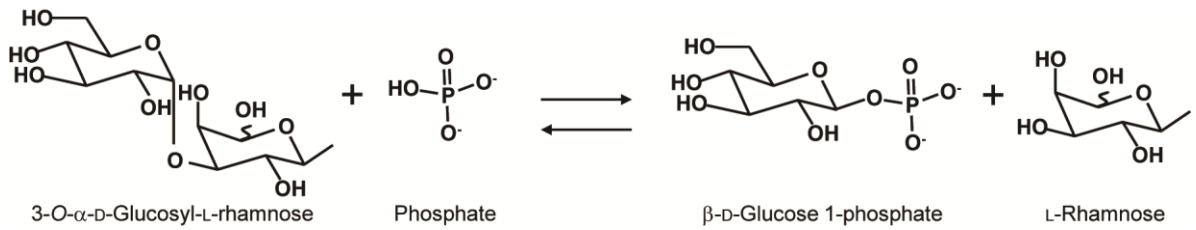


図　3-*O*-α-D-グルコシル-L-ラムノースホスホリラーゼの反応機構

3-*O*-α-D-glucosyl-L-rhamnose phosphorylase, *Clostridium phytofermentans*, glycoside hydrolase family 65

講演番号:2C10p21
講演日時、会場:3月23日17:59～ C校舎10会場

Ruminococcus albus NE1 株由来 cellobiose phosphorylase のアクセプター特異性の改変

Modification of acceptor specificity of cellobiose phosphorylase from *Ruminococcus albus* NE1

○羽村　健、佐分利　亘、森本　奈保喜[1]、森　春英、松井　博和（北大院・農、[1]株式会社 ADEKA）

○Ken Hamura, Wataru Saburi, Naoki Morimoto[1], Haruhide Mori, Hirokazu Matsui (Hokkaido University, [1]ADEKA Co.)

【目的】cellobiose phosphorylase (CP) は cellobiose を α-D-glucopyranosyl phosphate (Glc1*P*) と glucose に加リン酸分解する．反応は可逆的であり，glucose と Glc1*P* から，cellobiose が合成される．この逆反応では，glucose 以外にもいくらかの糖がアクセプターとして働き，グルコシルヘテロオリゴ糖が合成される．しかし，glucose 以外の糖への合成活性は低い．アクセプター特異性の改変は，より多様な糖質の効率合成を可能とすることから，本研究ではアクセプター特異性の改変を目的とした．サブサイト +1 の glucose 残基の 2 位の水酸基と相互作用するアミノ酸残基を置換した変異酵素を作出し，解析した．

【方法】酵素化学的諸性質が明らかな *Ruminococcus albus* NE1 株由来 CP (RaCP) を用いた．*Cellvibrio gilvus* 由来 CP と glucose の複合体の構造をもとに，RaCP の Gln165, Cys485, Tyr648, および Glu654 が サブサイト +1 において glucose の 2 位の水酸基と水素結合していると推定した．これらを置換した，Q165A, Q165N, C485A, Y648A, Y648F, E654A, および, E654D を作出した．部位特異的変異はプライムスター法により導入した．変異酵素は，野生型酵素と同様に，C 末端 His タグタンパク質として大腸菌により生産し，Ni キレーティングクロマトグラフィーにより精製した．変異酵素のアクセプター特異性は，10 mM Glc1*P* および 10 mM の種々の糖質を用いて，無機リン酸の遊離速度により評価した．

【結果】Q165A, Q165N, Y648A, E654A および E654D では, cellobiose 分解活性 (10 mM cellobiose, 10 mM phosphate) が，野生型酵素の 0.1% 未満であったため，以後の解析を行わなかった．一方，C485A および Y648F では，それぞれ野生型酵素の約 35% および 20% の活性であったため，これらのアクセプター特異性を野生型酵素と比較した．C485A では，D-glucose に対する k_{cat}/K_m は 7.3 s^{-1} mM^{-1} であり，野生型酵素の約 8% であった．しかし，D-glucosamine に対する k_{cat}/K_m は，0.58 s^{-1} mM^{-1} であり，野生型酵素と同程度であった．Y648F の D-glucose に対する k_{cat}/K_m は 2.0 s^{-1} mM^{-1} と，野生型酵素の約 2% だったが，D-mannose および，2-deoxy-D-glucose に対しては，それぞれ 0.89 s^{-1} mM^{-1}, 1.4 s^{-1} mM^{-1} で，野生型酵素の約 4 倍高値であった．D-mannose をアクセプターとした時の Y648F による反応生成物は，野生型酵素と同様に，4-*O*-β-D-glucopyranosyl-D-mannose であった．

cellobiose phosphporylase, acceptor specificity, reverse phosphorolytic reaction

講演番号：2J11a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ J校舎11会場

イネ種子に含まれるイネ科植物花粉アレルゲンホモログタンパク質はアレルギー患者 IgEと反応する

Rice seed proteins homologous to Poaceae pollen allergens react with IgE from allergic patients

○平野 可奈[1,2]、日野 真吾[1,3]、大島 健司[1]、岡島 徹也[4]、灘野 大太[1]、宇理須 厚雄[5]、松田 幹[1] ([1]名大院生命農・応用分子生命科、[2]岐阜女子大・健康栄養、[3]静岡大農・応生化、[4]名大院医・生化学第二、[5]藤田保健衛生大・医)

○Kana Hirano[1,2], Shingo Hino[1,3] ,Kenzi Oshima[1], Tetsuya Okajima[4] ,Daita Nadano[1] , Atsuo Uris[5] , Tsukasa Matsuda[1] ([1]Dept. Appl. Mol. Biosci. Grad. Sch. Bioagric.Sci. , Nagoya Univ.、Dept. Heal Nutr, [2]Gifu woman's univ., Facu. Agr., [3]Shizuoka Univ.[4]Dept. Bioche. II Grad. Sch. Med., Nagoya Univ., [5]Dept.Pediatr., Fujita Health Univer.)

【目的】米のアレルギーにおいては、成人における難治性の皮膚炎が報告されているが、即時型症状の誘発は希である。一方、イネ科の雑草・牧草（W/G）の花粉症は広く知られており、近年は開花期におけるイネ花粉症も報告されている。本研究では、米の食物アレルギーにおけるイネ科植物花粉アレルゲンの関与の有無を明らかにすることを目的として、W/G花粉アレルゲンのイネホモログの探索、種子での発現、患者血清IgEとの反応性およびW/G花粉アレルゲンとの免疫交差反応性を解析した。

【方法】アレルゲンデータベースに登録されている既知のW/G花粉アレルゲンのアミノ酸配列情報を用いて、イネのcDNAデーターベースからイネホモログタンパク質cDNAを探索した。相同性が見られた５種のタンパク質を大腸菌発現組換えタンパク質として調製した。組換えタンパク質に対するマウス特異抗体を調製し、免疫ブロットによりイネの花粉、種子における発現を調べた。さらに、組換えタンパク質を抗原として、食物アレルギー患者の血清IgEとの反応性をELISAで解析した。また、イネホモログタンパク質とW/G（チモシーグラス、ホソムギ、カモガヤ）、ブタクサ、およびスギの花粉タンパク質との免疫交差反応性を解析した。

【結果】W/G花粉アレルゲンのイネホモログタンパク質を探索し、β-expansin, Ca^{2+} binding protein, extensin, profilin, polygalacturonaseに相当するcDNAを選択した。組み換えタンパク質に対する特異抗体により、イネの花粉での発現が確認され、さらに種子においても微量ではあるが発現が確認された。食物アレルギー患者血清IgE抗体は、個人差はあるものの、５種のイネホモログタンパク質のいずれとも反応性を示し、β-expansin, extensin, polygalacturonaseに相当するタンパク質と高い反応性を示した。一方、組み換えタンパク質に対する特異抗体を用いた免疫ブロットにより、W/G花粉タンパク質中に、ほぼ同一の分子量のタンパク質が検出され、イネホモログタンパク質とW/G花粉アレルゲンとの免疫交差反応性が示唆された。さらに、一部の抗体はブタクサとスギの花粉タンパク質とも弱い交差反応性を示した。現在、アレルギー患者IgEとの反応性におけるW/G花粉症と穀物アレルギーとの相関を解析している。

food allergy, pollen allergen, cross reactivity

講演番号：2J11a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ J校舎11会場

褐藻ツルアラメ抽出物による抗アレルギー効果

Anti-allergic effect of *Ecklonia stolonifera* extract

○杉浦 義正、田中 竜介、松下映夫（水大校・食品科学）
○Yoshimasa Sugiura, Ryusuke Tanaka, Teruo Matsushita (Natl. Fish. Univ.)

【目的】日本を含めた先進国ではアレルギー患者が年々増加傾向にあり、食品分野でも抗アレルギー性食品の開発が求められている。そこで、我々はこれまでに、食用褐藻サガラメ（*Eisenia arborea*）の由来成分に抗アレルギー性を見出してきた[1), 2)]。更にサガラメ以外の日本産食用褐藻類について、炎症反応に関わる酵素（Lipoxygenase（LOX）、phosopholipase A_2（PLA_2）、hyarulonidase（HA））の活性阻害を調べたところ、褐藻ツルアラメ（*Ecklonia stolonifera*）のフェノール性化合物（フロロタンニン）を含む抽出液に活性を見出した[3)]。今回、ツルアラメのフェノール性化合物以外の成分の抗アレルギー性を評価するため、上記酵素活性の阻害を指標として研究を行った。
【方法】乾物の食用ツルアラメ原料を購入し、電動ミルで乾燥粉末を作成した。その乾燥粉末から、Folch法抽出により脂溶性画分を得た。その脂溶性画分について、Sep-Pak C18カートリッジカラムを使ってクロロフォルム溶出画分（C画分）とメタノール溶出画分（M画分）に分画した。各画分の抗アレルギー性は、大豆由来LOX（SBL）、ブタ由来PLA_2およびウシ由来HAの酵素活性を阻害するかどうか、吸光度法により確認し、酵素活性阻害率を算出することにより評価した。
【結果】ツルアラメのCおよびM画分について、SBL、PLA_2、HA活性阻害を確認したところ、C画分には全く阻害活性がみられなかった。一方、M画分には濃度依存的な阻害活性が認められ、IC_{50}値（mg/mL）はSBL、PLA_2、HA活性それぞれに対して、0.45、0.07、0.22 mg/mLであった。このM画分には色素類など多様な脂溶性物質が含まれていることが考えられ、褐藻ツルアラメの脂溶性成分にも抗アレルギー性のあることが示唆された。フロロタンニン含有抽出物[3)]だけでなく、今回、M画分も効果を示したことにより、ツルアラメは複数の成分によって抗アレルギー性を発揮する有用な抗アレルギー性素材であることが考えられた。現在、ツルアラメM画分について、アレルギー誘導性酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2活性やヒスタミン放出モデル培養細胞、マウス耳介浮腫炎症モデルに対する効果も検討中である。引き続き、M画分に含まれる有効成分について、探索を進める予定である。

1) *Fish. Sci.*, **74**, 180, 2008. 2) *J. Func. Foods*, **1**, 387, 2009. 3) *Food Sci. Technol. Res.*, in press.

Ecklonia stolonifera, anti-allergy, inflammation

講演番号：2J11a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ J校舎11会場

グルコースがマスト細胞の活性化に及ぼす影響

Effect of glucose on mast cell activation

○永井 寛治[1,2]、福島 達伸[2]、大池 秀明[1]、小堀 真珠子[1] ([1]農研機構 食総研、[2]三菱レイヨン)
○ Nagai Kanji[1,2], Fukushima Tatsunobu[2], Oike Hideaki[1], Kobori Masuko[1] ([1]NARO FRI, [2]Mistubishi Rayon)

【目的】ここ数十年間、アレルギーと肥満はそれぞれ増加傾向にある。疫学研究において肥満はアレルギー疾患のリスクファクターになる可能性が示されているが、まだ結論には至っていない。肥満は高カロリーな食事を取り続けることで進行する。そして肥満がインシュリン抵抗性を引き起こし、高血糖、高血圧、脂質異常症といったメタボリックシンドロームに陥ってしまう。そこで肥満によるアレルギー疾患への影響を明らかにするため、肥満によって引き起こされる高血糖に着目し、アレルギー疾患の中心的な役割を示すマスト細胞がグルコース濃度の高い培地でマスト細胞の活性化を惹起するかどうかを検討した。
【方法】ヒトマスト細胞株の HMC-1 細胞及び LAD2 細胞を用いて低濃度(5.5 mM)及び高濃度(25.0 mM)グルコース含有DMEM培地でそれぞれ2日間培養した。HMC-1細胞は培養後にフローサイトメーターを用いて細胞内活性酸素種(ROS)の量及び real time RT-PCR 法により炎症性サイトカインの発現を測定した。HMC-1 細胞は Fc ε RI 受容体を欠損してため、LAD2 細胞を用いて IgE 抗体・抗原刺激時のグルコースが及ぼす影響について検討した。各濃度のグルコース含有培地中で IgE 抗体/抗原刺激した LAD2 細胞はβ-ヘキソサミニダーゼ(β-hex)を指標とした比色法により脱顆粒を、また ELISA 法により TNFαの産出を測定した。
【結果】高濃度グルコース培地で培養したHMC-1細胞は低濃度グルコース培地で培養したものと比較して細胞内のROS産出量が増加した。また同様にTNFα, IL-1β, IL-6といった炎症性サイトカインの発現量も増加した。IgE抗体/抗原刺激したLAD2細胞の脱顆粒の割合はグルコースの濃度間で変化が認められなかった。しかし高濃度グルコース含有培地で培養することで細胞内のβ-hexの活性は増加しており、IgE抗体・抗原刺激による脱顆粒で放出された上清中のβ-hexの活性も増加していた。また高濃度グルコース含有培地で培養したLAD2細胞にIgE抗体/抗原刺激したところTNFαの産出量が低濃度グルコースと比較して増加した。これらの結果は肥満時の高血糖がマスト細胞の活性化を惹起することで、アレルギー疾患に悪影響を与えることが示唆される。また現在、高濃度グルコースによるマスト細胞の活性化についてMAPKやNF-κB経路といったシグナル伝達経路の活性化について検討中である。

Mast cell, Glucose, Allergy

講演番号：2J11a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ J校舎11会場

食品抗原によって誘導される免疫応答に腸内共生菌が与える影響

Intestinal commensal bacteria modulate immune response induced by food antigen

○浜本 雄次、細野 朗、鴨井 大樹、津田 真人、八村 敏志[1]、百瀬 愛佳[2]、平山 和弘[2]、伊藤 喜久治[2]、高橋 恭子、上野川 修一（日大生資科・食品生命、[1]東大院農生科・食の安全研究セ、[2]東大院農生科・獣医）

○Yuji Hamamoto, Akira Hosono, Daiki Kamoi, Masato Tsuda, Satoshi Hachimura[1], Yoshika Momose[2], Kazuhiro Hirayama[2], Kikuji Itoh[2], Kyoko Takahashi, Shuichi Kaminogawa (Department of Food Bioscience and Biotechnology, Nihon University, [1]Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo, [2]Department of Veterinary Public Health, Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo)

【目的】腸内共生菌の存在は経口免疫寛容の誘導に重要であると考えらえているが、定着する腸内共生菌の違いによって食品抗原に対する免疫応答がどのように作用するのかはほとんど明らかになっていない。本研究は、経口摂取した食品抗原に対して食品アレルギー様の免疫応答を誘発するモデルマウスを用い、マウスに単独定着させた腸内共生菌種による宿主の免疫応答への影響をin vivoで検討することを目的とした。
【方法】卵白アルブミン(OVA)特異的なT細胞受容体を高発現するトランスジェニックマウス(OVA23-3マウス)の無菌(GF)マウスに、マウス腸内共生菌由来のグラム陽性菌*Lactobacillus johnsonii* 129(LJ)またはグラム陰性菌*Bacteroides acidifaciens* type A43(BA)を単独定着させたノトバイオートマウスを作製した。GF、LJ、BAマウスおよび通常腸内細菌(CV)マウスに対して卵白含有飼料、または対照としてカゼイン含有飼料を4週間経口摂取させ、血中抗体価に与える影響を検討した。また卵白含有飼料を1週間経口摂取させたときの脾臓細胞(SP)、腸間膜リンパ節細胞(MLN)、小腸パイエル板細胞(PP)中のT細胞フェノタイプについて、免疫抑制に関わる分子の発現をフローサイトメトリーにより解析し、各細胞のOVA抗原との共培養によるサイトカイン産生に与える影響を検討した。
【結果】BAマウスのOVA特異的IgG2a抗体価はLJマウスと比較して有意に高く、総IgE量、OVA特異的IgE、IgG1抗体価においても高い傾向がみられた。このときのLJマウスの血中抗体価はCVマウスに近いパターンが観察された。また、BAマウスはLJマウスと比較して、PPにおいてCD4$^+$細胞中の感作型T細胞であるCD45RB^{low}細胞の割合が高い一方で、抑制型T細胞であるCTLA-4$^+$細胞およびFoxp3$^+$細胞の割合が低い傾向がみられた。さらに、SP、MLNおよびPPにおけるサイトカイン産生パターンはLJマウスとBAマウスでは異なる特徴がみられた。以上より、腸内に共生する菌の違いは経口摂取した食品抗原によって誘導される血中抗体価やT細胞応答についても異なる免疫応答がみられることが明らかとなり、宿主の食品アレルギー反応は定着した腸内共生菌種によって強く影響を受けることが考えられた。

Bacteroides, *Lactobacillus*, food allergy

講演番号：2J11a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ J校舎11会場

テリマグランジンのケミカルメディエーター放出抑制作用

Inhibitory Effect of Tellimagrandins on Chemical Mediator Release from Mast Cells

○高杉美佳子、高谷祐介[1]、宇都宮紋、甲斐友絵、山岸喬[1]、新井博文[1]（九産大・工、[1]北見工業大）
○Mikako Takasugi, Yusuke Takaya[1], Aya Utsunomiya, Tomoe Kai, Takashi Yamagishi[1], Hirofumi Arai[1] (Kyusandai, [1]Kitamikougyoudai)

【目的】ハマナス（*Rosa rugosa*）は、東アジアの海岸沿いに生息するバラ科植物で、その花弁はハーブティーなどに用いられている。ハマナス花弁は、テリマグランジンIやテリマグランジンII（オイゲニイン）などのポリフェノールを多く含んでおり、様々な生理活性が期待できる。そこで本研究では、ハマナス花弁抽出物およびテリマグランジンによるマスト細胞からのヒスタミン放出抑制作用を*in vitro*で検討し、抗アレルギー活性を評価した。また、マスト細胞は刺激を受けると細胞内Ca^{2+}濃度が上昇した後にヒスタミンを放出する。そこで、マスト細胞内Ca^{2+}濃度の上昇に及ぼすテリマグランジンIの影響についても検討した。
【方法】乾燥ハマナス花弁の水抽出物および水/エタノール（50:50, v/v）抽出物を調製した。ラット好塩基球性白血病細胞（RBL-2H3）にハマナス花弁抽出物またはテリマグランジンを添加して 10 分間プレインキュベーションを行い、カルシウムイオノフォア（A23187）または抗原-IgE 刺激により放出されたヒスタミン量を HPLC で測定した。また、カルシウムの蛍光プローブ Fluo-8 AM をあらかじめ RBL-2H3 に封入し、テリマグランジン I 存在下でカルシウムイオノフォア刺激を行った時の細胞内 Ca^{2+}濃度の変化を蛍光光度計で測定した。
【結果】ハマナス花弁抽出物は、カルシウムイオノフォアまたは抗原-IgE刺激によるRBL-2H3からのヒスタミン放出に対して、どちらも終濃度100ー400 μg/mlで濃度依存的に抑制活性を示した。また、水抽出物よりも水/エタノール抽出物の方がより強い活性を示す傾向にあった。テリマグランジンIおよびテリマグランジンIIは、カルシウムイオノフォアA23187刺激におけるRBL-2H3細胞からのヒスタミン放出に対して、終濃度10ー40 μMで濃度依存的に極めて強い抑制作用を示した。さらに、テリマグランジンIは、カルシウムイオノフォア刺激によるRBL-2H3の細胞内Ca^{2+}濃度上昇には影響を及ぼさなかった。これらの結果は、ハマナス花弁に含まれるテリマグランジンが主に細胞内Ca^{2+}濃度の上昇以降のシグナル伝達に作用することによって抗アレルギー作用を発揮する可能性を示唆している。

allergy, Rugosa rose, polyphenol

講演番号：2J11a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ J校舎11会場

人乳ラクトフェリンから派生する lactomedin-2 (CFQWQR) の抗不安作用

Anxiolytic activity of lactomedin-2 (CFQWQR) derived from human lactoferrin.

○園田壮司、吉川正明（生産開発科学研究所）
○Soushi Sonoda, Masaaki Yoshikawa (Reseach Institute for Production Development)

【目的】人乳ラクトフェリンのトリプシン消化物から回腸収縮活性を指標として単離した2種類のペプチドFKDCHLAR (lactomedin-1)および CFQWQR (lactomedin-2) のうち、lactomedin-1 が抗不安作用を示すことを以前見出した。今回、lactomedin-2 が同様の作用を示すのかどうか検討した。
【方法・結果】抗不安作用は、4週齢の雄性ddyマウスを用いた高架式十字迷路実験により評価した。lactomedin-2は、観察開始の20分前に脳室内投与した。実験開始後、オープンアーム、クローズドアーム、それぞれにおける滞在時間および侵入回数を5分間にわたり観察した。lactmedin-2は、脳室内投与 (0.1 nmol)の際に、オープンアームへの滞在時間および侵入回数を有意に増加させたことから、抗不安作用を示すことがわかった。なお、両アームへの合計侵入回数に増減が認められなかったことから、本ペプチドは自発行動量には影響しないことがわかった。lactomedin-2はバソプレシン関連ペプチドと部分的にホモロジーを示し、レセプター結合試験においてバソプレシンレセプターに親和性を示すことがわかった。lactomedin-2 の抗不安作用機構については検討中である。

peptide, lactoferrin, anxiolytic activity

講演番号：2J11a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ J校舎11会場

新しい抗うつペプチド Tyr-Leu

Novel antidepressant peptide, Tyr-Leu

○水重　貴文、大日向　耕作（京大院農・食品生物）
○Takafumi Mizushige, Kousaku Ohinata (Kyotodai)

【目的】近年、我が国のうつ病などの精神疾患数は増加し、従来の４疾病（がん、脳卒中、急性心筋梗塞、糖尿病）よりも多い。2011年7月、新たに精神疾患を加え５疾病とし、重点的に対策に取り組む方針が示されている。これまで我々は、ジペプチドTyr-Leu（YL）が抗不安薬ジアゼパムに匹敵する強力な抗不安作用を示すことを見出し、本ペプチドが神経系に対して作用することが明らかとなった[1]。さらに本研究ではYLが抗うつ作用を示すかを検討した。なお、精神疾患の中で最もうつ患者数が多く、新しい作用機構に基づく抗うつ素材が期待されている。
【方法】実験動物としてddY雄性マウス(24-27 g)を用いた。抗うつ作用は強制水泳試験で評価した。円筒形のガラス容器に水（25℃）を入れ、その中でマウスを遊泳させ、行動をSUPERMEX（室町機械）で測定し、無動時間の減少により抗うつ活性を評価した。ペプチドサンプルを腹腔内投与し30分後に強制水泳試験を開始した。さらに、抗うつ作用に関与するメディエーターを検討するために、各種アンタゴニストとYLを同時に腹腔内投与し、強制水泳試験を行った。
【結果】YL（10-30 mg/kg）の腹腔内投与により無動時間が投与量依存的に減少したことから、YLには抗うつ作用があることが明らかとなった。なお、抗うつ薬のイミプラミン（30 mg/kg）の腹腔内投与により無動時間が有意に減少することから、YLはイミプラミンに匹敵する抗うつ作用を示すことがわかった。YLの抗うつ作用は、セロトニン5-HT_{1A}受容体アンタゴニスト（WAY10035）、ドーパミンD_1受容体アンタゴニスト（SCH23390）および$GABA_A$受容体アンタゴニスト（Bicuculline）のいずれの投与によっても消失することが判明した。各アンタゴニストの単独投与による無動時間への影響は認められなかった。また、YL自身はいずれの受容体にも親和性を示さないことから、YLの抗うつ作用には、内因性のセロトニン、ドーパミン、およびGABA放出、ならびにそれぞれの受容体活性化を介することが明らかとなった。なお、この作用機構はYLの強力な抗不安作用と共通である。

YLの新たな生理機能として抗うつ作用を見出した。YLは抗うつ作用および抗不安作用を併せ持ち、いずれもセロトニン、ドーパミン、GABA放出を介した作用であることが明らかとなった。

(1) Kanegawa N, Suzuki C, Ohinata K. Dipeptide Tyr-Leu (YL) exhibits anxiolytic-like activity after oral administration via activating serotonin 5-HT_{1A}, dopamine D_1 and $GABA_A$ receptors in mice. FEBS Lett. 2010;584(3):599-604.

peptide, depression, neurotransmitter

講演番号：2J11a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ J校舎11会場

酵素的に消化された抗原の経口投与は食品アレルギーを抑制する。

Oral administration of enzymatically-digested antigen inhibits food allergy.

○大竹　愛、服部　誠、後藤　真生[1]、石川（高野）祐子[1]、好田　正（東農工大農・応生化、[1]食総研）

○Ai Ohtake, Makoto Hattori, Masao Goto[1], Yuko Ishikawa-Takano[1], Tadashi Yoshida (Departoment of Applied Biological Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology, [1]Food Research Institute)

【目的】食品アレルギーは、食品に対して免疫系が不応答になる現象である経口免疫寛容の破綻によって起きる疾患であると考えられている。一方で、経口免疫寛容が食品アレルギーの発症を抑制していることは未だ実証されていない。そこで本研究では食品アレルギーモデルマウスに抗原を経口摂取させて、あらかじめ経口免疫寛容を誘導することで、その後に誘導される食品アレルギー症状を抑制できるかを検討した。

【方法】オボアルブミン（OVA）323-339残基に特異的なT細胞受容体（TCR）を高頻度に発現するTCRトランスジェニックマウスであるDO11.10マウスに、トリプシン分解によって得たペプチド化OVA（pOVA）あるいはintactなOVAを1日おきに計4回強制胃内投与した。1回の投与量は100 mgとした。最終胃内投与から2日後、脾臓細胞を調製し100 μg/mLのOVAで刺激した。培養開始から48時間後に脾臓細胞の抗原特異的増殖活性を測定した。また、DO11.10マウスに同様に計4回pOVAあるいはintactなOVAを強制胃内投与してから10日後、20%のOVAを含有する飼料を10日間自由摂食させた。飼料を与えてから7, 10日目に採血を行い、血清中のOVA特異的IgEをELISA法で測定し、食品アレルギーの指標とした。

【結果】pOVAあるいはintactなOVAを強制胃内投与したDO11.10マウスの脾臓細胞は、対照としてPBSを投与した群と比べて抗原特異的細胞増殖が有意に抑制された。両群の抑制は同程度であった。この結果よりpOVAあるいはintactなOVAの胃内投与によりT細胞レベルでは経口免疫寛容が成立したと考えられた。また、pOVAあるいはintactなOVAを胃内投与した後に20%OVA含有飼料を摂食させたところ、pOVA投与群の血清中OVA特異的IgEは摂食開始から7，10日目のいずれにおいても対照群より有意に低かった。一方intactなOVAを投与した群では、摂食開始から7日目および10日目いずれにおいても対照群と同程度のIgEの誘導を示した。

【考察】ペプチド化した抗原とintactな抗原はいずれも胃内投与により経口免疫寛容を誘導できることが確認できた。しかしながらペプチド化抗原の事前投与のみが食品アレルギーの誘導を抑制し、intactな抗原は抑制できなかったことから、intactな抗原による経口免疫寛容はその成立する過程において一時的にT細胞、およびB細胞の活性化を誘導してしまう可能性が考えられる。

【結論】経口免疫寛容によって食品アレルギーが抑制される事が示された。

Food allergy, IgE, Oral tolerance

講演番号：2J11a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ J校舎11会場

イチゴGAPDHによるIgE抗体産生の抑制

Suppression of IgE production by strawberry GAPDH

○ 岩元 彬、井上 愛子[1]、加藤 珠樹、井上 祐一[1]、川原 浩治[1]（九工大・生命体工、[1]北九州高専・細胞工学センター）

○ Akira Iwamoto, Aiko Inoue[1], Tamaki Kato, Yuichi Inoue[1], Hiroharu Kawahara[1] (KIT, [1]KCT)

【目的】我々はこれまでに特定品種のイチゴ抽出物が*in vitro*でヒト末梢血リンパ球のIgE抗体産生を抑制するだけでなく、アトピー性皮膚炎モデルマウスのアトピー症状も緩和することを明らかにしてきた。また、IgE抗体産生抑制活性を指標として抗アレルギー因子をイチゴ抽出物から精製し、プロテインシーケンスした結果、その一つがGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）であることを明らかにした。そこで本研究では、イチゴGAPDHのIgE抗体産生抑制における各過程（抗原提示、Th2細胞分化、IgE抗体クラススイッチ）への影響について調べた。

【方法】イチゴ可食部をPBSでホモジナイズし、遠心分離した可溶性画分を陽イオン交換カラムTOYOPEAL SP-550Cで分離・精製したGAPDHを実験に使用した。免疫細胞の抗原提示への影響は、ホルボール 12-ミリステート 13-アセテートで分化誘導したヒト単芽球細胞株U937を用いて、その細胞表面上におけるスギ花粉抗原Cry j1の提示をフローサイトメーターにより解析した。Th2細胞分化への影響を検討するため、ヒトT細胞株MOLT-4を用いて、Th2細胞分化のマスター遺伝子であるGATA-3の発現量をReal time PCRにより測定した。IgE抗体クラススイッチへの影響は、ヒト成熟B細胞株DND39を用いて、IgE抗体クラススイッチの指標であるIgE重鎖胚型転写物（εGT）の発現量をReal time PCRにより比較した。最後に、目的である免疫の各段階に対して、評価、検討を行った。

【結果】イチゴGAPDHはU937細胞株におけるCry j1抗原提示やMOLT-4細胞株におけるGATA-3発現を抑制せず、DND39細胞株におけるεGT発現のみを抑制した。したがって、イチゴGAPDHによるIgE抗体産生の抑制は、IgEクラススイッチの過程を抑制していると考えられた。また、イチゴ抽出物ではIgEクラススイッチだけでなく、抗原提示やGATA-3発現を抑制することから、イチゴにはGAPDH以外にもIgE抗体産生を抑制する成分を含んでいることが示唆された。本研究は、GAPDHのアレルギー抑制に関する新たな機能を示唆するものであり、IgE抗体産生の抑制を標的としたアレルギー症状の緩和食品や医薬などの開発につながるものと考えられる。

GAPDH, IgE, Strawberry

講演番号：2J11a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ J校舎11会場

牛乳β-lactoglobulin由来の新しい精神的ストレス緩和ペプチド

Novel anxiolytic peptide derived from bovine β-lactoglobulin

○山田 絢子、大日向 耕作（京大院・農・食品生物）
○Ayako Yamada, Kousaku Ohinata (Kyoto Univ.)

【目的】 過度の精神的ストレスは精神疾患の発症を惹起するだけではなく、生活習慣病の発症リスクを高めることから、これを緩和する機能性素材が期待されている。本研究では主要な牛乳タンパク質β-lactoglobulinの酵素消化により生成するストレス緩和（抗不安)ペプチドを新たに見出したので報告する。
【方法】β-lactoglobulin水溶液（20 mg/ml）に各種酵素（E:S=1:100）を添加し、37℃で5時間インキュベートし、酵素消化物を得た。これらの情動調節に及ぼす影響を高架式十字迷路試験およびオープンフィールド試験により検討した。実験動物は雄性ddY系マウス（21-28 g）を用い、投与30分後に試験を開始し、5分間その行動を観察した。高架式十字迷路試験では、壁のあるクローズドアームと壁のないオープンアームからなる高さ50 cmの十字の迷路を使用し、オープンアームでの滞在時間の割合の増加により抗不安活性を評価した。オープンフィールド試験では、高さ50 cmの壁で覆われた直径60 cmの円形（25区画）の装置を用い、中央円での探索行動の増加で評価した。なお、酵素消化物は逆相HPLCで分画し、各フラクションの抗不安活性を測定した。活性が認められたフラクションのペプチドをプロテインシーケンサーと質量分析計で同定し、その配列に基づき化学合成したものについて、さらに抗不安活性を検討した。
【結果】 牛乳β-lactoglobulinのthermolysin消化物を腹腔内投与（100 mg/kg）したところ、高架式十字迷路のオープンアームの滞在時間の割合が増加し、抗不安作用を示すことが明らかとなった。なお、subtilisin消化物では、このような活性は認められなかった。抗不安活性を示したthermolysin消化物を逆相HPLCにより6フラクションに分画した。その中で最も保持時間の短いフラクションAが強い抗不安活性を示すことがわかった。フラクションAに含まれるペプチドを同定し化学合成した。その中で、ジペプチドMet-His (MH) の腹腔内投与により高架式十字迷路試験でのオープンアームへの滞在時間の割合が有意に増加することが判明し、抗不安作用を示すことを初めて見出した。さらに、MHは経口投与でも抗不安作用を示すことが明らかとなり、その最小有効用量は1 mg/kgであった。また、オープンフィールド試験においても、MH投与（0.1 mg/kg, i.p.）によって中心円の滞在時間が増加する傾向が認められたことから、複数の評価系において強力な抗不安作用を示すものと考えられる。
　以上、牛乳β-lactoglobulinのthermolysin消化物が抗不安活性を示すこと、ならびに、本消化物から見出した経口投与で有効なジペプチドMHが強力な抗不安活性を示すこと、を新たに発見した。

β-lactoglobulin, peptide, anxiolytic activity

講演番号：2J11a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ J校舎11会場

タイトル　TCRトランスジェニックマウスを用いた食物アレルギーのアレルゲン由来ペプチドによる抑制法および皮膚炎モデルの検討

Title Investigation of suppression of food allergy with allergen derived peptide and skin inflammation model using TCR transgenic mice.

○平出　恵利華[1,2]、足立（中嶋）　はるよ[2]、武山　純[2]、上滝　隆太郎[1,2]、塩河　亜弥[1,2]、北村　紀子[3]、佐伯　真弓[3]、西村　友枝[3]、神沼　修[3]、廣井　隆親[3]、八村　敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]東京都医学総合研・花粉症プロ）

○ Erika Hiraide[1,2], Haruyo Nakajima-Adachi[2], Jun Takeyama[2], Ryutaro Koutaki[1,2], Aya Shiokawa[1,2], Noriko Kitamura[3], Mayumi Saeki[3], Tomoe Nishimura[3], Osamu Kaminuma[3], Takachika Hiroi[3], Satoshi Hachimura[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. [2]Tokyo, Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [3]Pollen Allergy Proj., Tokyo Metropol. Inst. Med. Sci.)

【目的】食物アレルギーの有病率は年々増加傾向にある。近年、その治療法として、アレルゲン由来ペプチド等を用いた経口免疫療法が注目されている。本研究では、卵白アルブミン(OVA)の323-339残基に特異的なTCRトランスジェニックマウスであるOVA23-3マウスとOVA323-339ペプチドを用いて、食物アレルギーの抑制法の検討を行った。このOVA23-3マウスは、卵白食の自由摂取のみで血中IgE抗体量の上昇や、腸炎症を起こす有用な食物アレルギーモデルである。しかし、食物アレルギーで最も多い症状とされる皮膚炎症を起こすかは不明である。そこで、さらにOVA23-3マウスが食物アレルギー性の皮膚炎症を起こすモデルであるか検討した。

【方法】OVA23-3マウスにOVA323-339ペプチドを1週間で3回胃内投与した後、7日間卵白食を自由摂取させた（事前投与）。また、同じ投与期間で卵白食を自由摂取させた後、OVAペプチドを胃内投与した（事後投与）。投与終了後、脾臓細胞からMACS法により$CD4^+$T 細胞を分離した。抗原提示細胞およびOVA323-339ペプチドと共に培養し、ELISA法によりサイトカイン量を測定した。また、皮膚炎症の有無を検討するために、OVA23-3マウスに卵白食を与えた後、OVA抗原を浸み込ませた脱脂綿をマウスの皮膚に48時間接触させた。その後、脱脂綿から浸潤した細胞を回収し、産生されたサイトカインをELISA法で測定した。

【結果】OVA323-339ペプチドを卵白食摂取の前、後いずれに投与した場合も、IL-4産生量の上昇が抑制された。特に、OVA323-339ペプチドを事後投与すると、卵白食摂取により上昇したIL-4産生が顕著に抑制された。この結果から、食物抗原由来ペプチドによる食物アレルギーの治療効果が期待できると考えられた。また、OVA23-3マウスの皮膚炎症の検討では、浸潤した細胞からIL-4およびIL-5の分泌が確認され、OVA23-3マウスでTh2型の食物アレルギー性皮膚炎症が起こる可能性が示唆された。現在、皮膚組織について検討中である。

food allergy, skin inflammation

講演番号：2J11a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ J校舎11会場

TCRトランスジェニックマウスモデルを用いた食物アレルギーと制御性T細胞の関係の解析

Analysis of the relation between food allergy and regulatory T cells using a TCR transgenic mouse model

○芝原恭子[1,2]、足立(中嶋)はるよ[2]、塩河亜弥[1,2]、村上仁[3]、津田真人[3]、若月芳雄[4]、細野朗[3]、上野川修一[3]、八村敏志[1,2]([1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]日大生資科・食品生命、[4]京大医)

○ Kyoko Shibahara[1,2], Haruyo Nakajima-Adachi[2], Aya Shiokawa[1,2], Hitoshi Murakami[3], Masato Tsuda[3], Yoshio Wakatsuki[4], Akira Hosono[3], Shuichi Kaminogawa[3], Satoshi Hachimura[1,2]([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [3]Dept. Food Bioscience Biotechnol., Nihon Univ., [4]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

【目的】制御性 T 細胞は免疫抑制活性を有しており、食物アレルギーの抑制機構として知られる経口免疫寛容の誘導に重要な役割を担うと考えられている。Rag2$^{-/-}$DO11.10 マウスと Rag2$^{-/-}$OVA23-3 マウスは、卵白アルブミン(OVA)特異的な TCR が高発現するトランスジェニックマウスであり、前者では卵白食の経口投与後速やかに経口免疫寛容が誘導されるのに対し、後者ではアレルギー性小腸炎症状を示すことが知られている。本研究ではこれら二種類のマウスを用い制御性 T 細胞の誘導を比較することで、食物アレルギーとアレルゲン特異的制御性 T 細胞の関係を解析することを目的とした。

【方法】Rag2$^{-/-}$DO11.10 マウスと Rag2$^{-/-}$OVA23-3 マウスに卵白食を与え、脾臓および腸間膜リンパ節における CD4^{+}T 細胞中の Foxp3 発現量の発現を比較した。また、両マウスの CD11c^{+}樹状細胞(DC)を抗原と TGF-β の存在下で Rag2$^{-/-}$DO11.10 マウス由来 naïveCD4^{+}T 細胞と共培養し、Foxp3 の発現量を解析した。さらに、DC と Rag2$^{-/-}$DO11.10 naïveCD4^{+}T 細胞の培養系に、Rag2$^{-/-}$OVA23-3 マウス由来 CD4^{+}T 細胞、またはその培養上清を添加し、Foxp3 発現への影響を検討した。

【結果】卵白食を Rag2$^{-/-}$DO11.10 マウスに投与すると CD4^{+}T 細胞に Foxp3 の発現が観察されるが、Rag2$^{-/-}$OVA23-3 マウスでは発現が観察されなかった。このことより、Foxp3^{+}制御性 T 細胞誘導の違いが両マウスにおける経口免疫寛容誘導、アレルギー症状発現の差に関与する可能性が示唆された。一方で、両マウスの DC を Rag2$^{-/-}$DO11.10 naiveCD4^{+}T 細胞と抗原、TGF-β の存在下で in vitro において培養を行ったところ、同等な Foxp3 の発現が確認された。そこで、DC と CD4^{+}T 細胞の培養系に、卵白食を投与した Rag2$^{-/-}$OVA23-3 マウス由来 CD4^{+}T 細胞またはその培養上清を添加して培養すると、Foxp3 発現量の低下が認められた。卵白食を投与した Rag2$^{-/-}$OVA23-3 マウス由来 CD4^{+}T 細胞は IL-4 を高産生することが確認されているため、この培養系にさらに抗 IL-4 抗体を添加したところ Foxp3 の発現低下が阻害された。以上の結果から、卵白食投与時に Rag2$^{-/-}$OVA23-3 マウスの CD4^{+}T 細胞中に Foxp3 が発現しないことは、抗原に感作された CD4^{+}T 細胞による IL-4 高産生が一因である可能性が示された。

Food Allergy, Regulatory T cell, Foxp3

講演番号:2J11a13
講演日時、会場:3月23日11:32～ J校舎11会場

ピーナッツおよびソバアレルゲンのIgE結合交叉性エピトープの解析

Elucidation of cross rective IgE-binding epitope of peanut and buckwheat

○勝山 真多、岡田 晋治、小林 彰子、田辺 創一[1]、(東大院農生科・応生化、[1]広島大院生物圏科学・生物機能開発)

○Shinta Katsuyama, Shinji Okada, Shoko Kobayashi, and Soichi Tanabe[1] (Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [1]Dept. Biof. Sch. Tec., Grad. Sch. Bios. Sci., Hiroshima Univ.)

【目的】ソバおよびピーナッツは少量の摂取でアナフィラキシーショックを起こす深刻な食物アレルゲンである。しかし、臨床試験の難しさからアナフィラキシーの原因は未だに解明されていない。両食物により同様の症状が引き起こされるため、食物抗原側に存在すると予想される共通エピトープ構造を明らかにすることが、アナフィラキシー解明の糸口に繋がることが期待された。我々はこれまでに、ソバアレルゲンと交叉性を示すピーナッツアレルゲンのIgE結合エピトープ構造を明らかにした[1)]。本研究では、ソバのトランスクリプトーム配列データに対する相同性検索により、ピーナッツアレルゲンと交差性を示す候補エピトープを見出したので報告する。
【方法および結果】ピーナッツアレルギー患者血清を用いたELISAでは、患者IgEはピーナッツおよびソバ抗原共に陽性を示した。Inhibition ELISAにおいて、ソバタンパク質キモトリプシン水解物のペプチド画分はピーナッツアレルゲンーIgE結合を阻害したのに対し、卵白由来ペプチドを用いた同様の検討では阻害が見られなかったことから、交差反応はピーナッツとソバに特異的であると考えられた。ピーナッツタンパク質水解物のペプチド画分を逆相 HPLC に供し、交叉ピークを精製・単離した。N末端アミノ酸解析および LCMS-IT-TOF の結果から、交叉ペプチド配列を"SDQTRTGY"と決定した。この配列はピーナッツタンパク質oleosin 3のN末端付近の配列と一致した。合成した本ペプチドはInhibition ELISAにて、用いた8人すべての患者血清に対しIgE 結合性を示した。ソバのoleosin遺伝子は同定されていなかったため、NCBI nr databaseに登録されているソバタンパク質に対しBLASTP検索を行い、このエピトープ様の配列を持つソバタンパク質を探索したが、"SDQTRTGY"配列とは最大4残基一致する配列しか見つからなかった。Logachevaら[2)] は、次世代シークエンサーによりソバ花弁のトランスクリプトーム解析している。そこで、このトランスクリプトーム配列データに対しTBLASTN検索を行った。"SDQTRTGY"の8残基中6残基以上が一致する配列が27個見つかった。このうち、BLASTX検索により逆ストランドが別の遺伝子をコードすると考えられるもの6個を除き、21配列が候補として残った。この候補中にはoleosinオーソログは含まれていなかった。候補のうちで"SDQTRTGY"配列との一致度が最も高いのは7/8残基が一致するGAA4HQR01AQ413であった。GAA4HQR01AQ413と類似しているタンパク質は知られていないが、この配列を含め、候補として残る21配列がコードするタンパク質のうち、どれかが交差アレルゲンとなっている可能性が考えられた。

1) 第60回日本栄養食糧学会講演要旨集p42 (2006). 2) BMC Genomics 2011, 1471-2164.

peanut, buckwheat, allergen

講演番号：2J11a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ J校舎11会場

腸内共生菌による転写因子 C/EBPαを介したマスト細胞の機能制御

Role of C/EBPα in functional regulation of mast cells by commensal bacteria

○笠倉　和巳、高橋　恭子、布村　聡[1]、羅　智靖[1]、細野　朗、上野川　修一（日大・生資科、[1]日大・医）

○Kazumi Kasakura, Kyoko Takahashi, Satoshi Nunomura[1], Chisei Ra[1], Akira Hosono, Shuichi Kaminogawa (College of Bioresource Sciences, Nihon University, [1]Nihon University Graduate School of Medical Science)

【背景・目的】マスト細胞はアレルギー炎症のエフェクター細胞として広く知られるが、本来の生理的役割は感染防御であるといわれており、二つの機能を併せ持つ。特に腸管は食物アレルギーの引き金となるアレルゲンが吸収される場である一方、病原菌が侵入してくる場でもあるため、腸管粘膜マスト細胞の二つの機能のバランスが重要であると考えられる。一方、腸管には大量の腸内共生菌が生息しており生体の恒常性維持に寄与している。血中から腸管組織に到達したマスト細胞は、腸管組織にて終末分化を遂げることから、腸内共生菌が腸管におけるマスト細胞の終末分化過程に作用し、マスト細胞の機能を制御する可能性が考えられる。昨年度大会でマスト細胞のin vitro分化系において*Lactobacillus casei* JCM1134(LA)で刺激することで顆粒形成、IgE/抗原刺激による脱顆粒応答がそれぞれMyD88依存的及び非依存的に抑制されること、さらに転写因子C/EBPαの発現がLA刺激によりMyD88依存的に上昇することを報告した。そこで、本研究では腸内共生菌によるマスト細胞の機能制御におけるC/EBPαの役割を明らかにすることを目的とした。【方法】マウス骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)にウイルス発現系を用いてC/EBPαを誘導的に過剰発現させた。β-hexosaminidase放出量を指標にIgE/抗原刺激による脱顆粒応答、トルイジンブルー染色により顆粒形成を測定し、マスト細胞のアレルギー炎症におけるエフェクター機能に及ぼす効果を評価した。さらに、微生物刺激に対するケモカイン(MIP-2)産生をELISAにより測定し、マスト細胞の感染防御機能に及ぼす効果を評価した。【結果・考察】C/EBPαの発現上昇に伴い、BMMCの顆粒形成が抑制された。一方、脱顆粒応答に変化はみられず、LAによる脱顆粒応答の抑制にはC/EBPα以外の因子が関与していることが示唆された。これらの結果は、LAによる効果のMyD88依存性の相違を反映していた。また、C/EBPαの発現上昇に伴い微生物刺激に対するMIP-2産生が亢進していた。以上をまとめると腸内共生菌の刺激によりマスト細胞のアレルギー炎症のエフェクター機能が抑制され、感染防御機能が増強すること、また、その作用の一部はC/EBPαを介することが示唆された。

mast cell, commensal bacteria, C/EBPα

講演番号：2J11a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ J校舎11会場

マウス腸管上皮における Tollip mRNA およびタンパクの発現解析

Messenger RNA and protein expression of Tollip in intestinal epithelium

○杉　由高、高橋　恭子、栗原　健太、中野　興、細野　朗、上野川　修一（日大・生資科）
○ Yutaka Sugi, Kyoko Takahashi, Kenta Kurihara, Kou Nakano, Akira Hosono, Shuichi Kaminogawa (Nichidai)

【目的】腸管には500～1000種，100兆個にもおよぶ腸内細菌が定着し、宿主の健康の維持・増進に貢献するとされている。しかしながら、そうした腸内細菌に対して過剰な免疫応答が誘導されることは炎症性腸疾患や発がんといった病気の原因になることが示されており、腸内細菌に対しては免疫系の低応答性が保たれる必要がある。Toll-interacting protein (Tollip) は、TLRシグナルの抑制分子として知られ、腸管上皮細胞(IEC)での発現亢進が報告されていることから、腸内細菌に対する過剰応答の抑制に寄与すると考えられている。本研究では、Tollipが腸管上皮においてどのような発現分布を示すかを明らかにすることを目的とした。
【方法】9~12週齢のBALB/cマウスから小腸および大腸を採取し、dispase処理によって腸管上皮細胞を分離した。分離したIECはMACS法によってCD45^{+}細胞を除去し、その純度をフローサイトメトリーによって確認した。さらに小腸IECについてはEDTAおよびdispaseを使用し、未分化な細胞を豊富に含む集団と分化した細胞を豊富に含む集団に分画した。得られたそれぞれの細胞集団におけるアルカリフォスファターゼの発現量を測定することによって分画を確認した。採取したIECより、総RNAおよびタンパク抽出液を調製し、TollipのmRNA発現量を定量RT-PCR法によって、タンパク発現量をウエスタンブロット法によって測定した。
【結果】IEC における Tollip の発現は、mRNA レベルでは小腸―大腸間で有意な差が観察されなかった。一方で、タンパクレベルでの発現を解析したところ、Tollip は大腸 IEC で小腸 IEC に比べて顕著に強く発現していた。従って、小腸と大腸の IEC における Tollip の発現量の違いは、転写段階ではなく翻訳あるいは翻訳後段階での制御による可能性が強く示唆された。また、小腸 IEC を分化段階によって分画したサンプルの解析によって、Tollip の mRNA 発現は絨毛先端部の分化した IEC においてクリプト付近の未分化 IEC と比較して亢進していることが示された。これらの結果から、腸管上皮における Tollip の発現は転写段階および翻訳、翻訳後段階の両方の制御を受けることにより、IEC の分化段階および腸管の部位により異なる分布を示すことが明らかになった。

Tollip, intestinal epithelial cells, commensal bacteria

講演番号：2J11p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ J校舎11会場

マウスマクロファージ培養細胞RAW264におけるglutamate-cysteine ligase発現に対するβ-カロテンの影響

Influence of β-carotene on the expression of glutamate-cysteine ligase in RAW264 murine macrophages.

赤星 哲平、多田 紗也花、○山西 倫太郎[1]（徳島大院栄養生命科学教育部、[1]徳島大院HBS研究部）
Teppei Akaboshi, Sayaka Tada, ○Rintaro Yamanishi[1] (Grad School of Nutr and Biosci, The Univ of Tokushima, [1]Inst of Health Biosci, The Univ of Tokushima Grad School)

【目的】マクロファージを含む抗原提示細胞内のグルタチオン（GSH）量は、Th1/Th2バランスなどの免疫指標に影響を与えることが報告されている。我々はこれまでに、食品成分β-カロテンがRAW264細胞内のGSH量を増加させることを見出しており、これはカロテノイドによる免疫調節を議論する上で、重要なポイントであると考えている。GSH量が増加するには、その合成量が増加するか、酸化型から還元されるかであるが、β-カロテン作用時には酸化型も増加することから、前者であることが考えられた。そこで、本研究では、GSH合成系の律速酵素であるglutamate-cysteine ligase（GCL）に対するβ-カロテンの影響について検討した。
【方法】マウスマクロファージ培養細胞RAW264の培地に、テトラヒドロフランに溶解したβ-カロテンを添加してインキュベートする実験系において、GCL特異的阻害剤であるbutionine sulfoximine（BSO）、転写阻害剤 actinomycin D（Act D）、翻訳阻害剤 cycloheximide（CHX）の影響を検討した。GSH量の測定には5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)-GSH還元酵素リサイクリング法を、GCL mRNA発現量の評価にはreal-time RT-PCR法を、GCLタンパク質発現量の評価にはウエスタンブロット法を用いた。
【結果】培地へのBSOの添加により、RAW264細胞のβ-カロテン誘導性GSH量増加は、消失した。このことより、β-カロテン誘導性GSH量増加に対する、GCLの関与が示唆された。そこで、β-カロテンとインキュベートした後のRAW264細胞のGCLタンパク質発現を検討したところ、GCLの二つのサブユニットのうち、特に調節サブユニットであるGCLmの発現量に影響を与えることが明らかとなった。Act D や CHX がβ-カロテン誘導性GSH量増加に及ぼす影響について検討した結果、これらの薬剤の存在によりGSH量増加作用が消失したことから、β-カロテンのこの作用には、新規のタンパク質合成が必須であることが明らかとなった。さらに、β-カロテンによる GCLm タンパク質増加は、Act D と CHX のどちらの薬剤処理においても消失したが、GCLm mRNA量に対しては Act D 処理のみがネガティブな影響を与えた。これらの結果は、β-カロテンの効果が、翻訳後や転写後ではなく、転写に影響を及ぼしていることを示唆している。以上のように、マクロファージ内のGSH合成律速酵素の転写を誘導することで、細胞内GSH量を増加させ、ひいては免疫系に影響を及ぼすという、β-カロテン生理作用の新たな側面が示唆された。

β-carotene, glutathione, macrophage

講演番号：2J11p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ J校舎11会場

リンゴ由来プロシアニジンの抗原提示抑制効果

Suppressive effect of apple condensed tannin on antigen presentation

○久木田　卓弥[1]、片山　茂[1]、中島　翔平[2]、舛田　晋[2]、神田　智正[2]、穐山　浩[3]、中村　宗一郎[1]
([1] 信州大院・農　[2] アサヒグループホールディングス（株）　[3] 国立医薬品食品衛生研)
○Takuya Kukita[1], Shigeru Katayama[1], Syohei Nakashima[2], Susumu Masuda[2], Tomomasa Kanda[2], Hiroshi Akiyama[3], Soichiro Nakamura[1] ([1] Shinshu University, [2] Asahi Group Holdings, Ltd. [3] National Institute of Health Sciences, Japan)

【目的】ハイスループット解析が可能な抗原提示能抑制物質のスクリーニングアッセイ系の確立が求められている。演者らは今回，ヒト単球系細胞株THP-1から樹状細胞（DC）への分化誘導を行い，DC様THP-1の作製を試みた。このDC様細胞を用いてリンゴ由来プロシアニジン（ACT）の抗原提示抑制作用およびその作用機序について調べたので報告する。
【方法】THP-1をphorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）およびIL-4存在下で４日間培養することによって，DCへの分化誘導を行った。得られたDC様細胞は，鶏卵主要アレルゲンであるOvalbumin（OVA）刺激下で３日間培養を行った。抗原提示能は，抗原提示分子MHCクラスⅡの構成分子であるHLA-DR，および共刺激分子であるCD86分子の発現量をフローサイトメトリーで測定することにより検討した。また，OVA取り込み能は，FITC標識したOVAのDC様THP-1への取り込み量を測定することで評価した。さらに，ユビキチン関連遺伝子群であるMARCHファミリーのmRNA発現量をReal time PCR法で測定した。
【結果】THP-1のDC様への分化は形態的観察に加え，DCの特異マーカーであるCD11c，DC-SIGNの発現が上昇することによって確認した。DC様THP-1はOVA刺激により，HLA-DR，CD86の発現が上昇し，OVA刺激下で同時にACTの混合物を終濃度50，100μg/mL添加すると，HLA-DRおよびCD86の発現量が濃度依存的に抑制されることが明らかになった。加えて，ACTの単量体から八量体までの各画分の抗原提示能抑制効果を検討したところ，ACTの重合度と抗原提示能抑制効果には適した重合度が存在することが明らかとなった。また，FITC標識OVAの取り込み能を検討したところ，ACTを添加した際もOVAの取り込み能は変化しなかったことから，HLA-DRの発現抑制はOVAの取り込みが阻害されたことに起因しないことが示された。一方，ユビキチン関連遺伝子であるMARCHファミリーのmRNA発現量を測定したところ，ACT添加でMARCH Ⅰ発現量が顕著に増加していた。このことから，HLA-DR発現抑制はユビキチン化による分解作用が関与することが示唆された。以上の結果から，ACTが抗原提示抑制効果を有し，その作用機序としては，ユビキチン化による分解作用に基づくものであることが示唆された。

antigen presentation, dendritic cells, apple condensed tannin

講演番号：2J11p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ J校舎11会場

脂質ラフトを介した免疫担当細胞の活性化に対するカロテノイドの影響

Effects of carotenoids on the activation of immune cells via lipid rafts

○眞鍋 祐樹、酒井 祥太、菅原 達也、平田 孝（京大院・農）
○Yuki Manabe, Shota Sakai, Tatsuya Sugawara, Takashi Hirata (Kyoto University)

【目的】演者らは、いくつかのカロテノイドが肥満細胞の細胞膜上に存在する高親和性IgE受容体(FcεRI)の脂質ラフトへの移行を阻害し、肥満細胞の活性化を抑制することをこれまでに見出している(1,2)。一方、肥満細胞以外の免疫担当細胞でもB細胞のB細胞受容体(BCR)やマクロファージなどのToll様受容体4(TLR4)などにおいて、リガンドとの結合後に脂質ラフトへと移行することが報告されている。したがって、BCRやTLR4の活性化に対するカロテノイドの影響にも興味が持たれる。そこで本研究では、脂質ラフトが関与する免疫担当細胞の活性化に注目し、カロテノイドの影響を調べた。
【方法】ワカメやホウレンソウなどの食品素材から有機溶媒を用いて脂質画分を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフやHPLCを用いてカロテノイドを精製した。肥満細胞のモデルとしてラット好塩基球性白血病由来RBL-2H3細胞、B細胞のモデルとしてヒトバーキットリンパ腫由来Ramos細胞、マクロファージのモデルとしてマウスマクロファージ様RAW264細胞をそれぞれ用いた。カロテノイドを添加した無血清培地中で細胞を4時間培養し、リガンド刺激による細胞の活性化について、肥満細胞の脱顆粒反応、BCRのキャッピング形成、マクロファージの一酸化窒素産生をそれぞれ評価した。また脂質ラフトのマーカーとそれぞれの受容体(FcεRI/IgE複合体、BCR、TLR4)を蛍光免疫染色し、リガンド刺激に伴う受容体の脂質ラフトへの移行を調べた。
【結果】22種類のカロテノイドを評価したところ、シフォナキサンチンやフコキサンチン、フコキサンチノール、β-カロテン、リコペンの5種類のカロテノイドは、肥満細胞、B細胞、マクロファージの活性化を抑制し、それぞれの受容体の脂質ラフトへの移行を阻害した。一方、カンタキサンチンやフェニコキサンチンはいずれの細胞の活性化に対しても影響を与えなかった。またアロキサンチンやエキネノンなどマクロファージの活性化のみを抑制するカロテノイドも確認された。以上の結果から脂質ラフトを介した免疫担当細胞の活性化の抑制作用はカロテノイドの化学構造によって異なることが示され、細胞の種類によってカロテノイドの脂質ラフトを介した受容体応答の抑制機構が異なることが示唆された。

(1) *J. Biol. Chem.*, **281**, 28172-28179 (2009)
(2) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1013-1015 (2011)

carotenoid, lipid raft, anti-inflammatory effect

講演番号：2J11p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ J校舎11会場

デヒドロアスコルビン酸修飾タンパク質の関与する自己免疫応答

Autoimmune response involving the dehydroascorbic acid-modified proteins.

○近澤　未歩、宮下　宙士、大瀧　菜月、柴田　貴広、河合　慶親、松田　幹、内田　浩二
（名大院生命農・応用分子生命科）
○Miho Chikazawa, Hiroaki Miyashita, Natsuki Otaki, Takahiro Shibata, Yoshichika Kawai, Tsukasa Matsuda, Koji Uchida (Grad. Sch. Bioagric. Sci, Nagoya Univ.)

【目的】全身性エリテマトーデス（SLE）は自己免疫疾患の一種であるが、その発症と酸化ストレスの関与が示唆されている。具体的には、生体内における酸化修飾タンパク質の形成がSLEの病態形成において重要な自己抗体である抗DNA抗体の生成を惹起しているという示唆が為されている。酸化修飾には脂質過酸化物による修飾や糖化修飾が含まれるが、酸化修飾因子のひとつとしてビタミンC（アスコルビン酸）の酸化物であるデヒドロアスコルビン酸（DHA）が知られている。DHAは生体内において常に生成され、タンパク質との高い反応性を有することから白内障などへの関与が示唆されているが、疾病との関与についてはほとんどが未解明である。これより、DHAによるタンパク質酸化修飾が自己免疫応答に及ぼす影響を検討することとした。
【方法・結果】DHAとBSAを7日間インキュベートし、DHA修飾タンパク質を作製した。SLEのモデルマウスであるMRL/lprマウス血清を用い、ELISAによりDHA修飾タンパク質に対する自己抗体を調べた結果、有意な交差性と抗体価の経時的な上昇を確認した。そこで、MRL/lprマウス由来の抗DHA修飾タンパク質モノクローナル抗体の作製を試みた。20週齢のMRL/lprマウス脾細胞とミエローマ細胞を融合し、スクリーニング、クローニングを経てモノクローナル抗体DDL17を得た。DDL17はDHA修飾タンパク質のみならずDNAや他の糖化修飾タンパク質とも交差性を示すことが明らかとなった。さらに、DHA修飾タンパク質の免疫により同様の抗体が形成されるのか確認するために、DHA修飾KLHをBalb/cマウスに免疫した。免疫により、抗DHA修飾タンパク質抗体価の上昇に伴い抗DNA抗体価も上昇することが確認された。免疫Balb/cマウスより得られたモノクローナル抗体BDM1はMRL/lprマウス由来のDDL17と同様、DNAや糖化修飾タンパク質にも交差性を示すことが明らかとなった。この結果より、修飾タンパク質と抗DNA自己抗体生成の関与が示唆された。また、得られたモノクローナル抗体DDL17とBDM1はともにIgMであった。これらの多重交差性を有するIgM抗体の機能性について検討を行うため、酸化特異的エピトープの提示が起こるアポトーシス細胞と抗体の結合について確認した。Etoposide処理を行ったRAW264.7細胞に対する抗体の結合をフローサイトメトリー、共焦点レーザー顕微鏡により確認したところ、多重交差性を有するIgM抗体はアポトーシス細胞を認識、結合することが明らかとなった。これよりこれらのIgM抗体はアポトーシス細胞の酸化特異的エピトープと結合することで自己抗原露出の抑制、自己免疫応答抑制に寄与していることが示唆された。

SLE, oxidative-modified protein, anti-DNA antibody

講演番号：2J11p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ J校舎11会場

γ-ケトアルデヒド化合物が関与する自己免疫応答

Autoimmune response involving γ-ketoaldehydes

近澤未歩[1]、○宮下宙士、大瀧菜月[1]、柴田貴広[1]、河合慶親[1]、内田浩二[1]（名大・農、[1]名大院生命農・応用生命科）

Miho Chikazawa, ○Hiroaki Miyashita, Natsuki Otaki, Takahiro Shibata, Yoshichika Kawai, Koji Uchida (Sch. of Agr. Sci., Nagoya. Univ. [1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya. Univ.)

【目的】生体膜を構成するリノール酸やアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸は、脂質過酸化反応により、4-Hydroxy-2-nonenal (HNE)や 4-Oxo-2-nonenal (ONE)などの反応性短鎖アルデヒド類を生成する。これらの化合物は生体内で核酸やタンパク質と反応することにより、酸化特異的エピトープを生成し、自己免疫応答を引き起こすことが報告されている。当研究グループでは、これまでに自己免疫疾患のひとつである全身性エリテマトーデス（SLE）患者血清において、DNAのみならずHNE修飾タンパク質に対する抗体価の上昇について報告している（Akagawa et al., PNAS, 2006）。さらに、SLEモデルマウスであるMRL/lprマウスが産生する抗DNA抗体が、ONE修飾タンパク質などの酸化修飾タンパク質も認識する二重交差性抗体であることを見出してきた（Toyoda et al., JBC, 2007; Otaki et al., JBC, 2010）。そこでONE修飾タンパク質のような修飾タンパク質が抗DNA抗体の産生に関与するという仮説のもと、様々なアルデヒド修飾タンパク質に対するMRL/lprマウス血清の交差性を詳細に検討したところ、γ-ケトアルデヒド全般がタンパク質との反応により、自己免疫原性を示すことが明らかになった。本研究では，γ-ケトアルデヒドの最小単位である1,4-Butanedial（BA）を用い、自己抗体産生機構の解析を行った。

【方法・結果】BAとウシ血清アルブミン（BSA）を24時間インキュベートし、BA修飾タンパク質を作成した。BA修飾タンパク質を固相抗原としたELISA法により、 MRL/lprマウス血清との強い交差性が認められた。加熱変性もしくは、還元アルキル化したBA修飾タンパク質とMRL/lprマウス血清との交差性を検討したところ、有意な低下は見られなかったことから、エピトープは比較的安定な構造であることが示唆された。さらにBA修飾タンパク質のエピトープ構造を明らかにするためBA修飾タンパク質を酵素消化し、HPLCによる分画を行った。その結果、MRL/lprマウス血清と交差性を示す画分が見られた。また、限外濾過を用いた検討から、BAによって架橋された修飾ペプチドに交差性がある可能性が示唆された。現在、交差性に必要な分子構造の解析を行っている。

lipid peroxidation, autoimmune diseases, γ-ketoaldehydes

講演番号：2J11p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ J校舎11会場

Lactobacillus plantarum HOKKAIDOに対するヒト樹状細胞の免疫応答

Immune responses of human dendritic cells to *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO

○中川良二、内田健治[1]、片野直哉[1]（道総研・食加研セ、[1]よつ葉乳業・中央研）
○Ryoji Nakagawa, Kenji Uchida[1], Naoya Katano[1] (Hokkaido Research Organization, [1]Yotsuba)

【目的】*Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO（HOKKAIDO株）は、漬物から分離された乳酸菌株であり、消化液耐性を有するなどプロバイオティクスとして期待されている。本研究では、当該株がヒトに及ぼす免疫学的な効果としてどのようなものが期待できるかの基本的知見を得ることを目的に実施した。
【方法】HOKKAIDO株（死菌または生菌）と正常ヒト樹状細胞（Cryo NHDC）を共培養し、遠心分離後、細胞を回収しRNAを調製した。これを試料として各種サイトカイン等の発現量をリアルタイムPCRアレイ（RT^2 Profiler PCR Array System）にて網羅的に解析した。また、遠心分離後の培養上清を用いてサイトカイン等の産生量をELISAキットにより測定した。
【結果】リアルタイムPCRアレイによる解析の結果、未成熟樹状細胞との共培養により、IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-8およびTNF-α遺伝子の発現が有意に増大した。特に、これらの発現はHOKKAIDO株の生菌添加区で顕著であった。また、生菌添加区では弱いながら、IL-10およびIL-12p40の発現が認められた。ELISAキットによる測定の結果、HOKKAIDO株の生菌添加区ではIL-6およびTNFαを高産生した。しかし、IL-1αおよびIL-1βの産生は見られず、発現の結果と一致しなかった。また、生菌添加区ではIL-10およびIL-12p40の産生が確認された。

immune response, dendritic cells, Lactobacillus plantarum

講演番号：2J11p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ J校舎11会場

シビランにおける免疫賦活作用の評価

Evaluation of the immunostimulatory effects of leaf extracts from *Talinum triangulare*

○吉田 泉、福増 潤二、渡辺 章夫、原田 哲平、三嶋 隆、山口 昭弘、渡井 正俊、
三枝 隆裕[1]（日本食品分析セ、[1]沖縄高専）

○Izumi Yoshida, Jyunji Fukumashi, Akio Watanabe, Teppei Harada, Takashi Mishima, Akihiro Yamaguchi, Masatoshi Watai, Takahiro Mitsue[1]
(Japan Food Research Laboratories, [1]Okinawa National College of Technology)

【目的】最近、疾病予防の観点から免疫力を高める食品への関心が高まってきており、この機能性をもつ食品をスクリーニングすることは有用であると思われる。マクロファージが産生するIL-12は、NK細胞を活性化して自然免疫を高めるほか、Th1/Th2バランスをTh1優位にし、感染防御や抗腫瘍に働く細胞性免疫を高める作用があることが知られている。そこで、ヒト単球性白血病細胞であるTHP-1細胞を用い、IL-12発現促進量を調べることによって、沖縄で栽培されているシビラン(*Talinum triangulare*)の免疫賦活作用の評価を行った。シビランは、スベリヒユ科ハゼラン属の植物で、「サンカクハゼラン」、「アフリカホウレンソウ」、「ブラジルホウレンソウ」とも呼ばれる野菜である。さらに、シビラン中に含まれる免疫賦活物質の同定も試みた。
【方法】シビランの熱水抽出物(100℃・5分間)をTHP-1細胞に添加し、5時間培養した後、細胞よりRNAを抽出した。IL-12の発現量はqRT-PCRによって調べた。また、DNAチップによりその他の遺伝子発現量も調べた。免疫反応の中心的な役割を果たす転写因子NF-κBの転写活性は、レポーターアッセイにより調べた。さらに、免疫賦活物質の同定を行うため、熱水抽出物の80%エタノール沈殿物を調製した。この多糖類相当物であると推定される80%エタノール沈殿物のIL-12発現促進作用を調べるとともに、加水分解して構成単糖の同定も行った。
【結果】シビランの熱水抽出物にはIL-12発現促進作用があり、NF-κBの転写活性促進作用も認められた。これらのことから、シビランには免疫賦活作用があると考えられた。免疫賦活物質が多糖類であるかどうかを確認するため、熱水抽出物とその80%エタノール沈殿物おけるIL-12発現促進作用調べたところ、ほぼ同等のIL-12発現促進作用が認められた。免疫賦活物質はシビラン中に含まれる多糖類成分であると推定された。この多糖類の構成単糖は、ガラクトース、アラビノース、ラムノース等であり、アラビノガラクタンがシビランにおける主要な免疫賦活物質である可能性が示唆された。

immunostimulation, THP-1, IL-12

講演番号：2J11p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ J校舎11会場

ワサビ抗腫瘍成分 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MITC) による免疫作動機序に関する研究

Wasabi-derived antitumor substance 6-MITC initiates innate immune systems via Toll-like receptors

○熊澤 文音, 岡田 聖裕[1], 野下 俊朗[2], 宮内 裕美子[3], 宮川 拓也[3], 田之倉 優[3], 福家 洋子 (首都大・人間健康科学, [1]戦略研究センター, [2]県立広島大・生命環境, [3]東大院・農学生命科学)

○Ayane Kumazawa, Masahiro Okada[1], Toshiro Noshita[2], Yumiko Miyauchi[3], Takuya Miyakawa[3], Masaru Tanokura[3], Yoko Fuke (Health Promotion Sciences [1]Center for Priority Areas Tokyo Metropolitan University, [2]Prefectural University of Hiroshima, [3]University of Tokyo)

【目的】6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MITC) はワサビに見出された抗腫瘍成分である。これまで, 6-MITC のヒト乳がん細胞増殖抑制作用およびがん細胞転移抑制作用を明らかにしている。またマウス抗原提示細胞の活性化を介し, NK, NKT 活性を亢進することを確認している。本研究ではマウスモデルで確認されたサイトカイン産生促進作用がヒトにおいても同様に示されるかを明らかにするため, 末梢血単球由来樹状細胞によるサイトカイン産生応答の検証を行った。さらに 6-MITC の免疫機序には異物認識によりサイトカイン産生を誘導する Toll-like receptor (TLR) の関与が推察され, TLR1, 2, 4, 6 による 6-MITC の認識機序を検討した。

【方法】1) 健常人ボランティアの末梢血より密度勾配遠心分離法および接着法を用いて単球を分離し, GM-CSF, IL-4 添加により樹状細胞へと分化誘導した (ヒト MoDC)。ヒト MoDC を 6-MITC で刺激し, 72hr 後, 培養上清中の IL-12, IFN-γ産生量を ELISA 法にて測定した。2) 免疫作動機序検討のため, 6-MITC または TLRs を固定した 2 種類のセンサーチップを作成し, TLR1, 2, 4, 6 に対する 6-MITC の結合性を表面プラズモン共鳴法 (Surface Plasmon Resonance; SPR) (Biacore T200; GE Healthcare) により検討した。TLR6 は BL21 (DE3) 大腸菌を用いた GST 遺伝子融合タンパク質発現システム (ベクター; pGEX-2TK) により合成した。ヒト TLR6 遺伝子を大腸菌に導入しイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) によりタンパク質発現を誘導した。GST 融合タンパク質精製システムにより上清画分から GST-TLR6 を精製し, 結合性解析に供した。

【結果】1) ヒトMoDCへの6-MITC (1μM, 5μM, 10μM, 72時間) 刺激により, IL-12産生量がコントロール群に対し有意に促進された。さらに樹状細胞との共培養によりリンパ球からのIFN-γ産生量が亢進される傾向がみられた。以上のことから6-MITCはヒト生体内において樹状細胞の活性化を介してNK活性, NKT活性を促進しがん細胞を傷害することが強く示唆された。2) TLR2結合チップを用いて解析を行い, 6-MITCの解離定数は70μMという結果を得ている。体内に入った6-MITCは樹状細胞に発現しているTLRsにより認識され抗腫瘍活性を作動させるという機序を考えている。現在, TLR1, 4, 6と6-MITCの結合性を解析中である。

Toll-like receptor (TLR), Anti-cancer, Dendritic cell

講演番号：2J11p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ J校舎11会場

Lactobacillus brevis KB290摂取によるマウス脾臓における細胞傷害活性上昇作用とそのメカニズム解明

Mechanism of the enhancement of cell-mediated cytotoxicity by *Lactobacillus brevis* KB290 ingestion in mice.

○佐々木恵理加[1)]、福井雄一郎[1)]、福家暢夫[1)]、石島智子[2)]、中井雄治[2)]、阿部啓子[2)]、矢嶋信浩[1)]（カゴメ総研[1)]、東大院・農生科・応生化[2)]）

Erika Sasaki[1)] , Yuichiro Fukui[1)], Nobuo Fuke[1)], Tomoko Ishijima[2)], Yuji Nakai[2)], Keiko Abe[2)], and Nobuhiro Yajima[1)] Research Institute, Kagome Co., Ltd.[1)], Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo [2)]

【目的】*Lactobacillus brevis* KB290（以下、KB290）は京漬物「すぐき」より分離された植物性食品由来の乳酸菌で、その摂取によりヒトの末梢血細胞やマウス脾細胞のがん細胞に対する細胞傷害活性が上昇することが報告されている。本研究ではそのメカニズムの解明を目的とし、KB290摂取により脾臓の細胞傷害活性上昇が確認されたマウスの脾臓、腸間膜リンパ節、肝臓の遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。また、脾臓におけるNK細胞やT細胞の割合を測定した。【方法】KB290(1×10^{10}cfu/匹/日)を1日間自由摂取させたBALB/cマウス(♀、9週齢)を用い、フローサイトメトリーにより脾細胞のYAC-1細胞に対する細胞傷害活性と脾細胞中のNK細胞、T細胞の割合を、DNAマイクロアレイにより脾臓、腸間膜リンパ節、肝臓での遺伝子発現を測定し、対照群と比較した。【結果】KB290群のマウス脾臓の細胞傷害活性は対照群に比べ有意に高値である。その脾臓においてDNAマイクロアレイ解析を行い、Gene Ontology解析、KEGG PATHWAY解析を行った結果、それぞれ細胞傷害活性に関与すると考えられる“positive regulation of T cell mediated cytotoxicity”および“Natural killer cell mediated cytotoxicity”カテゴリーにおいて発現亢進した遺伝子の割合が多いことが分かった。そして、前者に属する発現亢進遺伝子の多くがMHC class I の構成タンパク質であり、後者に属する発現亢進遺伝子の多くはNK細胞活性化シグナル伝達に関わるものであった。次に、KB290群の脾臓内のNK細胞やT細胞の割合を測定したところ、対照群と比べてどちらの細胞の割合も変化は見られなかった。よってKB290を摂取したマウス脾臓では、エフェクター機能を持つ細胞の割合が増加しないことが確認でき、KB290摂取による細胞傷害活性上昇作用のメカニズムには、NK細胞や、MHC class I を介したT細胞の活性化が関与する可能性があると考えられた。また、腸間膜リンパ節および肝臓のDNAマイクロアレイ解析を行ったところ、KB290群の腸間膜リンパ節では448遺伝子の発現が有意に上昇し、786遺伝子の発現が有意に低下した。肝臓では724遺伝子の発現が有意に上昇し、721遺伝子の発現が有意に低下した。Gene Ontology解析の結果、腸間膜リンパ節では、“immune system development”や“T cell activation”カテゴリーなど免疫に関連するカテゴリーで発現が上昇した遺伝子の割合が有意に高いことが分かった。今後、KB290摂取が腸間膜リンパ節や肝臓へ及ぼす影響を解明するとともに、KB290摂取が腸間膜リンパ節や肝臓に及ぼす影響と、脾臓での細胞傷害活性上昇作用との関連について検討していく予定である。

Keyword1 *Lactobacillus brevis* KB290, Keyword2 cell-mediated cytotoxicity, Keyword3 DNA microarray

講演番号：2J11p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ J校舎11会場

pDC直接活性化能を有する*Lactococcus lactis* JCM5805（プラズマ乳酸菌）のマウスにおける効果

Oral administration of *Lactococcus lactis* JCM5805 that directly stimulate plasmacytoid dendritic cell activate anti-viral immunity in mice.

○城内　健太、杉村　哲[1]、大塩　木乃実[1]、井門　久美子[1]、阿野　泰久[1]、藤原　大介[1]（小岩井乳業・開発センター、[1]キリンホールディングス・フロンティア技術研）
○Kenta Jounai, Tetsu Sugimura[1], Konomi Ohshio[1], Kumiko Ikado[1],Yasuhisa Ano[1], Daisuke Fujiwara[1] (Koiwai Dairy Products Co.,LTD. [1]Kirin Holdings Co.,LTD.

【目的】これまでにマウス骨髄由来樹状細胞を用いた*in vitro*の評価系により、pDCを直接活性化する極めて稀な乳酸菌*Lactococcus lactis* JCM5805を見出し、昨年度の本学会で発表した。食品としての利用を考え、マウス経口投与時に得られる効果について検証した。さらに、本乳酸菌株の生菌及び加熱死菌体での効果を*in vitro*で比較した。

【方法】6週齢のC57BL/6雌マウスを標準食(AIN-93G)摂取群、標準食+*L. lactis* JCM5805(1mg/day/head)(加熱死菌体)摂取群の2群設定し、2週間自由摂取させた。2週間後、血中IFN-α、脾臓(SPN)・腸間膜リンパ節(MLN)のpDC活性化度、SPNリンパ球を用いたCpG-Aに対する反応性について測定した。また、BM-DCを用い*L. lactis* JCM5805の生菌における活性を測定した。

【結果】*L. lactis* JCM5805の2週間自由摂取により、標準食群と比較し血中IFN-αの増強効果、MLNのpDCにおける活性化マーカーであるMHC classⅡおよびCD86の有意な発現上昇が確認された。また、CpG-Aに対するIFN-α産生誘導能の増強傾向も確認された。これらの結果から、本菌株の摂取によってpDCを主作用機構とするウイルス感染防御機構の活性化が起こることが示された。また、本乳酸菌株は加熱死菌体のみならず生菌においても同程度のIFN-α産生誘導能が認められ、幅広い商品形態に応用できることが期待される。

plasmacytoid dendritic cell, lactic acid bacteria, viral infection

講演番号：2J11p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ J校舎11会場

Lactococcus lactis JCM5805（プラズマ乳酸菌）のヒトpDC活性に及ぼす影響の検討

Immunomodulatory effect of *Lactococcus lactis* JCM5805 on plasmacytoid dendritic cell in humans.

○杉村　哲、城内　健太[1]、大塩　木乃実、田中　貴章[2]、諏訪　昌宏[1]、藤原　大介（キリンホールディングス・フロンティア技術研、[1]小岩井乳業・開発センター、[2]小岩井乳業・商品開発部）
○Tetsu Sugimura, Kenta Jounai[1], Konomi Ohshio, Takaaki Tanaka[2], Masahiro Suwa[1], Daisuke Fujiwara (Kirin Holdings Co.,LTD. [1,2]Koiwai Dairy Products Co.,LTD.)

【目的】前発表の通り、マウスを用いた*in vitro*及び*in vivo*の試験によって*L. lactis* JCM5805のpDC活性化効果が確認されている。そこで、*L. lactis* JCM5805がヒトの細胞及び生体に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、ヒトpDCを用いた*in vitro*試験及びボランティアヒト試験を行った。

【方法】まず、ヒトの末梢血単核細胞（PBMC）から単離したpDCに対する*L. lactis* JCM5805のIFN-α誘導効果についての*in vitro*試験を行った。さらに、健康な成人男女38名を対象にランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験を実施し、*L. lactis* JCM5805ヨーグルト及び乳酸菌非含有プラセボ飲料を4週間摂取した際の、「pDC活性に関するバイオマーカー」及び「体調アンケートによる風邪症状の主観的評価」に及ぼす影響について検討を行った。

【結果】ヒトのpDCを用いた*in vitro*試験から、*L. lactis* JCM5805によるIFN-α産生誘導能が確認された。さらに上述のヒト試験において、*L. lactis* JCM5805ヨーグルトを4週間摂取することにより、pDC活性化マーカーであるMHC classII及びCD86の活性変化率がプラセボに対し有意に高まることが確認された。この傾向は元々のpDC活性が低い被験者において顕著であり、これらの被験者においては、IFN-α遺伝子の転写量及びCpG DNA刺激に対するIFN-α産生量も有意に上昇することが認められた。また、体調アンケートからも風邪罹患日数が減少する傾向が見られた。以上の結果から、*L. lactis* JCM5805ヨーグルト摂取によりpDCが活性化され、IFN-α産生能が上昇することによって、ウイルス感染を防ぐ可能性が示唆された。この効果はpDC活性の低い人、すなわちウイルス抵抗性の低い人において顕著であった。

plasmacytoid dendritic cell, lactic acid bacteria, viral infection

講演番号：2J11p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ J校舎11会場

Lactobacillus plantarum NRIC0380 による $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T 細胞誘導のメカニズム

The mechanism of induction of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T cells by *Lactobacillus plantarum* NRIC0380

○藤原　渉、榎本　麻衣、服部　誠、杉山　久[1]、下條　学[1]、岡田　早苗[2]、好田　正(東農工大院・農・応生化、[1]東洋水産(株)・R&Dセンター、[2]東農大・菌株保存室)

○FUJIWARA Wataru, ENOMOTO Mai, HATTORI Makoto, SUGIYAMA Hisashi[1], SHIMOJOH Manabu[1], OKADA Sanae[2], YOSHIDA Tadashi(Department of Applied Biological Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology , [1]R&D center, Toyo Suisan Kaisha Ltd, [2]Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture)

【目的】我々は以前の研究において、*Lactobacillus plantarum* NRIC0380が花粉症の症状を緩和することを示した。また、BALB/cマウスに経口投与することで、抗原特異的IgE産生が抑制され、脾臓およびパイエル板において$CD4^+CD25^+Foxp3^+$制御性T(Treg)細胞の割合が増加することを明らかとした。さらに、NRIC0380を経口投与したマウスの脾臓から分離したTreg細胞を移入したマウスにおいて、アレルギー性の皮膚反応が抑制されることを示した。近年、Treg細胞がアレルギーの発症を抑制していることが示唆されているが、乳酸菌の抗アレルギー活性とTreg細胞誘導能の関連性は明らかではない。しかし、我々のこれまでの結果から、NRIC0380の抗アレルギー活性の一つのメカニズムとして、Treg細胞の誘導能が寄与している可能性が考えられる。そこで、本研究においては、NRIC0380がTreg細胞を誘導するメカニズムを解明することを目的とし、Treg細胞への分化に影響すると考えられるサイトカインIL-6、TGF-β産生および樹状細胞(DC)におけるレチナールデヒドロゲナーゼ(RALDH)活性、B7-H1発現に着目し、乳酸菌の影響を解析した。
【方法】BALB/cマウスの腸間膜リンパ節(MLN)細胞を1μg/mlのNRIC0380と共培養し、48時間後の上清中のIL-6およびTGF-β産生量をELISA法により測定した。また、24時間後に細胞を回収し、フローサイトメトリーによりDCのRALDH活性およびB7-H1発現を解析した。
【結果】MLN細胞をNRIC0380と共培養することによりIL-6およびTGF-β産生量が増加した。また、MLNのDCにおけるRALDHの活性も増加した。TGF-βはナイーブT細胞のTreg細胞への分化を誘導するが、IL-6の存在下ではTh17細胞への分化を促進することが知られている。一方、Th17細胞誘導条件下でもレチノイン酸が存在するとTreg細胞が誘導されることが報告されており、NRIC0380によるTreg細胞の誘導においてDCのRALDH活性の亢進が重要な働きをすると考えられる。さらに、乳酸菌の刺激によりMLNのDCにおけるB7-H1発現量も増加した。経口免疫寛容の確立において、MLNのDC上に発現するB7-H1による抗原特異的Treg細胞の誘導が重要な働きを担っていることが報告されており、乳酸菌によるB7-H1発現量の亢進もTreg細胞誘導能に関与している可能性が考えらえる。
【結論】NRIC0380によるTreg細胞の誘導はDCによるRALDHやB7-H1の発現亢進を介した経路により誘導されていることが示唆された。

Regulatory T cell，Dendritic cell，Lactic acid bacteria

講演番号：2J11p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ J校舎11会場

培地組成による*Lactobacillus gasseri* TMC0356の免疫調節作用への影響

Influence of culture medium composition on immunoreguratory effects of *Lactobacillus gasseri* TMC0356

○宮澤 賢司、何 方、依田 一豊、立山 敦、平松 優（タカナシ乳業㈱・商品研究所）
○ Kenji Miyazawa, Fang He, Kazutoyo Yoda, Atsushi Tateyama, Masaru Hiramatsu (Takanashi Milk Products Co., Ltd.)

【目的】*Lactobacillus gasseri* TMC0356 (TMC0356)は加熱処理においても免疫担当細胞を活性化し、IL-12産生能を高め、インフルエンザウイルス感染予防効果および老化による免疫力低下抑制効果など様々な機能性が報告されている。我々は、乳酸菌培地であるMRS培地と同等の培地組成をもつ食品培地で培養したTMC0356は、MRS培地で培養したTMC0356と同等以上の免疫調節作用を持つことを明らかにした。さらに、培地成分の違いは、TMC0356の菌形態の変化や免疫調節作用にも影響を及ぼすことが示唆された。本研究では、培地成分の窒素源や金属塩に注目し、培地成分の違いによるTMC0356菌の免疫調節作用について検討した。
【方法】本試験で検討した培地はMRS培地を基に作成した。MRS培地で使用している窒素源を他のペプトンに代替し配合したもの、培地成分からペプトンを除去したものを配合した。金属塩の影響を検討するために、マンガンやマグネシウムを除いた培地を作成した。各培地で培養したTMC0356は洗浄後、加熱処理をして凍結乾燥し、処理菌体をJ774.1細胞と共培養を実施し、上清中のIL-12産生量をELISA法で測定した。
【結果】培地成分のペプトンの違いによりTMC0356によるIL-12産生量が変化していた。さらに、ペプトンを除去した培地では、ペプトン存在培地と比較して、IL-12産生量が有意に高まることが明らかとなった。また、ペプトンの除去により菌体の形態に顕著な変化が認められた。培地成分に含まれる微量の金属塩のマンガン、マグネシウムはTMC0356によるIL-12産生量に影響を及ぼさなかった。これらの結果は培地組成などの培養条件の変化が乳酸菌の免疫調節作用に大きな影響を与えたことを示唆した。

Lactobacillus gasseri TMC0356, IL-12, culture medium

講演番号：2J11p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ J校舎11会場

高いIL-12誘導活性を有する乳酸菌*Lactobacillus paracasei* MoLac-1による感染防御作用

Anti-infective Effects of *Lactobacillus paracasei* MoLac-1 that Strongly Induces Interleukin-12

○岩淵　紀介、米澤　寿美子、田中　智弘、小田巻　俊孝、清水（肖）金忠、八重島　智子、岩附　慧二（森永乳業・食基研）

○Noriyuki Iwabuchi, Sumiko Yonezawa, Tomohiro Tanaka, Toshitaka Odamaki, Jin-zhong Xiao, Tomoko Yaeshima, Keiji Iwatsuki (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【目的】

一部の乳酸菌株ではインフルエンザウイルス感染に対して防御作用を示すことが報告されている。これらの乳酸菌株はインターロイキン-12（IL-12)を介してNK細胞を活性化することが示唆されていることから、高いIL-12誘導活性を有する乳酸菌株はインフルエンザ感染に対して防御作用を有することが期待される。本研究では高いIL-12誘導活性を有する乳酸菌株を選抜し、その選抜株のマウスに対するインフルエンザ感染防御作用を検証した。

【方法、結果】

84株の乳酸菌加熱菌体のIL-12誘導活性を、マウスの脾細胞を用いて*in vitro*で評価し、最も高い誘導活性を有する株として*Lactobacillus paracasei* MoLac-1を選抜した。MoLac-1の加熱菌体は用量依存的にマウス脾細胞からIL-12とインターフェロンγ（IFN-γ）を誘導し、ヒト末梢血単核球からIL-12を誘導した。

種々の細胞ポピュレーションを除去した脾細胞にMoLac-1を添加したところ、マクロファージを除去した細胞からのIL-12産生が消失したことから、MoLac-1はマクロファージからのIL-12産生を誘導することが示された。フローサイトメトリーを用いた解析では、MoLac-1はNK細胞からのIFN-γ産生を誘導し、活性化マーカーであるCD69の発現を亢進させた。さらにMoLac-1で誘導されるIFN-γ産生はIL-12中和抗体の添加で消失したことから、MoLac-1によってマクロファージから誘導されたIL-12がNK細胞からのIFN-γ産生を誘導していることが示唆された。

MoLac-1の経口摂取が宿主の感染防御機能に及ぼす影響を調べるために、MoLac-1の加熱菌体をマウスに10日間投与したところ、脾細胞中のNK細胞の活性化は見られなかったが、有意なNK細胞の割合の増加が見られた。また、MoLac-1の加熱菌体を2週間投与したマウスにインフルエンザウイルスを感染させたところ、感染による症状と体重減少が改善され、肺中ウイルス濃度が有意に減少した。

以上の結果から、MoLac-1の加熱菌体摂取は、宿主の自然免疫を調節し、インフルエンザウイルスなどの感染を軽減することが示唆された。

Lactobacillus, influenza, natural killer cell

講演番号：2J11p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ J校舎11会場

加熱条件が*Lactobacillus paracasei* MoLac-1のIL-12誘導活性に及ぼす影響

The effect of heat condition on interleukin-12 induction of *Lactobacillus paracasei* MoLac-1

○田中 智弘、岩淵 紀介、矢吹 博芳[1]、橋本 潤一[1]、小田巻 俊孝、清水（肖）金忠、八重島 智子、武田 安弘[1]、高瀬 光徳[1]、岩附 慧二（森永乳業・食基研、[1]森永乳業・栄科研）
○Tomohiro Tanaka, Noriyuki Iwabuchi, Hiroyoshi Yabuki, Junichi Hashimoto, Toshitaka Odamaki, Jin-zhong Xiao, Tomoko Yaeshima, Yasuhiro Takeda, Mitsunori Takase and Keiji Iwatsuki (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【目的】

高いIL-12誘導活性を有する*Lactobacillus paracasei* MoLac-1は、宿主の自然免疫を調節し、インフルエンザウイルスなどの感染を軽減することが示唆されている。MoLac-1加熱菌体作製にあたり、高温殺菌でMoLac-1のIL-12誘導活性が失われることが判明した。そこで高温殺菌時のIL-12誘導活性を保護する物質を探索し、その機序を検証した。

【方法・結果】

MoLac-1凍結乾燥菌末をバッファーに懸濁し90℃から121℃の間でそれぞれ殺菌を行い、マウス脾細胞を用いてIL-12誘導活性を評価したところ、殺菌温度依存的にIL-12誘導活性が失われた。そこでバッファーに添加する保護剤を検討し、塩類、糖類、水溶性ビタミン、ポリフェノールのいくつかに有意な保護効果を確認した。

IL-12誘導活性保護効果が高かったNaClを用いて、まずMoLac-1加熱菌体のN-Acetylmulamidaseに対する消化耐性への影響を確認した。IL-12誘導活性と同様に、殺菌温度依存的に消化耐性の低下が認められたが、NaClの添加により消化耐性の有意な保護効果が認められた。またグラム染色を行ったところ、121℃で殺菌を行ったものは赤色に染まる菌の割合が高く、ペプチドグリカンの構造が変化していることが示唆された。

次に核酸の影響を調べるためにDNase、RNase処理した菌体を用いて、マウス脾細胞でのIL-12誘導活性を評価した。DNaseの影響は認められなかったが、IL-12誘導活性を維持した加熱菌体にRNase処理するとIL-12誘導活性はほぼ失われた。そこで加熱菌体からRNAを抽出したところ、殺菌温度依存的なRNAの分解と、NaClの添加によりRNAの分解が軽減されていることが確認された。

以上の結果から、高温殺菌によりMoLac-1のペプチドグリカン構造が変化し、RNAの分解が引き起こされるが、溶液中へのNaCl添加はそれらを軽減することでIL-12誘導活性保護効果を示すことが示唆された。

Heat killed, Interleukin-12(IL-12), RNA

講演番号：2J11p17
講演日時、会場：3月23日17:15～ J校舎11会場

ヒトロタウイルス感染に及ぼすウシ後期初乳κ-カゼインの防御効果

Inhibition of human rotavirus infection by bovine late colostrum κ-casein

○村西晴香、山本真弓、Cairangzhuoma[1]、稲垣瑞穂[2]、Xijier[1]、
内田健志[3]、川西貴[3]、矢部富雄[2]、金丸義敬[2]（岐阜大院応生・資源生命、[1]岐阜大院連農
[2]岐阜大院連農岐阜大応生・食品生命、[3]小林製薬㈱　中研）

○Haruka Muranishi、Mayumi Yamamoto、Cairangzhuoma[1]、Mizuho Inagaki[2]、Xijier[1]、
Kenji Uchida[3]、Takashi Kawanishi[3]、Tomio Yabe[2]、Yoshihiro Kanamaru[2]
（Grad. Sch. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [1] United Grad. Sch. of Agric. Sci., Gifu Univ.,
[2] Fac. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.,[3] Kobayashi Parmaceutical Co., Ltd.）

【目的】ヒトロタウイルスは乳幼児における深刻な下痢症の最も主要な原因である。我々は牛乳カゼイン成分中のκ-カゼインに抗ヒトロタウイルス活性があり、後期初乳（分娩後6～7日目の初乳）と常乳とでは活性に違いがある可能性を示唆する結果を得ている。本実験では、後期初乳と常乳のκ-カゼイン由来糖ペプチドにおける活性の違いを確認するとともに、阻害活性への糖鎖の関与を検討した。

【方法】定法に従って後期初乳と常乳からカゼインを調製後、Protein G カラムを用いて IgG 抗体を除去した。この抗体除去カゼイン画分をトリプシン消化し、O 型糖鎖の Galβ1-3GalNAc と特異的に結合するレクチンである PNA を固定化したカラムを用いてκ-カゼイン由来糖ペプチドを分取した。感染阻害活性は、MA104 細胞へのヒトロタウイルス MO 株の感染を阻害する作用を調べる中和活性試験により検討した。

【結果】分取したκ-カゼイン由来糖ペプチドに感染阻害活性が認められ、後期初乳カゼインと常乳カゼインの活性はκ-カゼイン糖ペプチドに起因することが示唆された。また、後期初乳由来のものに常乳より強い活性を確認した。後期初乳及び常乳から得たκ-カゼイン由来糖ペプチドの O 型糖鎖除去及びそれらの活性測定について現在検討中である。

human rotavirus,colostrum,κ-casein

講演番号：2J11p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ J校舎11会場

乳タンパク質のヒトロタウイルス感染阻害メカニズムの比較

Comparative studies of inhibitory mechanisms of milk proteins against human rotavirus infection

○稲垣 瑞穂、大野 翔平、山田 佳太[1]、矢部 富雄、鈴木 徹[2]、高橋 毅[3]、中村 吉孝[3]、松田 幹[4]、中込 とよ子[5]、中込 治[5]、金丸 義敬（岐阜大応生・食品生命、[1]香川大・医、[2]岐阜大院連農、[3](株)明治・研究本部、[4]名古屋大院・生命農、[5]長崎大院・医歯薬総合）

○Mizuho Inagaki, Shohei Ohno, Keita Yamada[1], Tomio Yabe, Tohru Suzuki[2], Takeshi Takahashi[3], Yoshitaka Nakamura[3], Tsukasa Matsuda[4], Toyoko Nakagomi[5], Osamu Nakagomi[5], Yoshihiro Kanamaru (Fac. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [1]Fac. of Med., Kagawa Univ., [2]United Grad. Sch. of Agric. Sci., Gifu Univ., [3]Meiji Co., Ltd. [4]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [5]Grad. Sch. Biomed. Sci. and Global COE, Nagasaki Univ.)

【目的】ヒトロタウイルス（HRV）は乳幼児下痢症の主因ウイルスである。我々はこれまでに、牛乳乳清ラクトフォリン（LP）や乳脂肪球皮膜タンパク質PAS6/7がHRV感染に対して強力な阻害活性を示すことを明らかにした[1)]。本研究では、抗HRV活性が報告されているウシ常乳IgG、18 kDaラクトフォリン（LP18）、PAS6/7の3種の乳タンパク質について、in vitroでの感染試験を行い、それぞれの阻害メカニズムについて比較、考察した。

【方法】感染試験にはアカゲザル胎児腎臓MA104細胞およびHRV MO株（G3P[8]）を用いた。細胞へのウイルス接種時を0時間とし、1時間前（前処理）、0時間（結合・侵入：HRV感染と同時にサンプル添加）、2.5時間後（複製a）、11時間後（複製b）にサンプルを1時間添加した。サンプル除去後は2% FCS存在下で培養を続け、感染から16時間後に固定した。間接蛍光抗体法により感染細胞をカウントし、感染阻害率を算出した。中和試験法（サンプルとHRVを1時間インキュベートした後に、この混合物を細胞へ1時間接種し、2% FCS存在下で培養した後に固定）も同時に実施した。

【結果】IgGおよびPAS6/7については、中和および結合・侵入時のサンプル添加に感染阻害が認められたことから、乳タンパク質がウイルスと結合していると考えられた。LP18については、前処理、結合・侵入および中和時のサンプル添加に感染阻害作用が認められた。サンプル添加のタイミングによってLP18の活性の強度は異なるが、50%感染阻害に必要な濃度はいずれの場合も数十μM以下であった。今回検討した3つの乳タンパク質はいずれもHRV接種時（結合・侵入および中和時）に対して阻害活性を示したが、HRV感染成立後（複製時）のサンプル添加では阻害効果が見られなかった。中でもLP18の阻害メカニズムは、PAS6/7やIgGで観察されたウイルス結合能による感染阻害だけでなく、宿主細胞側への何らかの働きかけによる阻害メカニズムも併せ持つと考えられた。

1) Inagaki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1386-1390 (2010)

human rotavirus, lactophorin, PAS6/7

講演番号:2J11p19
講演日時、会場:3月23日17:37～ J校舎11会場

ロタウイルス下痢症に対するチーズ製造時副産物の in vivo 評価

In vivo, evaluation of cheese manufacturing byproduct effect against human rotavirus diarrhea

○加藤浩平、桂知弘、稲垣瑞穂、中村吉孝[1]、高橋毅[1]、矢部富雄、金丸義敬
(岐阜大・応生、[1]（株）明治・研究本部)
○ Kohei Kato, Tomohiro Katsura, Mizuho Inagaki, Yoshitaka Nakamura, Takeshi Takahashi, Tomio Yabe, Yoshihiro Kanamaru (Faculty of Applied Life Science, Gifu University, [1] Division of research and Development, Meiji Co., Ltd.)

［目的］ ロタウイルス下痢症がもたらす人的損失や医療費負担は全世界的に問題となっている。その被害は、発展途上国を中心に死者は毎年60万人以上、日本における直接医療費は年間220億円と推定される。甚大な被害にも関わらず、未だに有効な治療が未だに確立されていない。我々はこれまでにチーズ製造時副産物（チーズホエイ）を精密ろ過（MF）により濃縮したチーズホエイ処理物（MFRF: microfiltration retentate fraction）がロタウイルスに対して感染阻害作用を示すことを報告した[1)]。今回は、乳飲みマウスへのヒトロタウイルス感染を抑える最適なMFRFの投与法について検討した。また、MFRFの主成分のひとつであるα-ラクトアルブミン(α-LA)に着目し、下痢を軽減させる最適なα-LA投与法の検討を行った。
［方法］ 生後5日齢の乳飲みマウス（BALB/c）にヒトロタウイルスMO株を感染させる実験系を用いた。単回投与試験：ウイルス接種の60分前にMFRFを1回投与し、ウイルス感染から24時間ごとに糞便状態を観察した。複数回投与試験：ウイルス接種の60分前、およびウイルス接種から12、24、48、72時間後にMFRFを継続的に投与した。ウイルス接種から24時間ごとに糞便状態を観察した。α-LA投与試験：ウイルス接種後、24、48、72時間後にα-LAの投与と糞便観察を行った。また、ウイルス接種後、12、24、36時間後にα-LAを単回投与し、ウイルス接種後24時間ごとに糞便観察をした。いずれの試験も、PBSに溶解したサンプルを経口投与し、対照群にはPBSを経口投与した。
［結果］ 単回投与試験では、MFRF2.5 mg/ml投与において有意な下痢予防効果が認められた。複数回投与試験では、MFRFの投与量を1.0 mg/mlに下げても下痢の発症を有意に抑える効果が認められた。これらの結果から、MFRFは単回投与でも十分な効果を持つが、複数回投与にすることで、投与量を抑えることが可能であることが示された。また、α-LAの複数回投与は下痢症状の軽減化をもたらし、とりわけ、感染初期症状が確認されてからのα-LA単回投与は有意な早期回復をもたらした。以上の結果から、MFRFは、ロタウイルス下痢症に対する感染予防および症状軽減化を促す有望な食品素材であると考えられる。

[1)] Inagaki *et al. Food Additive*, ed. Yehia El-Samragy, in Tech Open Access Publisher, in press (2011)

human rotavirus, cheese manufacturing byproduct, suckling mouse

講演番号：2J11p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ J校舎11会場

腸内細菌*Enterococcus faecalis* による脱顆粒抑制のメカニズム

Mechanisms for suppression of degranulation by *Enterococcus faecalis*

○伊藤　朋子，高橋　恭子，笠倉　和巳，鴨井　大樹，伊藤　喜久治[1]，百瀬　愛佳[1]，細野　朗，上野川　修一（日大・生資，[1]東大院・農生）

○Tomoko Ito, Kyoko Takahashi, Kazumi Kasakura, Daiki Kamoi, Kikuji Itoh[1], Yoshika Momose[1], Akira Hosono, Shuichi Kaminogawa (NUBS, [1]U.Tokyo)

【目的】マスト細胞は，アレルギー炎症の誘導において中心的な役割を果たし，腸管や皮膚などの外界と接する組織に多く存在する。腸管には大量の腸内細菌が存在しており，腸管のマスト細胞の機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。本研究では，腸内細菌によるマスト細胞のアレルギー応答の調節とその機序を明らかにすることを目的とする。

【方法】13種類のマウス腸内細菌を用いて，マウス骨髄由来マスト細胞（BMMC）の脱顆粒反応に及ぼす影響を評価した。また，細胞内カルシウム濃度および細胞骨格タンパク質アクチンの脱重合に及ぼす影響について評価した。

脱顆粒の測定：野生型および$MyD88^{-/-}$マウスより調製したBMMCを13種類のマウス腸内細菌の加熱死菌体存在下および非存在下で2時間IgE感作した。回収した細胞に抗原を添加し，β-ヘキソサミニダーゼの放出量を測定した。

細胞内カルシウム濃度：BMMCを菌体の存在下および非存在下で2時間IgE感作後，回収した細胞に16μM Fluo-3AMを添加し，37℃，5%CO_2条件下で20分間インキュベートした。その後，抗原を添加してフローサイトメーターで解析した。

重合アクチンの定量：BMMCを菌体の存在下および非存在下で2時間IgE感作し，抗原を添加して脱顆粒反応を誘導した。回収した細胞にサポニンを添加後，蛍光ファロトキシンで重合アクチンを染色し，フローサイトメーターで解析した。

【結果】使用した13種類のマウス腸内細菌はグラム陽性および陰性の両方の細菌を含み，これらすべてにMyD88非依存的な脱顆粒抑制作用がみられた。よって，腸内細菌の添加により，TLRの刺激を介さない経路で脱顆粒が抑制されることが示唆された。中でも，*Enterococcus faecalis* ATCC19433^T(EF)に強い脱顆粒抑制作用が認められた。そこで，EFおよび比較対象として*Escherichia coli* JCM 1649^T(EC)と*Lactobacillus johnsonii* 129（LJ）を用いて抑制機序の解析を行った。結果，細胞内カルシウム濃度の測定では，EFとECの添加により，抗原刺激時の細胞内カルシウム濃度の上昇が抑制されることが観察された。さらに，IgEと抗原の刺激により誘導されるアクチンの脱重合がEFおよびECの添加により抑制されていた。EFとECによるこれらの抑制活性の強さに有意差は認められなかった。一方，脱顆粒抑制作用が最も弱かったLJの添加ではこれらの抑制作用は観察されなかった。以上の結果から，EFの脱顆粒抑制作用の一部は，細胞内カルシウム濃度の上昇の抑制および顆粒と細胞膜の誘導に必要な過程であるアクチンの脱重合の抑制によるが，他に特異的な抑制機序が存在する可能性が示唆された。

mast cell, degranulation, *Enterococcus faecalis*

講演番号：2J12a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ J校舎12会場

UV照射ヘアレスマウスへのヒアルロン酸投与による皮膚状態改善効果

Oral Intake of Hyaluronic Acid improve the Skin Condition in UV-irradiated hairless mice.

○川田千夏[1]、渡部睦人[1]、野村義宏[1]（農工大・硬蛋研[1]）、釣木隆弘[2]、栗原仁[2]、木村守[2]（キユーピー(株)[2]）

○Chinatsu Kawada[1], Mutsuto Watanabe[1], Yoshihiro Nomura[1] (Tokyo Univ. Agri. & Technol.[1]),Takahiro Tsuriki, Hitoshi Kurihara, Mamoru Kimura[2] (Kewpie Co.[2])

【目的】皮膚は常に紫外線に曝露されており、長年かつ繰り返しの紫外線曝露により皮膚は光老化が促進される。ヒアルロン酸は、皮膚において水分保持の働きをもち、この高い水分保持能力から化粧品として広く普及しており、近年では機能性食品としても市販されている。そこで本研究ではUVB照射により光老化様皮膚状態を誘導し、ヒアルロン酸をヘアレスマウスに経口投与することで、ヒアルロン酸の皮膚状態改善効果について検討した。
【方法】Hos：HR-1系雄ヘアレスマウス（6週齢）に6週間UVB照射を施しながら1日1回のヒアルロン酸の経口投与を行った。全6週に亘り背部皮膚の水分量を経時的に、また解剖前に皮膚水分蒸散量を測定した。解剖後、背部皮膚組織標本から表皮厚を測定した。背部皮膚組織よりコラーゲンおよびデコリンを抽出し、ウエスタン・ブロッティングにより解析した。
【結果および考察】UV照射により皮膚水分量の低下、皮膚水分蒸散量の上昇、表皮厚の肥厚、シワの形成などの現象が引き起こされた。ヒアルロン酸投与により、皮膚水分量の有意な回復、皮膚水分蒸散量の上昇抑制傾向、表皮厚の肥厚抑制、シワ形成の軽減効果が示された。また皮膚中のコラーゲン量及びデコリン量もヒアルロン酸投与により増加し、デコリンに関してはUV照射によるデコリンの低分子量化も抑制された。これらのことから、ヒアルロン酸摂取によるUV照射皮膚ダメージの改善効果が示された。

Hyaluronic acid, skin, UV-irradiated hairless mouse,

講演番号：2J12a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ J校舎12会場

UV 照射ヘアレスマウスへのヤマブドウ抽出物投与による皮膚状態改善効果

Effect of *Vitis coignetiae Pulliat* extract on ultraviolet irradiated hairless mouse skin

○川原美紗江、渡部睦人、野村義宏、高橋亨[1]、小浜恵子[1]、江見崇[2]、山下和彦[2]、長澤孝志[3]（農工大・硬蛋白質利用研究施設、[1]岩手県工技センター、[2]岩手大・農学部、[3]ヤエガキ醗酵技研(株)）
○Misae Kawahara, Mutsuto Watanabe, Yoshihiro Nomura, Tohru Takahashi[1], Keiko Kohama[1], Takashi Emi[2], Kazuhiko Yamashita[2], Takashi Nagasawa[3] (Tokyo Univ. Agri. and Technol., [1]Iwate Industrial Research Institute, [2]YAEGAKI bio-industry, Inc., [3]Faculty of Agriculture Iwate University)

【目的】ヤマブドウ（*Vitis coignetiae Pulliat*）は日本列島にのみ自生する野生ブドウの一種で、一般のブドウに比べポリフェノール、鉄分、有機酸等が豊富である。一方でヤマブドウ果実の可食部は非常に少なく、その40%が搾り粕として廃棄され有効な利用がされていない。本研究ではヤマブドウの果汁、搾り粕、葉からの抽出物の経口投与が長期的なUV照射刺激、単回のUV照射刺激に与える影響について検討し、ヤマブドウ素材をまるごと利用することを目的とした。
【方法】長期的なUV照射刺激試験では、Hos：HR-1系、雄、ヘアレスマウス6週齢に6～8週間UVB照射を施しながらヤマブドウの果汁、搾り粕、葉からの抽出物の経口投与を1日1回毎日行った。背部皮膚の水分量、粘弾性を経時的に測定し、解剖後、背部皮膚組織標本から表皮厚を測定した。単回のUV照射刺激試験では、Hos：HR-1系、雄、ヘアレスマウス6週齢に各種ヤマブドウ抽出物を1日1回1週間経口投与し、試験開始1週間後にUVB照射を１度施した。解剖後、血中および皮膚組織中のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)様活性およびマロンジアルデヒド(MDA)量を測定した。
【結果】3種類のヤマブドウ抽出物のうち、絞り粕からの抽出物投与により表皮肥厚化の抑制、皮膚水分量に有意な上昇が見られ、皮膚状態改善傾向を示した。また葉と果汁から抽出物の投与により、皮膚水分量の上昇傾向が見られた。ここから搾り粕からの抽出物が最も、次いで葉と果汁からの抽出物がUVB照射刺激を軽減し、刺激後の皮膚状態を改善することが考えられる。現在単回のUV照射試験の結果を解析中であり、合わせて報告する予定である。

Vitis coignetiae Pulliat, ultraviolet, hairlessmouse

講演番号：2J12a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ J校舎12会場

ビフィズス菌含有乳酸菌飲料摂取による成人女性に対する肌状態改善作用および整腸作用

Effect of milk supplemented with bifidobacteria on skin condition and defecation frequency on healthy adult women.

○米澤寿美子、山本有紀[1]、豊澤聖子[1]、清水(肖)金忠、八重島智子、岩附慧二、古川福実[1]
(森永乳業・食基研、[1]和医大・医)

○Sumiko Yonezawa, Yuki Yamamoto[1], Seiko Toyosawa[1], Jin-zhong Xiao, Tomoko Yaeshima, Keiji Iwatsuki and Fukumi Furukawa[1] (Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [1]Wakayama Medical University Hospital)

【目的】ビフィズス菌には整腸作用をはじめ、様々の生理機能が知られている。一方、女性を対象としたアンケート調査の結果から、便秘と肌症状との関連性が示唆されている。今回は便秘と皮膚トラブルを有する成人女性を対象に、*Bifidobacterium longum* BB536を含有する乳酸菌飲料摂取による肌状態および排便状態に対する影響を検討した。

【方法】皮膚トラブル（アトピー性皮膚炎やにきびなどを有する皮膚症状）のある女性患者28人（年齢 30～62才、40.7±9.2才）を試験対象者とし、ビフィズス菌含有乳酸菌飲料（BB536、20億個/180ml/本）を1日１本、8週間経口摂取させる単群試験を行った。試験期間の0週、4週、8週に①肌状態自覚スコア(アンケート、かゆみに対するVASスコア、Skindex-16)、②排便状態について日誌を記入してもらった。各評価項目の値については0週値に対して4週値および8週値をpaired t検定、経時的変化についてはrepeated ANOVA検定で群内比較を行った。また、マイクロスコープを用いて肌の状態を写真記録した。

【結果】ビフィズス菌BB536含有乳酸菌飲料の摂取により、つや、はり、毛穴の目立ち、赤み、乾燥、化粧のり、にきび数、にきびの程度などが改善され、皮膚のかゆみ程度を評価したVASスコアが改善された。また、皮膚疾患特異的なQOL指標であるSkindex-16において、SymptomsやEmotionsなどの項目が有意に改善された。排便については、回数の増加、便性や排便の爽快感スコアの改善が認められた。摂取前と比較した排便回数の変動値と、にきびの程度のスコア変動値に有意な負の相関が見られた。マイクロスコープ画像でも一部の被験者において、きめや乾燥状態が改善されていることが認められた。以上の結果から、ビフィズス菌BB536含有乳酸菌飲料の摂取による肌状態や排便状態に対する改善作用が示唆され、整腸作用が肌状態改善の作用機序の１つであると考えられる。

Bifidobacterium, skin condition, defecation

講演番号：2J12a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ J校舎12会場

パイナップル果実由来グルコシルセラミドが乾燥肌モデルマウスの皮膚機能に与える影響とその作用機構

Effects of glucosylceramide extracted from pineapple in dry skin model mouse and it’s mechanism

○湯浅 弘樹、西谷 洋輔[1]、野嶋 潤[2]、桑原 浩誠[2]、水野 雅史（神戸大院・農、[1]神戸大・自然先端、[2]丸善製薬（株）・研究開発）

○Hiroki Yuasa, Yosuke Nishitani[1], Jun Nojima[2], Hiroshige Kuwahara[2], Masashi Mizuno(Agric. Sci., Kobe Univ., [1]Adv. Sci. Technol., Kobe Univ., [2]Maruzen Pharmaceuticals Co.)

【目的】スフィンゴ脂質の一種であるセラミドは角質層の細胞間隙を埋めている主用成分である。主に保湿など皮膚のバリア機能に重要な役割を果たしており化粧品などにも多く含まれる。本研究ではパイナップル果実より得られたグルコシルセラミド含有画分を乾燥肌モデルマウスに経口投与し、皮膚機能に与える影響及び*in vitro*での試験によりその作用機構を検討した。
【方法】Hos:HR-1ヘアレスマウス（雄性5週齢）を、通常飼料（N）群、乾燥肌を誘導する特殊飼料（HR-AD）を投与する対照（C）群、HR-ADにパイナップル果実由来グルコシルセラミドを0.01%または0.1%含む、PG0.01群、PG0.1群の4群に分けた。飼料投与開始後、背部皮膚の経表皮水分蒸散量（TEWL）、表皮水分量、角層水分量を測定した。飼育4週間後、背部皮膚から全RNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析を行った。さらにパイナップル、コメ、コーン、コンニャク由来グルコシルセラミドをそれぞれ、ヒト小腸上皮様細胞Caco-2細胞とマウスマクロファージ様細胞RAW264.7細胞の共培養系に供した。サンプル処理3時間後にLPSでRAW264.7細胞を刺激後、さらに3時間培養しRAW264.7細胞の全RNAを抽出し、定量RT-PCR法でIL-23 mRNA発現量を測定した。
【結果】PG0.01群とPG0.1群は、C群で3、4週目に見られたTEWL値の上昇を有意に抑制した。同様に表皮と角質の水分量の低下、シワの形成、皮膚組織における表皮の肥厚の抑制が確認された。DNAマイクロアレイ解析により、C群に比べPG0.01群とPG0.1群で細胞増殖に関連する遺伝子の発現増加が認められた。さらに*in vitro*の試験から、パイナップル果実由来グルコシルセラミドによるIL-23 mRNAの発現量増加が認められた。IL-23により活性化するTh17細胞の増加にアレルギー皮膚炎を抑制するという報告がある。これらの結果からパイナップル果実由来グルコシルセラミドの経口摂取は、Th17細胞の活性化により乾燥肌モデルマウスの皮膚バリア機能維持に有効であることが示唆された。今後さらにTh17細胞の活性、下流のシグナル機構について検討したい。

Glucosylceramide, Dry skin, IL-23

講演番号：2J12a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ J校舎12会場

タイトル ： コラーゲンペプチド経口摂取時の皮膚へのペプチド移行性評価

Title ： Evaluation of translocation to skin after oral administration of collagen hydrolysate

○市川聡美、大原浩樹、伊藤恭子、大庭知慧、河端恵子、古賀仁一郎
(株式会社 明治・食機能科学研究所)
○Satomi Ichikawa, Hiroki Ohara, Kyoko Ito, Chisato Oba, Keiko Kawahata, Jinichiro Koga
(Meiji Co., Ltd. Food Science Research Labs.)

【目的】我々は、ヘアレスマウスを用いて、コラーゲンペプチドの経口摂取が、紫外線(UVB)単回照射後の皮膚損傷に対して、抑制効果を示すことを明らにしている[1)]。また、コラーゲンペプチドの経口摂取により、9種のジ・トリペプチド（Ala-Hyp、Ala-Hyp-Gly、Ser-Hyp-Gly、Phe-Hyp、Pro-Hyp、Pro-Hyp-Gly、Gly-Pro-Hyp、Ile-Hyp、Leu-Hyp）が血中で検出されることを報告している[2)]。そこで、本研究では、作用部位である皮膚へのペプチドの移行性を検討することを目的とした。
【方法】ヘアレスマウス（Hos:HR-1）に魚鱗由来コラーゲンペプチドを経口投与（2 g/kg B.W.）し、投与0, 15, 30, 60, 120および360分後に採血、ならびに灌流後の背部皮膚を採取した。血中および皮膚中の9種のジ・トリペプチドは、LC-MS/MSにて定量した。
【結果】コラーゲンペプチドを経口投与することにより、皮膚中で9種のジ・トリペプチドが経時的に検出されることを確認した。中でもPro-Hyp、Ala-Hyp-GlyおよびSer-Hyp-Glyが血漿中と同様、比較的高濃度に存在することが確認され、血中移行量の多いペプチドが皮膚へも多く移行することが考えられた。以上のことから、経口摂取したコラーゲンペプチドは、ペプチドの形で血中へ移行し、作用部位である皮膚へ到達することが確認された。

1) Oba, C. et al.,International Society For Nutraceuticals & Functional Food (2010)
2) Ohara, H. et al., J. Agric. Food Chem., 55, 1532-1535 (2007)

Key words: collagen, skin, peptide

講演番号：2J12a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ J校舎12会場

タイトル生もと乳酸菌による皮膚炎症抑制効果

Title Skin inflammation inhibitory effect of lactic acid bacteria isolated from *kimoto*

永汐 祐紀、竹之下 柳一朗、渡辺 敏郎[1]、石 知史[1]、高橋 俊成[2]、近藤 紗代[2]、鈴木 卓弥、○田辺 創一（広島大院生物圏、[1]ヤエガキ醗酵技研、[2]菊正宗酒造総研）

Yuuki Nagashio, Ryuichiro Takenoshita, Toshiro Watanabe[1], Satoshi Ishi[1], Toshinari Takahashi[2], Sayo Kondo[2], Takuya Suzuki, ○Soichi Tanabe (Hiroshima Univ, [1]Yaegaki, [2]Kiku-masamune)

【目的】皮膚は外界との接点をなすという点で腸管と類似の粘膜免疫・バリア機構を有している。我々は、いくつかの乳酸菌が腸炎あるいは腸管バリア損傷を修復することを *in vitro* および *in vivo* で示してきており、皮膚粘膜に対しても同様の効果があるという仮説を立て、解析を進めてきた。本研究では、アトピー性皮膚炎のモデルである NC/Nga マウスを用い、清酒醸造用乳酸菌（生もと乳酸菌）による皮膚炎症抑制効果を検討した。

【方法】メス4週齢の NC/Nga マウスの皮膚に、8週間にわたり、*Leuconostoc mesenteroides* LK-16（LK-16株）を隔日塗布した。塗布にあたっては、3.3×10^9の LK-16株を PBS に懸濁し、一定の部位に投与した。一方、対照群には PBS のみを塗布した。飼育終了後に皮膚を単離し、real-time PCR により遺伝子発現を解析した。

また、Transwell 上で培養した正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）に LK-16株を添加し、TNF-α＋IFN-γ刺激を与えた。経上皮電気抵抗（TER）値の推移により、バリア機能の評価を行い、培養上清中の IL-8 産生量を炎症の指標とした。さらに、NHEK における遺伝子発現変動も検討した。

【結果】対照群と比較して、LK-16株塗布群のマウスの皮膚では、タイトジャンクションタンパク質の1つであるオクルディンの発現が約3倍上昇しており、塗布により皮膚バリアが強固になったと考えられた。一方、炎症の指標となるシクロオキシゲナーゼ-2（cox-2）、マトリックスメタロプロテアーゼ-9（MMP9）、誘導型NO合成酵素（iNOS）の発現は、対照群の1/2以下に低下したことから、塗布により炎症が抑制されたと考えられた。

NHEKにおいては、TNF-α＋IFN-γ刺激によって TER 値が減少、IL-8 産生が上昇、クローディン-1 やオクルディンの mRNA 発現が低下したが、LK-16株添加はこれらの変化を回復させた。

以上の結果から、生もと乳酸菌LK-16株は、皮膚バリアを強固にするとともに、炎症を抑制することが明らかとなった。今後は、病態モデルに限定せず、日常生活への応用を視野に入れ、検討する予定である。

lactic acid bacteria isolated from *kimoto*, skin inflammation, *Leuconostoc mesenteroides*

講演番号：2J12a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ J校舎12会場

タイトル：生もと乳酸菌を用いた米ヌカ発酵液のヒアルロン酸産生促進効果

Title : Lactic acid bacteria-fermented rice bran extracts promote the synthesis of hyaluronan

○近藤 紗代、増田 康之、高橋 俊成、渡辺 敏郎[1]、石 知史[1]、田辺 創一[2]、溝口 晴彦（菊正宗酒造総研、[1]ヤエガキ醗酵技研、[2]広島大院生物圏）

○Sayo Kondo, Yasuyuki Masuda, Toshinari Takahashi, Toshiro Watanabe[1], Satoshi Ishi[1], Soichi Tanabe[2], Haruhiko Mizoguchi (Kiku-masamune, [1]Yaegaki, [2]Hiroshima Univ.)

【目的】清酒製造では酵母を純粋培養した「酒母」を発酵のスターターとして用いる。生もと酒母とは、製造過程の初期に天然の乳酸菌が増殖し、その乳酸菌が生成する乳酸によって雑菌を淘汰した後、優良な清酒酵母のみを培養する酒母製造方法である。生もと酒母から単離された*Leuconostoc mesenteroides* LK-16株（LK-16株）は皮膚バリア機能保護効果が高い乳酸菌として選抜された菌株であることから、皮膚への作用という点に着目し、LK-16株を米ヌカにて培養し得られた発酵液の機能性について新たに探索した。

【方法・結果】脱脂した米ヌカに酵素剤を添加して糖化処理した後、グルコース濃度を調整し米ヌカ培地とした。この米ヌカ培地にLK-16株を接種し、30℃、24時間培養後、遠心分離して菌体と発酵液とを分離した。回収した発酵液にエタノールを添加して攪拌後、生じた沈殿物を濾過により除去した。その後、減圧濃縮によりエタノールを留去し、これを発酵清澄液とした。発酵清澄液の皮膚に対する効果を調べるために、正常ヒト皮膚線維芽細胞を用いて評価した。発酵清澄液を正常ヒト皮膚線維芽細胞に添加して3日間培養したところ、細胞賦活効果が見られた。さらに同様にして培養した培養上清中のヒアルロン酸量を測定したところ、発酵清澄液を添加したものでは米ヌカ培地を添加したものと比較して有意にヒアルロン酸量が増加した。このことから、LK-16株の菌体そのものだけでなく、米ヌカを培地とした乳酸菌（LK-16株）発酵液にも皮膚に対する有用な効果があることが示された。

lactic acid bacteria, hyaluronan, *Leuconostoc mesenteroides*

講演番号：2J12a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ J校舎12会場

食餌性スフィンゴ脂質の皮膚バリア向上作用の機構解明

A potential mechanism for skin barrier improvement function of the dietary sphingolipids

○段　晶晶、菅原 達也、間　和彦[1]、平田　孝（京大院・農、[1]日本製粉（株））
○Jingjing Duan, Tatsuya Sugawara, Katsuhiko Aida[1], Takashi Hirata (Kyoto Univ., [1]Nippon Flour Mill Co. Ltd.)

【目的】スフィンゴ脂質の骨格成分であるセラミドは皮膚の保湿に重要であることが知られている。近年、スフィンゴ脂質の摂取によって、皮膚のバリア機能が向上し、美肌効果が示されることが報告されている。しかし、その作用機構についてはよくわかっていない。そこで本研究では、スフィンゴ脂質の経口摂取による皮膚バリア向上作用の機構を明らかにすることを目的とし、ヘアレスマウスと正常ヒト新生児表皮ケラチノサイトを用いた解析を行った。
【方法】ヘアレスマウスを特殊飼料(HR-AD)で10週間飼育し、アトピー性皮膚炎モデルマウスを作成した後、グルコシルセラミド、ガラクトシルセラミドまたはスフィンゴミエリンを0.1%添加した飼料で6日間飼育した。皮膚の評価として、表皮水分蒸散量の変化、及び皮膚レプリカと組織切片を解析した。また、表皮層における脂質含有量とスフィンゴ脂質代謝関連酵素および炎症性因子のmRNA発現量を測定した。また、スフィンガニン、スフィンゴシン及びスフィンガジエニンをヒト新生児表皮ケラチノサイトに添加して24時間培養した後、セラミド合成酵素のmRNA発現量を測定した。
【結果】HR-AD 食によって作成されたアトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて、スフィンゴ脂質の摂取によって、皮膚炎症の緩和、表皮水分蒸散量の有意な減少が示された。皮膚のレプリカ解析から、シワの減少とキメの増加が認められた。皮膚の組織学的評価から、グルコシルセラミドあるいはスフィンゴミエリンの摂取により、表皮の肥厚化は有意に抑制された。表皮層脂質含有量の変化は認められなかったが、表皮層のスフィンゴ脂質代謝関連酵素 mRNA の発現が変化し、特にセラミド合成酵素発現量が有意に増加した。さらに、0.001-0.1μM のスフィンゴイド塩基処理により、ケラチノサイトのセラミド合成酵素の mRNA 発現量が有意に増加した。これらの結果から、食餌性スフィンゴ脂質は表皮のセラミド合成を上方制御することによって、皮膚バリア向上作用を示す可能性が見出された。本研究は生研センターイノベーション創出事業および財団法人糧食研究会の助成により行われた。

Sphingolipids, skin barrier functions, ceramide synthesis

講演番号：2J12a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ J校舎12会場

牛乳由来の極性脂質がマウス毛包構成細胞群の活性に及ぼす影響

Bioactivity of polar lipids derived from bovine milk on the cells associated with rodent hair follicle

○澤田 拓、小田 洋三[1]、今野 円、小林 謙、玖村 朗人（北大院農、[1]北大農）
○Taku Sawada, Yozo Oda[1], Madoka Konno, Ken Kobayashi, Haruto Kumura (Hokudai Graduate School, [1]Hokudai)

【目的】牛乳由来脂質の新たな機能性をマウス毛包構成細胞群の活性に及ぼす影響を指標として探索するために、マウス背部皮膚への継続塗布、及びマウス毛乳頭細胞を用いた細胞培養実験を行った。
【方法】牛乳から、クロロホルム/メタノール溶液及びアセトン分画によって極性脂質を分離し、エタノール可溶画分を塗布試料として用いた。背部をバリカンで剃毛したC57BL/6Nマウス（8週齢、メス）を1週間予備飼育した後、塗布試料を3週間に亘って剃毛部に継続塗布した。対照群としてエタノール、及びミノキシジル溶液（RiUP、大正製薬）を用いた。成長期誘導への評価は皮下組織厚を真皮厚で除した値を指標とした。さらにマウス頬髭より毛乳頭細胞を分離し、本極性脂質添加による増殖性への影響を試験した。分離した毛乳頭を10%FBS、FGF-2を含むD-MEM/F-12培地を用いて37℃、5%CO_2条件下で培養（P0）し、P2細胞を試験に用いた。毛乳頭細胞を96ウェルのマイクロプレートに4.0×10^3 cells/wellとなるように分注し、10%FBSを含むD-MEM/F-12培地を用いて37℃、5%CO_2条件下で2日間培養した。培養後、上記試料を添加したD-MEM/F-12に培地を交換し、さらに培養を継続した。培地交換3日後に、Cell Counting Kit-8（同仁化学研究所）を用いて増殖性を確認した。また陰性対照はD-MEM/F-12、陽性対照は10%FBSを含むD-MEM/F-12で培養した。
【結果】塗布実験では、エタノール塗布群と比較して試料塗布群において成長期が早期誘導される傾向が見られ、評価指標に有意な差が認められた。また、本極性脂質添加による毛乳頭細胞の増殖性への影響は見られなかった。以上の結果より、牛乳由来の極性脂質は経皮吸収性を有し、マウス背部毛周期において成長期を早期誘導することが示された。しかしながら、本極性脂質が毛乳頭細胞への増殖性には影響は及ぼさなかったことから、毛乳頭細胞の遺伝子発現への影響、毛母細胞への影響、あるいは細胞外マトリックスへの影響が示唆された。

bovine milk, hair follicle, polar lipid

講演番号：2J12a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ J校舎12会場

Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Proを含む食品の摂取が冷え性に与える影響

Effect of food containing Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro on excessive sensitivity to cold.

○野中 敦子、中村 哲平、大木 浩司、池谷 敏郎[1]（カルピス(株) 発酵応用研究所、[1]池谷医院）
○ Atsuko Nonaka, Teppei Nakamura, Kohji Ohki, Toshiro Iketani[1] (Microbiology & Fermentation Laboratory, Calpis Co., Ltd., [1]Iketani Clinic)

【目的】
カゼイン由来トリペプチドVal-Pro-Pro（VPP)、Ile-Pro-Pro（IPP）はACE阻害活性を有し、血圧低下作用を示すことが報告されている。さらに近年、VPP、IPPは血管内皮機能改善作用、血管拡張作用を示すことが明らかとなっており、血流改善や血流と関連する自覚症状（冷え性など）の改善に有用である可能性が考えられる。そこで、本研究ではVPP、IPPを含む食品の摂取が冷え性に与える影響とそのメカニズムについて検討することを目的とした。
【方法と結果】
試験１：冷え性を自覚する30～50歳の女性11名を対象にVPP、IPP含有カゼイン加水分解物のタブレットを4週間摂取させ、摂取前後に冷水負荷試験、アンケート調査を行った。冷水負荷試験では右手の甲から先を15℃の冷水に3分間浸した後、サーモグラフィーにより表面温度を経時的に測定し、回復の程度を評価した。アンケート調査では冷え性に関する15項目について、自覚症状を5段階で評価させた。その結果、冷水負荷30分後の手の表面温度が摂取前後で上昇する傾向、すなわち体温回復が高まる傾向が認められた。アンケート結果では、「手足の冷え」「腰の冷え」「肩凝り」など8項目について摂取前後で有意に改善し、冷え性の自覚症状の改善が認められた。
試験２：ヘアレスマウスにVPP、IPPを単回経口投与し、レーザードップラー血流計により背部の血流量を測定し、同時にサーモグラフィーにより背部の表面温度を測定した。その結果、対照群と比較して背部の血流量に有意な増加が認められた。また、背部の表面温度についても有意な上昇が認められた。
【考察】
VPP、IPPを含む食品の摂取は冷え性を改善する可能性が示唆された。また、そのメカニズムの一つとして、VPP、IPPが血流量を増加させることにより、体温を上昇させる作用が推察された。

peptide, blood flow, body temperature

講演番号：2J12a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ J校舎12会場

抗老化乳酸菌の探索とその機能性に関する研究

Screening for Anti-Aging Lactic Acid Bacteria and its Functionality

○ 原田　額郎、Pawat Pattarawat[1]、松本貴之[2]、森松文毅[2]、片倉喜範[1,3]（九大院・シス生、[1]九大院・生資環、[2]日ハム・中研、[3]九大院・農院）

○ Gakuro HARADA, Pawat PATTARAWAT[1], Takashi MATSUMOTO[2], Fumiki MORIMATSU[2], Yoshinori KATAKURA[1,3](Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ, [1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]R&D Center, Nippon Meat Packers Inc., [3]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

【目的】カロリー制限シグナルの下流シグナル分子として知られ、延命・抗老化因子として機能するサーチュインファミリータンパク質のほ乳類ホモログの一つ SIRT1 は、これまでに様々な組織において抗老化機能を発揮していることが明らかになっている。本研究では、この SIRT1 発現を、食品と生体との接点としての腸管において増強する食品を探索するためのシステムを構築すると共に、その食品の機能性や分子基盤を明らかにすることを目的として研究を行なった。

【方法】ヒト結腸ガン由来の細胞株 Caco-2 細胞をモデル細胞株として用い、SIRT1 プロモーター制御下で EGFP を発現するベクターを安定導入した組換え Caco-2 細胞を樹立した。食品としては、乳酸菌の加熱死菌体を用いた。樹立細胞株に乳酸菌を 30 μg/mL の濃度で添加させた後 3 日間培養し、フローサイトメーター及びイメージングサイトメーターを用いて EGFP の蛍光の変化を追跡した。また、Caco-2 細胞内の内在性 SIRT1 遺伝子発現の変化を、定量 RT-PCR を用いて評価した。β-カテニン活性は、その転写活性可能を指標に、ルシフェラーゼアッセイにより評価した。また β-カテニン依存的な増殖を示す細胞としてヒト結腸腺癌細胞株 DLD-1 細胞を用い、その増殖に対する効果を検証した。

【結果】フローサイトメーター及びイメージングサイトメーターを用いて SIRT1 プロモーター活性を増強しうる乳酸菌を探索した結果、60 株の乳酸菌サンプルから数種の SIRT1 増強乳酸菌株候補を選択した。このうち、T2102 株は Caco-2 細胞内の内在性 SIRT1 発現を増強しうることが定量 RT-PCR 解析により明らかとなった。この T2102 株により誘導される SIRT1 増強は、Caco-2 細胞上の TLR 依存的であるとともに、炎症反応惹起の結果引き起こされたものではないことが明らかとなった。さらに、T2102 は SIRT1 の下流因子として β-カテニン活性を抑制し、その結果として β カテニンに依存的な増殖を示す DLD-1 細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。以上の結果から、T2102 は SIRT1 を発現増強・活性化させることによって、β-カテニンを不活化し、β-カテニン依存的な結腸癌細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

SIRT1, Lactic acid bacteria, β-catenin

講演番号：2J12a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ J校舎12会場

大豆イソフラボンの美白効果

Skin-whitning effects of soy isoflavones

○上野 省一、鳥居 宏右（(株) ノエビア　研究開発部）
○Shoichi Ueno, Kosuke Torii (Noevir Co., Ltd. Department of R&D)

【目的】イソフラボンは、女性ホルモン様作用および抗女性ホルモン様作用を有することが知られており、健康食品として広く利用されている。近年、さまざまな美肌作用を有する香粧品有効成分としても注目されており、我々はこれまでにイソフラボンの皮膚由来細胞に対する細胞賦活作用や保湿関連因子の産生促進作用などを明らかにしてきた。今回、我々は大豆イソフラボン類の三次元皮膚モデルおよび皮膚由来メラノサイト（色素細胞）に対する美白作用について研究を行なった。

【方法】イソフラボン類としてダイゼイン、ゲニステイン、ダイジン、ゲニスチンの計４種類およびβ-エストラジオールについて検討した。メラノサイトを含む三次元皮膚モデル（LabCyte EPI-MODEL：ジャパンティッシュエンジニアリング）を15日間培養し、メラノサイトの黒化への影響を評価した。また単層培養したメラノサイト用い、チロシナーゼ活性抑制作用を測定した。

【結果】三次元皮膚モデルの培養においてゲニステイン、ゲニスチンおよびβ-エストラジオールに黒化抑制が観察された。この結果から、ゲニステインおよびその配糖体には美白作用があると考えられた。一方、チロシナーゼ活性抑制作用を評価したところ、β-エストラジオールは抑制作用を示したが、ゲニステインおよびゲニスチンは抑制作用を示さなかった。従って、β-エストラジオールの美白作用はチロシナーゼ活性抑制に起因したメラニン合成抑制作用と考えられるが、ゲニステインおよびゲニスチンによるイソフラボンの美白作用はチロシナーゼ活性抑制に起因しない経路によると考えられる。

skin-whitning, isoflavone, genistein

講演番号：2J12a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ J校舎12会場

カルノソールとロットレリンのメラニン合成阻害作用に関する研究

Study on inhibitory action of carnosol and rottlerin on melanogenesis

○白杉一郎[1,2]、榊原陽一[1,3]、山崎正夫[3]、西山和夫[3]、松井隆史[2]、水光正仁[1,3]
（1宮崎大院・農工総合・生物機能、2株式会社くらこん、3宮崎大・農・応生科）
○Ichiro Shirasugi[1,2], Yoichi Sakakibara[1,3], Masao Yamasaki[3], Kazuo Nishiyama[3], Takashi Matsui[2], Masahito Suiko[1,3]
(1Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki, 2Kurakon Co., Ltd., 3Department of Biochemistry and Applied Biosciences, University of Miyazaki)

【目的】化粧品開発において美白成分の探索にはB16メラノーマ細胞を用いたメラニン産生抑制試験が広く用いられている。しかしながら、試験日数が長いこと、測定系が煩雑なことなどから、より広範な化合物をスクリーニングする目的でハイスループットな試験法開発が求められている。本研究ではレポーターアッセイによる新規の美白効果評価技術の開発を行い、さらにその技術を用いて美白効果が見出されたカルノソールとロットレリンのメラニン産生抑制作用の機序解明を試みた。

【方法・結果】チロシナーゼのプロモーターにより応答するレポーター細胞を樹立した。この細胞を用いて、メラニン産生抑制効果が既存のアルブチンなどの化合物による検証を行い、アッセイ系を確立した。50種類以上の化合物で評価を行ったところ、カルノソール、ロットレリンを見出した。カルノソールはローズマリーに含まれるフェノール性のジテルペンの化合物で、これまでに抗酸化作用や抗炎症効果が報告されている。ロットレリンはアカメガシワという植物に含まれている赤色色素の主成分でPKC-δの阻害剤として用いられている。
カルノソールとロットレリンは既存の美白成分であるアルブチンよりも低い濃度で強いメラニン産生抑制効果を示した。さらに、ウエスタンブロッティング法を用いてB16細胞のチロシナーゼ発現量を調べたところ、処理濃度依存的にチロシナーゼの発現量が減少することが観察された。またRT-PCR法を用いて転写因子であるmicrophthalmia-associated transcription factor (MITF)やチロシナーゼ関連タンパク質であるTRP-1とTRP-2のmRNAレベルでの発現量を調べたところ、カルノソールはMITFとTRP-1の発現を抑制していた。一方、ロットレリンはMITFの発現を抑制したが、TRP-1の発現には影響しなかった。これらの結果よりカルノソールとロットレリンは転写因子のMITFの発現を抑制することでチロシナーゼの発現を抑制し、メラニンの合成を阻害することが示唆された。

Keyword：tyrosinase, carnosol. rottlerin

講演番号：2J12a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ J校舎12会場

植物アントシアニジンは骨破壊を抑制する

Preventive effects of anthocyanidins on osteoporotic bone loss.

○森脇　佐和子，鈴木　恵子[1]，井上　文秀[2]，村松　昌，野村　篤志[2]，新飯田　俊平（長寿研・遺伝子蛋白質解析室，[1]昭和大歯・歯科薬理，[2]日本製薬工業（株））

○ Sawako Moriwaki, Keiko Suzuki[1], Fumihide Inoue[2], Masashi Muramatsu[1], Atsushi Nomura[2], Shumpei Niida (NCGG, [1]Showa Univ. [2]Nihon Seiyaku Kogyo)

【目的】高齢者に多発する骨折の多くは骨粗鬆症が原因である。骨量を維持することで骨粗鬆症を予防する機能性食品の開発を目的に、本研究では植物アントシアニンに着目し、これらの骨代謝に与える影響について検討した。

【方法】マウスマクロファージ由来RAW246.7細胞を用いた破骨細胞誘導系に、５種類のアントシアニジンを添加培養後、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色による破骨細胞誘導阻害効果を評価した。生体での効果を評価するために、骨吸収因子GST-RANKLによる誘導型骨粗鬆症モデルマウスを用いた検討を行った。C57BL/6マウスにGST-RANKLを腹腔投与する３日前よりアントシアニジンの経口投与を開始し、GST-RANKL投与後さらに14日間アントシアニジンの投与を継続した。投与終了後、マウスより摘出した大腿骨をマイクロCT等により骨形態計測学的解析を行った。

【結果】破骨細胞誘導系を用い、5種類のアントシアニジンの評価を行った。その結果、３種類で破骨細胞誘導阻害効果が認められ、２種類ではまったく効果がなかった。効果のあった３種類のうち、とくに効果のあった２つについて、*in vivo*での効果を検討した。骨粗鬆症モデルマウスにそれぞれのアントシアニジンを上記日程で経口投与した。投与終了後、マウス大腿骨を摘出し、同骨遠位端のマイクロCTによる解析を行った。その結果、アントシアニジン投与マウスでは骨粗鬆症モデルに比べ、海面骨量は維持され、未処理のコントロール群と同等もしくはやや多くの骨量レベルを示した。骨組織の骨形態計測による解析では、どちらのアントシアニジン投与マウスにおいても、骨吸収のパラメーターである破骨細胞数・破骨細胞接着面・骨吸収面のいずれの数値とも顕著に減少を示した。一方、骨形成のパラメーターである骨芽細胞数・骨形成面・類骨量は未処置コントロール群と同等またはそれ以上の値を示した。なお、アントシアニジン投与による体重変化等については特に異常は認められなかった。

以上の結果より、アントシアニジンは*in vivo*においても破骨細胞形成の阻害効果を発揮し、骨吸収の亢進を強く抑制している事が示された。また、形態学的な観察においてはアントシアニジンの骨芽細胞へは影響はほとんど認められなかった。今回効果のあったアントシアニジンの構造上の共通点から、B環に２つの水酸基と、さらに水酸基またはメトキシ基を一つ有することが阻害効果をもたらす要因ではないかと推察された。この効果は、配糖体成分（アントシアニン）としても低減がなかったことから、食品成分としての機能も保持されており、経口摂取による一定の効果が得られる可能性があると思われる。

anthocyanidin, osteoporosis, osteoclast

講演番号：2J12a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ J校舎12会場

希少糖 D-プシコースの *C. elegans* 寿命延長効果

Lifespan-extending effect of the rare sugar, D-psicose on *Caenorhabditis elegans.*

○佐藤正資、砂古口博文、大石有紗、木下由香、藤沢俊樹、坂下健太、新谷知也[1]、大隈一裕[1]、何森　健[2]（香川大・農、[1]松谷化学工業(株)、[2]香川大・希少糖研究セ）

○Masashi Sato, Hirofumi Sakoguchi, Arisa Ooishi, Yuka Kinoshita, Toshiki Fujisawa, Kenta Sakashita, Tomoya Shintani[1], Kazuhiro Okuma[1], Ken Izumori[2] (Fac. of Agric., Kagawa Univ., [1] Matsutani Chemical Industry, [2] Rare Sugar Res. Center, Kagawa Univ.)

【目的】摂取カロリーの制限によって寿命が延長することが，線虫，ショウジョウバエ，マウス，サルなど多くの実験動物で知られている。人においてもカロリー制限は加齢性疾患の発症を遅らせ，寿命を延ばすと考えられている。しかし，生涯にわたってカロリー制限食を続けることは非常に困難である。そこで，食事と一緒に摂取することでカロリー制限と同様の効果が得られるカロリー制限模倣物質(calorie restriction mimetic）の開発が注目されている。現在まで，いくつかのカロリー制限模倣物質の候補が報告されており，例えば，解糖系酵素の阻害剤2-deoxy-D-glucose，Sirt2を活性化するポリフェノールresveratrolなどがある。しかし，これらの物質は毒性や効果の点で問題があり実用化には至っていない。演者らはD-フルクトースのC3エピマーであるノンカロリー甘味料D-プシコースがカロリー制限模倣物質として働き，動物の寿命を延長する効果があるのでは，と考えた。モデル生物である線虫*Caenorhabditis elegans*を用いて D-プシコースの寿命延長効果を明らかにするとともに，その作用メカニズムについて検討を行った。

【方法】*C. elegans*は野生株 N2と酸素高感受性 *mev-1* 変異体を用いた。同調培養によって得られた若成虫を，D-プシコースを含む液体培地へ移し，20℃で振とう培養した。一日おきに観察，生死を判定し，生きている線虫のみを新しい培地に移しかえた。すべての線虫が死ぬまで培養を続け，平均寿命を算出した。Real-time PCRを用いて酸化ストレス関連遺伝子(SOD,カタラーゼ）の発現量を測定した。また，これら酸化ストレス関連酵素の酵素活性についても測定した。

【結果】野生株N2において，28mM D-プシコース処理線虫の平均寿命は25.1日（対照区，20.9日）となり20％の延長が認められた。Real-time PCRの結果から，ミトコンドリア性 Mn-SODとカタラーゼの発現量上昇が認められ，それらの酵素活性も上昇していた。以上の結果から，D-プシコースによる寿命延長は，線虫の酸化ストレス耐性を上昇させることで引き起こされると考えられた。

lifespan, rare sugar, *Caenorhabditis elegans*

講演番号：2J12p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ J校舎12会場

大豆サポニンの抗肥満活性に関する研究

Study on anti-obesity effect of soybean saponins.

○飯塚 正浩、白岩 雅和（茨城大・農・食品生化）
○Masahiro Iitsuka, Masakazu Shiraiwa (Ibaraki Univ.)

【目的】大豆サポニンは、大豆（*Glycine max* [L.]）が生産する二次代謝産物であり、アグリコン構造の違いによりA、B、E、およびDDMPグループの4種類に分類される。大豆サポニンの生理機能としては、抗肥満作用、抗がん作用、抗酸化作用など多くの報告があるが、各グループレベルの精製サポニンを用いた研究例は少ない。そこで本研究では、生活習慣病の原因となる肥満の予防という観点から、大豆サポニンの有する抗肥満活性を各グループレベルで評価し、最も有効な大豆サポニンを特定することを目的とした。
【方法】乾燥大豆種子の胚軸から含水エタノールにより粗配糖体成分を抽出し、水－ブタノールによる液－液分配や複数のオープンカラムクロマトグラフィーによって、A、B、E、およびDDMPグループサポニンを精製した。得られた各グループサポニンの抗肥満活性は、マウス前駆脂肪細胞3T3-L1を用いた脂肪蓄積抑制作用および脂肪分解促進作用を調べることにより評価した。前者は前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化誘導の際に蓄積される脂肪の量をOil red O染色により評価し、後者は分化誘導後の脂肪細胞に蓄積した脂肪が分解される際に遊離するグリセロール量を測定することで評価した。
【結果および考察】まず脂肪蓄積抑制作用を評価した結果、EおよびDDMPグループサポニンの活性が強く、62.5、125、250 μg/mlの試験濃度においてEグループサポニンは脂肪蓄積率をそれぞれ92、57、10 %に抑制し、DDMPグループサポニンはそれぞれ66、18、10 %に抑制した。Bグループサポニンは同試験濃度において脂肪蓄積率をそれぞれ87、82、85 %に抑制したが、EグループサポニンやDDMPグループサポニンと比べて活性が弱く、その活性は濃度に依存しなかった。一方でAグループサポニンは同試験濃度における脂肪蓄積率がいずれも100 %以上を示し、未処理対照よりも脂肪蓄積率を増加させる傾向が見られた。続いて脂肪分解促進作用を評価した結果、全てのグループサポニンに脂肪分解促進作用が見られ、脂肪蓄積抑制作用と同様、EおよびDDMPグループサポニンの活性が強く、62.5、125、250 μg/mlの試験濃度においてEグループサポニンは脂肪分解率をそれぞれ74、79、89 %に促進し、DDMPグループサポニンはそれぞれ81、85、94 %に促進した。AおよびBグループサポニンの脂肪分解率は、いずれの試験濃度においてもおよそ70 %を示し、EグループサポニンやDDMPグループサポニンと比べて活性が弱く濃度に依存しなかった。以上の結果から、脂肪の蓄積抑制作用や分解促進作用に関与し肥満の予防に効果的な大豆サポニンは、EグループサポニンやDDMPグループサポニンであることが示された。このように大豆サポニンは各グループ間における構造の違いによって、生理活性の強さが異なることが明らかになった。そこで更に高活性を示したグループのうち精製が容易なEグループサポニンの糖鎖部分分解物を調製し、大豆サポニンの糖鎖構造の違いが抗肥満活性に与える影響について検討している。

soybean, saponin, anti-obesity

講演番号:2J12p03
講演日時、会場:3月23日14:11～ J校舎12会場

大豆種子の栽培および保存条件の制御によるサポニン含量の変化

Change of content of saponin in soybean seed controlled by cultivation and preservation method.

○斉藤 哲史、窪田真子、常楽真由美、石川佳奈子、深澤厚子、白岩 雅和(茨城大・農・食品生化)
○Akifumi Saitou, Masako Kubota, Mayumi Jouraku, Kanako Ishikawa, Atsuko Hukazawa, Masakazu Shiraiwa(Ibaraki Univ.)

【目的】大豆種子には、真性サポニンとしてAグループサポニンとDDMPグループサポニンが存在しており、DDMPグループサポニンとその派生物であるBおよびEグループサポニンは抗ガン作用、抗肥満作用、抗酸化作用などの様々な薬理作用を有することが報告されている。従って、大豆種子中のDDMPグループサポニンの合成を促進することができれば、DDMP, B, Eグループサポニンの含量を上げて生理機能の高い大豆の開発が期待される。そこで本研究では、発芽期大豆および完熟期大豆を用いて大豆サポニンの生合成活性化を導く条件について検討した。
【方法】まず完熟大豆をバーミキュライト中で発芽させ、種々の条件下（光調節、室温調節、pH調節、$CaCl_2$およびKCl添加、H_2O_2添加、メチルジャスモン酸（MeJA）添加、パラコート添加、オリゼメート添加、温水処理、冷水処理）で水耕栽培した発芽期大豆に含まれるサポニン量を調査した。次に、完熟大豆の保存中に低温および高温処理を行った大豆種子中に含まれるサポニン量を調査した。各処理を施して栽培した発芽期および完熟期大豆は子葉と胚軸に分け、70% EtOHを用いてサポニン成分を抽出し、得られた抽出液をHPLCに供し、B,DDMPグループサポニンの定量を行い、それぞれの濃度の総計で評価を行った。
【結果】種々の条件下で水耕栽培した発芽期大豆中のサポニンの定量を行った結果、光や室温などの環境条件や$CaCl_2$やKClのような栄養条件はサポニン濃度にはあまり影響をおよぼさず、pHの変化やH_2O_2添加のように植物にストレスがかかる条件下で栽培した大豆中でサポニン濃度が上昇する傾向がみられた。そこで、傷害などのストレスに対応して合成され、環境ストレスへの耐性誘導ホルモンとして知られているMeJAを添加した水耕液を用いて栽培した大豆におけるサポニン量を定量したところ、コントロールに比較して子葉で約1.4倍、胚軸で約1.8倍のサポニン濃度の上昇がみられた。より実用的な方法を開発するために、農薬として知られるパラコート、植物の病害抵抗性を誘導するオリゼメートを添加した水耕液で栽培した発芽期大豆のサポニンを定量した結果、サポニン濃度の上昇を確認することができた。さらに、より簡易的な温水処理(50℃、30分)、冷水処理(10℃、5分)を検討したところ、温水処理した大豆のサポニン濃度は子葉、胚軸部位において、コントロールに対し約1.3倍、1.8倍、冷水処理した大豆のサポニン濃度は子葉、胚軸部位において、共に約1.4倍の上昇を示した。次に、完熟期大豆では、高温処理(50℃,45分)した大豆のサポニン濃度は子葉、胚軸部位において、コントロールに対し約1.3倍、1.2倍、低温処理(10℃, 45分)した大豆のサポニン濃度は子葉部位において1.4倍まで上昇した。

soybean saponin, control, stress

講演番号：2J12p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ J校舎12会場

サラシア属植物のα-グルコシダーゼ阻害活性成分およびそのLC-MS定量分析

Quantitative determination of potent α-glucosidase inhibitors in *Salacia* species using LCMS

○森川 敏生[1]、三宅 荘八郎[2]、赤木 淳二[2]、二宮 清文[1]、Pongpiriyadacha Yutana[3]、吉川 雅之[1]、村岡 修[1,2]（[1]近畿大薬総研、[2]近畿大薬、[3]Rajamangala工科大）

○ Toshio Morikawa[1], Sohachiro Miyake[2], Junji Akaki[2], Kiyofumi Ninomiya[1], Yutana Pongpiriyadacha[3], Masayuki Yoshikawa[1], Osamu Muraoka[1,2] ([1]Pharmaceutical Res. and Technol. Inst., Kinki Univ., [2]School of Pharmacy, Kinki Univ., [3]Fac. of Sci. and Technol., Rajamangala Univ. of Technol. Srivijaya)

【目的】サラシア属植物（*Salacia reticulata*、*S. oblonga* および *S. chinensis* など）は、東南アジアや南アジア一帯に広く分布するつる性の多年性木本であり、現地において糖尿病の予防などを目的に古くから利用されている。我々はこれまでに、サラシア属植物の幹や根部エキスに、顕著なα-グルコシダーゼ阻害活性を見い出すとともに、その活性成分としてチオ糖スルホニウム構造を有する6種の化合物［salacinol、kotalanol、ponkoranol および、それぞれの脱硫酸エステル体（neo体）］を単離・構造決定している。本研究では、これらのスルホニウム化合物のラットならびにヒトα-グルコシダーゼに対する阻害活性の比較を行うとともに、サラシア属植物エキスの定量的活性評価法の確立を目的として、これらのスルホニウム化合物の定量分析を行った。

【方法】ラットならびにヒト小腸由来α-グルコシダーゼ阻害試験は、基質にマルトース、イソマルトース、スクロースを用いて検討した。定量分析は、直線性、真度、精度、検出限界などの項目から分析法の妥当性を評価したLC-ESI/MS法[1,2)] を用いて測定した。基原別、地域別に入手した各種サラシア属植物の幹および根部から熱水抽出エキスを調製し、スルホニウム化合物含量およびα-グルコシダーゼ阻害活性を評価した。また、これらの相関性を評価することで、本定量法の有用性を検討した。

【結果】スルホニウム化合物はラットならびにヒトα-グルコシダーゼを顕著に阻害し、その阻害様式は競合型であった。各種サラシア属植物エキス中のスルホニウム化合物含量については、salacinol、kotalanol、neokotalanolのいずれかが多く含まれており、これらがサラシア属植物の主要な活性成分であると考えられた。測定結果に基づき、エキス中のスルホニウム含量とα-グルコシダーゼ阻害活性との相関性を評価したところ、両者に良好な正の相関が認められた。このことから、本分析法がサラシア属植物エキスのα-グルコシダーゼ阻害活性評価法として有用であることが示された。

1) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **52**, 770－773 (2010); 2) *J. Nat. Med.*, **65**, 142－148 (2011).

Salacia, α-glucosidase inhibitor, diabetes

講演番号：2J12p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ J校舎12会場

サラシア属植物に含まれるスルホニウム化合物の血糖上昇抑制効果

Suppressive effect of *Salacia* sulfoniums on hyperglycemia

○赤木 淳二[1]、森川 敏生[2]、二宮 清文[2]、三宅 荘八郎[1]、吉川 雅之[2]、村岡 修[1,2]
([1]近畿大薬、[2]近畿大薬総研)

○ Junji Akaki[1], Toshio Morikawa[2], Kiyofumi Ninomiya[2], Sohachiro Miyake[1], Masayuki Yoshikawa[2], Osamu Muraoka[1,2] ([1]School of Pharmacy, Kinki Univ., [2]Pharmaceutical Res. and Technol. Inst., Kinki Univ.)

【目的】我々はこれまでに、南アジアや東南アジアにおいて古くから糖尿病の予防などを目的に利用されているサラシア属植物の幹や根部エキスに、顕著なα-グルコシダーゼ阻害活性を見い出すとともに、その活性成分として、新奇な骨格を有するスルホニウム化合物群を明らかにしている。さらに最近、サラシア属植物の定量的活性評価を目的として、これらのスルホニウム化合物のLC-ESI/MS定量分析法を確立している。今回、これらのスルホニウム化合物を摂取した際の生理活性を明らかにする目的で、正常ラットを用いたデンプン負荷試験を実施し、その血糖上昇抑制効果を検証した。さらに2型糖尿病マウスを用いて、サラシアエキス末としてスルホニウム化合物を連日投与した時の血糖関連指標に対する影響についても検証した。
【方法】スルホニウム化合物（salacinol、kotalanol および neokotalanol）はサラシア属植物から単離し、実験に使用した。ラットデンプン負荷試験は、6週齢雄性SDラットにスルホニウム化合物およびα化デンプン（1 g/kg）を同時経口投与した後、経時的（0、30、60、120、180分後）に尾静脈より採血し、血糖値を測定した。連日投与試験では、2型糖尿病マウスである$KK\text{-}A^y$マウス（6週齢、雄性）に対して、サラシアエキス末を混餌投与［CE-2もしくはAIN-93M粉末飼料（日本クレア）に配合］し、随時血糖値ならびにHbA1cについて評価した。
【結果】サラシアエキス末およびスルホニウム化合物は、デンプン負荷後の血糖上昇を投与量依存的に抑制した。グルコース負荷時にはこの効果は観察されない事から、血糖上昇抑制効果はα-グルコシダーゼ阻害活性に基づくと考えられた。次に、CE-2粉末飼料に0.10、0.25、0.50%のサラシアエキス末を配合し、$KK\text{-}A^y$マウスに対して3週間の混餌投与を行った。その結果、随時血糖値ならびにHbA1cの上昇抑制効果が認められた。一方、粉末飼料にAIN-93M精製飼料を用い、炭水化物源をすべてグルコースに置換して同様の試験を行ったところ、この効果は消失した。このことから、連日投与試験におけるサラシアエキス末の作用機序についても、α-グルコシダーゼ阻害を介したものであると考えられた。以上の結果から、サラシアエキス末ならびに含有されるスルホニウム化合物には、食後血糖の上昇を抑える効果が認められるとともに、糖尿病の進展を抑制する効果が期待できた。

Salacia, α-glucosidase inhibitor, diabetes

講演番号：2J12p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ J校舎12会場

大麦若葉末の血中コレステロール低下作用

Blood cholesterol levels lowering effect of young barley leaf powder

○友澤　寛、鍔田仁人，入野信人[1]、近藤隆一郎[2]、古賀良太[1]
((株) 大地の力研究所、[1] (株) アサヒ緑健、[2]九州大学農学研究院)
○Hiroshi Tomozawa, Masahito Tsubata, Nobuhito Irino[1], Ryuichiro Kondo[2], Ryota Koga[1]
(Energy of Ground (Daichi-no-chikara) Laboratory Co., Ltd., [1]Asahi Ryokuken Co., Ltd., [2]Faculty of Agriculture, Kyushu University)

【目的】大麦若葉末はイネ科オオムギ属に属するオオムギ（Hordeum *vulgare* L.）の出穂前の若葉部を刈り取った後、洗浄、乾燥、粉砕など複数の工程を経て製造される淡緑～濃緑色の粉末である。大麦若葉末は食物繊維を豊富に含み、そのほとんどが不溶性食物繊維である。今回、ヒトにおける大麦若葉末の血中コレステロールに及ぼす影響および *in vitro* における大麦若葉末の胆汁酸吸着能の検討を行った。
【方法】試験 1：健常成人 15 名に大麦若葉末 5.1g を 12 週間連続で摂取させ、4 週間おきに採血を行い、血中コレステロール濃度を測定した。試験 2：透析装置に透析膜を隔てて一方に胆汁酸（コール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム）を入れ、もう一方に被験物質（大麦若葉末、セルロース、コレスチラミンレジン（陽性対照））を入れ、プレートシェイカー中で 37℃、20 時間振とうし、胆汁酸側の上清中における胆汁酸濃度を測定した。
【結果】試験 1：摂取前と比較して摂取 8 週後および 12 週後で血中コレステロール濃度の低下が認められた。特に女性において摂取前と比較して摂取 8 週後に有意な低下が認められた。試験 2：大麦若葉末はセルロースと比較して胆汁酸吸着能を有することが認められた。本試験の結果より、大麦若葉末の摂取によって血中コレステロールの低下作用が示唆され、その作用機序としては消化管での胆汁酸吸着排泄の可能性が示唆された。

Keyword1 young barley leaf powder, Keyword2 blood cholesterol levels, Keyword3 bile acid

講演番号：2J12p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ J校舎12会場

イソマルチュロースの骨格筋における糖取り込み促進作用

Sensitizing effect of isomaltulose on muscular glucose uptake

○笹川　克己、峰尾　茂、佐藤　眞治[1]、西田　浩志[1]、小西　徹也[1]、平山 匡男（ブルボン・健康科学研、[1]新潟薬大・応生）

○Katsumi Sasagawa, Shigeru Mineo, Shinji Sato[1], Hiroshi Nishida[1], Tetsuya Konishi[1], Masao Hirayama (Bourbon Institutes of Health, [1]NUPALS)

【目的】近年の糖尿病人口の増加要因の一つに、食後血糖値の急激な変動が関わっていると考えられていることから、血糖値の急激な変動を抑えることが糖尿病の予防・改善につながると期待されている。スクロースの構造異性体であるイソマルチュロース（Palatinose®、6-O-D-glucopyranosyl-D-fructose）は、急激な血糖値の上昇や過剰なインスリン分泌を引き起こしにくい天然の二糖類であり、2食目摂食後の血糖値の上昇を抑制する効果（セカンドミール効果）を有することを明らかにしてきた。そこで、イソマルチュロースによるセカンドミール効果の詳細なメカニズムを解析するために、血中から骨格筋への糖の吸収で重要な役割を演じているグルコース輸送体（GLUT4）に着目し、GLUT4膜移行シグナルを介したイソマルチュロースによる血糖値制御の可能性について検討した。

【方法】Wistar系雄性ラット（11週齢）を生理食塩水（コントロール）群、スクロース群、イソマルチュロース群に分けた。糖取り込みに関する評価のため、試験食を0.83g/kg経口投与し、90分後にグルコースを0.83g/kg経口及び静脈内投与した。頸静脈カニューレより経時的に採血を行い、血糖値、血漿中インスリン濃度を測定した。GLUT4膜移行シグナル伝達因子に対する活性評価では、試験食を0.83g/kg経口投与し、90分後と180分後に骨格筋を摘出した。可溶化バッファー中でホモジナイズを行いタンパクを抽出し、Aktのリン酸化抗体（Ser473）を用いてウエスタンブロッティング法により解析した。

【結果】グルコース経口投与後の血糖値はコントロール群、スクロース群に比べイソマルチュロース群で有意に低値を示した。インスリン濃度には有意な差は確認されなかった。グルコース静脈内投与後の血中グルコースの消失速度はイソマルチュロース群で最も速く、投与30分後までの血糖値AUCはコントロール群に比べ有意に低いことが明らかとなった。Aktのリン酸化レベルは、90分後と180分後ともにイソマルチュロース群が他群に比べ高い傾向が示された。以上の結果より、イソマルチュロースが骨格筋での糖取り込みを促進することと、糖取り込みの促進がAktの活性化シグナルを介したインスリン感受性の亢進によるものであることが示唆された。これらのことから、イソマルチュロースを摂取することで一日の血糖値の急激な変動を抑え、糖尿病の予防に有用である可能性が示された。

Isomaltulose, glucose uptake, insulin sensitivity

講演番号：2J12p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ J校舎12会場

甘草由来プレニルイソフラバンであるグラブリジンによる筋肉細胞の糖代謝調節作用

Glabridin, an isoflavane in licorice, altered glucose metabolism in L6 myotubes

○澤田 圭介、中川 格[1]、芦田 均（神戸大院・農、[1]株式会社カネカ・QOL事業部）

○Keisuke Sawada, Kaku Nakagawa[1], Hitoshi Ashida (Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, [1]QOL Division, Kaneka Corporation)

【目的】Glabridinは甘草(*Glycyrrhiza glabra*) 由来のプレニルイソフラバンである。近年、glabridinを含む甘草抽出物を摂取させたマウスにおいて腹部脂肪の蓄積や高血糖が抑制されることが報告された[1]。また、glabridinは生体利用率が他のフラボノイド類と比べて高く、投与したラットの血漿中にアグリコンの形態で存在することが分かっている[2]。これらのことから本研究では、glabridinが筋肉細胞の糖代謝に与える影響を検討した。【方法】実験には筋繊維様に分化させたラット骨格筋由来L6細胞を使用した。分化後の細胞を0.2% BSAを含むMEM培地中で18時間無血清処理したのち、glabridinなどの化合物を作用させ以下の実験に供した。グルコース取込み活性は、細胞に2-deoxyglucoseを1 mMの濃度で20 min用させ、取込まれた2-deoxyglucoseを酵素反応に基づいて定量し評価した [3]。グリコーゲン量は市販のキットを用いて測定した。培地中の乳酸量は乳酸デヒドロゲナーゼと反応させることにより生成するNADHを定量することにより評価した。阻害剤は細胞に30 min前処理したのち、glabridinと共に一定時間作用させた。【結果】Glabridinを分化L6細胞に3, 10あるいは30 μMで4時間作用させたところ、グルコース取込み活性の上昇とともに細胞内グリコーゲン量の減少が観察された。これらの結果は細胞内のエネルギー消費が促進された可能性を示している。そこで、乳酸産生量を測定したところglabridinの作用濃度依存的に増加することが確認され、細胞内ATP量もわずかながら減少傾向であった。また、作用濃度を10 μMに固定し作用開始から4時間後までのパラメータ変動を経時的に観察したところ、乳酸産生量は作用直後から常に陰性対照比1.6倍程度であり、グリコーゲン量は0-30 minの間に4割程度まで減少し、それ以降は変化しなかった。これらのエネルギー基質の消費が作用直後から誘導されたことと対照的に、グルコース取込み活性は作用開始から1時間以上経過してから上昇を開始した。これらの経時変化からも、glabridinの作用がエネルギー基質の消費促進を介したものである可能性は高いと考えた。そこで作用機構の解明を目的として、細胞内のエネルギー不足により活性化されグルコース取込みを誘導するAMP依存性キナーゼを薬理的に阻害した際のグルコース取込み活性を測定した。しかし、予想に反してAMPKの阻害はglabridin依存的なグルコース取込み活性を抑制しなかった。現在、作用機構に関してさらなる検討を実施中である。

[1] K. Nakagawa *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 27 (2004) 1775-1778.

[2] C. Ito *et al.*, J. Nutr. Sci. Vitaminol. 53 (2007) 358-365.

[3] N. Yamamoto *et al.*, Anal. Biochem. 351 (2006) 139-145.

muscle cells, glucose metabolism, glabridin

講演番号：2J12p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ J校舎12会場

ローヤルゼリー由来中鎖脂肪酸のAMPキナーゼ活性化作用とその機序解明

Activation of AMP-activated protein kinase in myotubes and mice treated with medium chain fatty acid included in royal jelly

○滝川雅仁、曽我実、熊谷綾、平田晴実、上田学[1]、芦田均[1]、津田孝範（中部大・応生、[1]神戸大院・農）

○Masahito Takikawa, Minoru Soga, Aya Kumagai, Harumi Hirata, Manabu Ueda[1], Hitoshi Ashida[1], Takanori Tsuda (Chubu Univ.,[1]Kobe Univ.)

【目的】AMP-activated protein kinase (AMPK)は、エネルギー代謝や摂食行動を調節し、肥満・2型糖尿病の予防、治療のための標的分子として考えられている。本研究では、ローヤルゼリーに特異的に含まれる10-hydroxy-2-decenoic acid (10H2DA) を対象として、エネルギー代謝の主要な組織である骨格筋のモデル細胞および動物におけるAMPKの活性化とその機序解明を目的とした。

【方法1】ラット由来筋芽細胞L6を定法によって筋管細胞へ分化誘導し、これを骨格筋モデルとして10H2DAの処理によるAMPKの活性化および作用機構について検討した。
【方法2】8週齢の雄性C57BL/6Jマウスに10H2DAを経口投与し、0、15、30、60分後、骨格筋を採取し、AMPKの活性化、Glucose transporter4 (Glut4) の細胞膜移行を検討した。

【結果】筋管細胞において、10H2DAの投与はAMPKを活性化させた。同時に非投与群と比較してGlut4の膜移行の促進、それに伴う有意なグルコースの取り込み量の増加が見られた。一方で、インスリンシグナルのひとつであるAktに変化は見られず、10H2DAはインスリン非依存的にGlut4の膜移行、グルコースの取り込みを促進していることが確認された。また、10H2DAによるAMPKの活性化作用は、細胞内のATP、AMPレベルの変動を伴わず、上流キナーゼとしてCaMKKが関与していることが示唆された。

動物個体においては、10H2DAの投与はAMPKの活性化と同時にGlut4の膜移行の促進が確認された。またCaMKKの標的タンパクであるCaMKIVのリン酸化の増加が認められたことから、筋管細胞と同様に10H2DAの投与によるAMPKの活性化にCaMKKが関与していることが示唆された。現在さらに解析を進めている。

AMP-activated protein kinase, diabetes, glucose uptake

講演番号：2J12p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ J校舎12会場

甘藷若葉「すいおう」の血糖値上昇抑制作用とGLP-1分泌への影響

Suioh increases glucagon-like peptide-1 release and attenuates hyperglycemia.

○永峰 里花、上野 栞、友澤 寛、鍔田 仁人、比良 徹[1]、原 博[1]、津田 孝範[2]
((株) 東洋新薬、[1]北大院・農、[2]中部大・応生)
○Rika Nagamine, Shiori Ueno, Hiroshi Tomozawa, Masahito Tsubata, Tohru Hira[1], Hiroshi Hara[1], Takanori Tsuda[2]
(Toyo Shinyaku Co., Ltd., [1]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, [2]College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University)

【目的】「すいおう」は、茎葉を食用とする目的で開発された甘藷品種で、カフェオイルキナ酸等のポリフェノールを含んでいる。我々は、この茎葉粉砕粉末（甘藷若葉末）において、血糖値上昇抑制作用に関する検討を実施してきた。前回、糖尿病モデルマウス（KK-A^yマウス）において、甘藷若葉末の60%エタノール抽出物の継続摂取による耐糖能改善作用に関して報告した。本研究では、甘藷若葉末の60%エタノール抽出物による血糖値上昇抑制作用メカニズムの一助として、glucagon-like peptide-1（GLP-1）に着目して検討を行った。
【方法】(試験1)甘藷若葉末の60%エタノール抽出物の*in vitro* におけるGLP-1分泌評価を行った。マウス腸管由来のGLP-1産生細胞株（GLUTag細胞）に、甘藷若葉末の60%エタノール抽出物溶液を暴露し、上清中の総GLP-1濃度を測定した。
(試験2) 雄性ラット（SD、7週齢）を用いて、甘藷若葉末の60%エタノール抽出物の単回経口投与下での腹腔内グルコース負荷試験を行い、血糖値、血中インスリン値を測定した。
【結果】(試験1) GLP-1産生細胞株において甘藷若葉末の60%エタノール抽出物により、上清中の総GLP-1濃度に有意な上昇がみられた。
(試験2) ラットにおいて甘藷若葉末の60%エタノール抽出物経口投与により、コントロールと比較して血糖値変化に有意な低下、血中インスリン値に有意な上昇がみられた
【結論】*In vitro* で、甘藷若葉末の60%エタノール抽出物によるGLP-1分泌促進作用が確認された。また*in vivo*で、甘藷若葉末の60%エタノール抽出物による血糖値上昇の抑制、および血中インスリン値の上昇がみられた。
以上より、「すいおう」による血糖値上昇抑制作用メカニズムの一因として、GLP-1が関与する可能性が考えられた。今後、甘藷若葉末の60%エタノール抽出物の*in vivo* におけるGLP-1分泌能に関する検討を進める予定である。

Keyword1, glucagon-like peptide-1　Keyword2, suioh　Keyword3, hyperglycemia

講演番号：2J12p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ J校舎12会場

マウス脂肪細胞の脂肪代謝に対するカテキンおよびカフェインの影響

Effects of catechins and Caffeine on Lipid metabolism in mouse Adipocytes

○杉浦千佳子[1・2]、茶山和敏[2]（[1]浜松大・健プロ、[2]静岡大・創造大学院）
○Chikako Sugiura[1・2], Kazutoshi Sayama[2]（[1]Faculty of Health Promotional Sciences, Hamamatsu University, [2]Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University）

【目的】これまでのマウスを用いた研究で、我々は、緑茶が抗肥満作用を有することを見出し、その成分のうち、カテキンとカフェインの組み合わせ投与が最も強い脂肪蓄積抑制作用を有することを報告している。しかし、生体内における主な脂肪蓄積の場である脂肪細胞に対するカフェインとカテキンの組み合わせ投与の効果については明らかにされていない。
そこで、本研究では、マウス脂肪前駆細胞を用いて、脂肪細胞の脂質代謝に対するカテキンとカフェインの影響を検討した。

【方法】マウス脂肪前駆細胞株である 3T3-L1 細胞を使用して実験を行った。12well の培養用プレートに各 well 当たり 2×10^4個/ml の細胞を播種し、基礎培養液中で 60 時間培養した。その後、基礎培養液にインスリン、デキサメタゾンおよびイソブチルメチルキサンチン含有を加えた分化誘導用培養液で 48 時間培養し、分化誘導を行った。さらに、基本培養液をコントロールとして、カテキン濃度 1・2.5・5・10μg／ml、カフェイン濃度 50・100μg／ml と各濃度のカテキンとカフェインを組み合わせて添加した培養液を作成し、分化誘導後の細胞を各添加培養液中で 8 日間培養した。培養終了後、オイルレッド染色液で脂質染色し、分化した細胞中の脂肪蓄積の程度を比較するとともに、培養細胞中のトリグリセリド(TG)量および脂肪細胞の脂質合成の指標である GPDH 量を分析・比較した。また、脂肪酸分解に関連する PPARγと HSL の mRNA 発現量を分析した。

【結果および考察】カテキンとカフェインを種々の濃度で単独または組み合わせて添加した各培養液で 8 日間培養した結果、カテキンとカフェインを組み合わせて添加したすべての群の TG 量は、コントロール群と比較して有意に減少していた。また、GPDH 量は、1μg・2.5μg カテキン＋50μg カフェインと５μg･10μg カテキン＋100μg カフェイン添加群がコントロール群と比較して有意に減少していた。さらに、PPARγと HSL の mRNA 量は、100μg カフェインとカテキンを組み合わせた群のすべてと 2.5μg・５μg カテキン＋50μg カフェイン群がコントロール群と比較して有意に増加していた。
以上の結果から、カテキンとカフェインの組み合わせ投与による脂肪蓄積抑制作用のメカニズムとして、それらによる脂肪細胞の脂肪合成抑制と脂肪分解促進がその要因の一つであることが明らかとなった。また、この効果はカテキンあるいはカフェイン単独添加よりも強いことが判明した。

Lipid metabolism, Catechins, Caffeine

講演番号:2J12p12
講演日時、会場:3月23日16:10～ J校舎12会場

シナモン熱水抽出物の血糖低下作用の解析

Cinnamon extract enhances glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myocytes through the activation of LKB1-AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway

○沈　燕、本間　夏実、細野　崇、関　泰一郎　(日大・生物資源)
○Yan Shen, Natsumi Honma, Takashi Hosono, Taiichiro Seki (Nihon Univ)

【目的】我々はシナモン熱水抽出物(以下シナモン)が1型糖尿病モデルラットの血糖値を低下させ、糖尿病性腎症を改善することを明らかにしてきた。グルコース輸送担体であるGLUT4は、インスリンシグナルやAMPKシグナルの活性化により細胞膜へ移行し、グルコースを細胞内へ取り込み、血中のグルコース濃度を低下させる。本研究では、培養脂肪細胞および培養筋管細胞を用いて、シナモンによるGLUT4の細胞膜への移行促進メカニズムについて検討した。
【方法】3T3-L1脂肪細胞およびC2C12筋管細胞を用いて、^{3}H標識した2-デオキシグルコースの取り込み量を測定した。また、インスリンレセプターインヒビターであるAG1024およびAMPKインヒビターであるCompound Cを用いて、インスリンシグナルおよびAMPKシグナルの阻害により、シナモンの添加培養により、GLUT4の細胞膜への移行に関わる各タンパク質(Akt, PKCzeta, AMPK, LKB1)のリン酸化レベルについてウェスタンブロッティング法を用いて検討した。
【結果】シナモンの添加培養により、3T3-L1, C2C12細胞ともにグルコースの取り込みは有意に増加した。このシナモンのグルコース取り込み促進効果はCompound Cの前処置により、キャンセルされた。さらに、シナモンの添加培養により、AMPKおよびその上流因子であるLKB1のリン酸化レベルが増加した。また、LKB1のノックダウンにより、シナモンによって惹起したグルコースの取り込みおよびAMPKのリン酸化レベルが減少した。これらの結果から、シナモンがLKB1-AMPKシグナル経路を介して、インスリン非依存的にGLUT4の細胞膜への移行を促進することが明らかになった。

Cinnamon, GLUT4, AMPK

講演番号：2J12p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ J校舎12会場

シナモンの2型糖尿病予防効果に関する研究

Study on prevention by cinnamon of type2 diabetes.

○本間 夏実[1]、阿部 麻衣子[2]、早乙女 翠[2]、沈 燕[1]、細野 崇[1,2]、有賀 豊彦[1,2]、関 泰一郎[1,2]([1]日大院・応生科、[2]日大・生命化)

○Natsumi Homma[1], Maiko Abe[2], Midori Saotome[2], Yan Shen[1], Takashi Hosono[1,2], Toyohiko Ariga[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1,2]Nihon University)

【目的】シナモン(*Cinnamomum zeylanicum*)はクスノキ科のケイ及びその同族植物の樹皮を乾燥させたもので、紅茶や肉料理をはじめ生薬としても利用され、抗炎症作用や発汗作用を示す。我々は、1型糖尿病モデルラットを用いて、シナモン熱水抽出物（CE）投与が糖尿病を改善することを明らかにしてきた(*BBB, 2010*)。また、正常ラットへのCEの単回投与は耐糖能を向上させることを明らかにしてきた(日本農芸化学会、2010)。本研究ではCEの長期投与が2型糖尿病モデルラットの耐糖能に及ぼす影響およびそのメカニズムを明らかにしようとした。

【方法】肥満を呈する2型糖尿病モデルであるOtsuka Long Evans Tokushima Fatty(OLETF)ラットとそのコントロールとしてLong Evans Tokushima Otsuka(LETO) ラット4週齢を標準固型飼料により1週間予備飼育した後、AIN-76を基準としたNormal食とHigh Fat食(脂質カロリー30%)を飼料としCE(100 mg/kg b.w.)を16週間毎日同時刻に経口投与した。

CE投与8週目および15週目に経口糖負荷試験(OGTT) を、16週目にはインスリン負荷試験(ITT)を実施した。また、血漿インスリン濃度および筋肉・脂肪組織におけるグルコース取り込み関連因子について各種分子生物学的手法を用いて解析した。

【結果】CEの投与8週目および15週目に実施したOGTTの結果からOLETFのCE群においてNormal食およびHigh Fat 食に対して有意に耐糖能が向上していることが明らかになった。投与16週目に実施したITTの結果に顕著な差はなかったことから耐糖能の向上はインスリン感受性の変化によるものではないことが示唆された。また、血漿中インスリン濃度はOLETFで有意に増加していたが、シナモン投与による影響は見られなかった。現在、CEによる耐糖能改善メカニズムを解明する目的で筋肉および脂肪組織における糖取り込み関連因子の発現量についてウェスタンブロッティングを用いて検討中である。

【結語】シナモンはITTおよび血漿中インスリンの結果よりインスリンとは異なるターゲットに作用し糖の取り込みを高めることで2型糖尿病における耐糖能異常を改善することが示唆された。

Keyword: cinnamon, diabetes, OLETF

講演番号：2J12p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ J校舎12会場

発芽玄米由来のアシル化ステロール配糖体、ステロール配糖体が糖尿病モデルマウスに及ぼす影響

Effect of Pre-germinated brown rice derived acylated steryl glucoside and steryl glucoside on diabetic model mice.

○ 野中 翔太[1]、菊澤 美沙子[2]、関根 瞳[2]、大路 拓巳[3]、佐藤 明日香[3]、佐藤 友宏[3]、池田 克幸[3]、小笠原 理美[3]、髙安 美里夏[3]、臼杵 靖剛[4]、Robert K. Yu[4]、伊藤 幸彦[1]、細野 崇[2,3]、有賀 豊彦[2,3]、関 泰一郎[2,3]（[1]㈱ファンケル・総研、[2]日大院・生資科・応生科、[3]日大・生資科・生命化、[4]Medical College of Georgia）

○ Shota Nonaka[1]、Misako Kikuzawa[2]、Hitomi Sekine[2]、Takumi Oji[3]、Asuka Sato[3]、Tomohiro Sato[3]、Katsuyuki Ikeda[3]、Satomi Ogasawara[3]、Mirika Takayasu[3]、Seigo Usuki[4]、Robert K Yu[4]、Yukihiko Ito[1]、Takashi Hosono[2,3]、Toyohiko Ariga[2,3]、Taiichiro Seki[2,3]（[1]FANCL Research Institute, [2]Nihon University Graduate School, [3]Nihon University, [4]Medical College of Georgia）

【目的】発芽玄米から抽出したアシル化ステロール配糖体（ASG）とステロール配糖体（SG）が糖尿病モデルマウス（db/db マウス）の糖代謝に及ぼす影響を明らかにする。
【方法】発芽玄米を搗精して得られた糠よりヘキサン、クロロホルム、メタノールを用いて脂質画分を抽出した。この脂質画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供しASG画分およびSG画分を分離した。これらの画分はAIN-93Gをベースとした飼料にそれぞれ0.06%混餌し、ASG飼料とSG飼料とした。7週齢の♂C57BL/6jマウスおよび♂db/dbマウスは1週間の予備飼育後、C57BL/6jをnormal control群、db/dbマウスをDM control群、ASG群、SG群に群分けして8週間飼育した。飼育期間中は摂餌量測定および体重測定を実施し、実験終了一週間前に経口糖負荷試験を実施して、耐糖能を評価した。実験終了後各種臓器重量を測定や血中糖代謝パラメーターの測定を実施した。
【結果】摂餌量はDM control群とASG群間で差はなかったが、SG群ではDM control群と比較して有意に増加した。体重については、DM control群、ASG群、SG群間で差はなかった。給餌開始7週後に実施した経口糖負荷試験において、血糖値曲線下面積を算出したところ、DM control群とSG群間に差はなかったものの、ASG群ではDM control群と比較して有意な低下が確認された。また、経口糖負荷試験時の空腹時血糖値についてはDM control群と比較してASG群で有意な低下、空腹時インスリン値については増加傾向が確認された。肝重量、腎重量、脂肪組織重量はDM control群と比較してASG群、SG群の間で差はなかった。
【結論】発芽玄米由来のASG画分はdb/dbマウスの糖尿病の進行を抑制することが明らかとなった。

Pre-germinated brown rice, diabetes, db/db mouse

講演番号：2J12p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ J校舎12会場

マイタケ抽出物摂取によるマウスおよびラットの脂質代謝への影響

Effects of Maitake(*Grifola frondosa*)extracts on lipid metabolism in rodents

○川面　香奈[1]、西田　浩志[2]、佐藤　浩二[3]、田中　昭弘[1]、鈴木　蘭[1]、佐藤　眞治[2]、小西　徹也[2]
([1]株式会社雪国まいたけ、[2]新潟薬大　応生科、[3]新潟薬大　薬)

○ Kana Kawazura[1],Hiroshi Nishida[2],Koji Sato[2],Akihiro Tanaka[1],Ran Suzuki[1],Shinji Sato[2],Tetsuya Konoshi[2] ([1] YUKIGUNI MAITAKE Co.,Ltd., [2]NUPALS)

【目的】肥満症、脂質異常症、糖尿病、高血圧症は代表的な生活習慣病であり、食生活や運動、飲酒、喫煙などの生活習慣がその発症や進行に関係していて、なかでも食事による予防は重要である。マイタケ(*Grifola frondosa*)は食物繊維や機能性を有する多糖類を含有するため生活習慣病の予防効果が期待されている。そこで本研究では、マイタケ凍結乾燥粉末の熱水抽出物(YM-6)と熱風乾燥粉末の熱水抽出残渣(YM-11)の分画を用いて高脂肪食飼育マウスの脂質代謝に及ぼす影響を検討した。さらにラット経口脂質負荷試験による血中TGおよび肝臓中の脂質代謝関連分子の変動を調べた。

【方法】収穫前のマイタケを低温熟成させ,子実体部分を凍結乾燥後粉末化し、その粉末を熱水抽出後乾燥して得られた粉末をYM-6とした。一方、通常通り収穫されたマイタケの熱風乾燥粉末を、熱水抽出し得られた残渣（繊維分64%）をYM-11とした。高脂肪食飼育試験では、9週齢の雄BALB/cマウスを通常飼料群(CT)、高脂肪食群(W)、高脂肪食+YM-6群(W+YM6)、高脂肪食＋YM-11(W+YM11)群の4群に分けた。通常食はMRストック（日本農産工業(株)）、高脂肪食はウエスタン飼料（オリエンタル酵母工業(株)）を用いて、各試験飼料を90日間自由摂取させた。試験期間中は体重、摂餌量の測定を行い、週に一度糞便を採取し糞中胆汁酸および脂質濃度を測定した。試験最終日に血液、肝臓、内臓脂肪を採取し、血中脂質および肝臓中脂質を測定した。さらに肝臓中の脂質代謝関連分子のmRNA発現量を測定した。ラット経口脂質負荷試験(OFT試験)ではオリーブ油を経口投与したWistar系雄ラットに対するYM-6AとYM-11の影響を8時間目まで調べた。

【結果・考察】高脂肪食飼育試験において、体重および肝臓重量にはYM-6およびYM-11は影響を与えなかったが、内臓脂肪重量ではW群と比較してW+YM-6、W+YM11群で低下傾向が認められた。血中コレステロール値はW群よりW+YM11で有意に低く、糞中胆汁酸排泄量はW群よりW+YM11群で有意に高値を示した。さらに肝臓におけるCYP7a1のmRNA発現量がW群よりも増加する傾向が認められた。W+YM-6群においてはPPARαのmRNA発現量がW群と比較して有意に増加した。OFT試験では、YM-6およびYM-11(500mg/kg)を併用投与することで脂質負荷後の血中TG濃度上昇が有意に抑制された。さらに、脂質負荷後2時間に摘出した肝臓においてもYM-11の投与によりCYP7a1のmRNA発現量に増加傾向が認められ、YM-6の投与によりFASのmRNA発現量が有意に減少した。以上の結果より、食物繊維を豊富に含むYM-11は胆汁酸排泄を促進および再吸収を抑制することで肝臓における胆汁酸合成を促進し血中コレステロール濃度を減少させること、YM-6は肝臓での脂肪酸合成の調節に関与する可能性が考えられ、これらの効果が肥満の予防につながることが示唆された。

Grifola frondosa, lipid metabolism

講演番号：2J12p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ J校舎12会場

タイトル
Title ２型糖尿病モデルマウスに対する柿由来タンニンの効果
○松本 健司、横山 慎一郎[1] （石川県大・生資環、[1]岐阜産技セ・環化）
○Kenji Matsumoto, Shin-ichiro Yokoyama[1] (Ishikawa Pref. Univ., [1]Industrial Technol. Center, Gifu Pref.)

【目的】我々はこれまでに、柿の未成熟果実による高コレステロール血症予防効果について研究する中で、果実中のタンニン（柿由来タンニン）に高い胆汁酸吸着能を有することを発見した。胆汁酸吸着剤は高コレステロール血症および糖尿病に有効とされることから、今回、この柿由来タンニンの糖尿病および脂質異常症に対する効果について明らかにすることを研究の目的とした。
【方法】柿（堂上蜂屋柿）の未成熟果実乾燥物から塩酸-メタノールを用いて柿由来タンニンを抽出し、その水不溶性画分を柿由来タンニンとした。動物実験は２型糖尿病モデルマウス（NSY/Hos系統）に高脂肪食を摂取させる実験系を用いた。柿由来タンニンをAIN-76改変高脂肪食に1%(w/w)添加し、マウス（コントロール群、柿由来タンニン摂取群、各８匹、7週齢、オス）に8週間摂取させた後、血漿生化学値、肝臓組織病理を行い、さらに肝臓、褐色脂肪組織、骨格筋における遺伝子発現解析を行った。また、遺伝子発現解析において褐色脂肪組織および骨格筋で有意な差が見られた脱共役タンパク質（UCP1、UCP3）についてウェスタンブロットによりタンパク質レベルでの発現を検討した。
【結果】柿由来タンニンの摂取によって、糞中の胆汁酸量は有意な増加を示した。体重および臓器（肝臓、精巣上体周囲白色内臓脂肪、腎臓）の重量には差が見られなかったものの、血中コレステロール値はHDLコレステロールに影響なく、総コレステロールおよびnon-HDLコレステロール（カイロミクロン-、VLDL-、LDL-コレステロール）が柿由来タンニン摂取群において有意に低かった。血中トリグリセライド値および肝臓トリグリセライド含量においても、柿由来タンニン摂取群が有意に低かった。糖代謝に関する指標に関しては、血糖値には有意な差が見られなかったものの、血中インスリン値を有意に抑制していた。
遺伝子発現解析では、肝臓においてSREBP2などのコレステロール代謝系に関係する遺伝子の有意な発現上昇が確認された。一方、褐色脂肪組織ではPPARα、PPARδ、UCP1、UCP3遺伝子において有意な発現上昇が見られ、PPARα、UCP3遺伝子の発現上昇は骨格筋でも確認された。タンパク質レベルでは褐色脂肪組織においてUCP1、UCP3の有意な上昇が見られたものの、骨格筋では差が見られなかった。
以上の結果から、柿由来タンニンは脂質異常症および糖尿病の予防に対して有効であり、高トリグリセライド血症、脂肪肝および糖尿病の予防に関しては褐色脂肪細胞の活性化が関与していると考えられる。

tannin, type2 diabetes, bile acid-binding ability

講演番号：2J12p17
講演日時、会場：3月23日17:15～ J校舎12会場

骨格筋細胞の糖取り込みに対する田七人参由来ダンマラン系トリテルペンの作用解析

Analysis of the effect of dammarane-type triterpenes derived from *Panax notoginseng* on glucose uptake in skeletal muscle cells

○岩本　拓、一柳　直希、小野　知二、岩崎　英明、大寺　基靖、眞鍋　康子[1]、藤井　宣晴[1]
（ライオン（株）・生命科学研究所、[1]首都大学東京院・人間健康科学研究科）

○Taku Iwamoto, Naoki Ichiyanagi, Tomoji Ono, Hideaki Iwasaki, Motoharu Ohdera, Yasuko Manabe[1], and Nobuharu Fujii[1] (Life Science Research Laboratories, Lion Corporation, [1]Graduate school of Human Health Sciences Tokyo Metropolitan Univ.)

【目的】 我々は、薬用人参の一つである田七人参由来のダンマラン系トリテルペン類を高含有したエキスに、空腹時、及び食後の血糖値を低下させる効果を有することを、動物、及び予備的ヒト試験により示している。本研究では田七人参由来ダンマラン系トリテルペンによる血糖値減少作用のメカニズムを解明する端緒として、骨格筋細胞での糖取り込みに対する作用について検討した。

【方法】 ラット骨格筋由来細胞株 L6 細胞を 2％の FBS を含む MEM 培地で培養し、筋管細胞様に分化させた。その後、田七人参由来のダンマラン系トリテルペンを 0.2 から 2μM の範囲で添加し、細胞への ^{3}H ラベルされた 2-deoxyglucose の取り込み量、及び培地中の２４時間当たりのグルコース消費量を測定した。

【結果】 田七人参由来ダンマラン系トリテルペンの１つであるパナキサトリオールの添加により、濃度依存的に培地中のグルコース消費量が増加した。また、細胞への ^{3}H ラベルされた 2-deoxyglucose の取り込み量も、パナキサトリオールの添加により同様に増加することを確認した。さらに、Akt1/2 kinase 阻害剤の添加により、パナキサトリオールにより促進される細胞への糖取り込みが抑制された。以上の結果から、田七人参由来ダンマラン系トリテルペンであるパナキサトリオールは、骨格筋細胞での糖取り込みを促進すること、この作用は Akt を介した情報伝達系を介することが示された。

dammarane-type triterpene, glucose uptake, skeletal muscle cells

講演番号:2J12p18
講演日時、会場:3月23日17:26～ J校舎12会場

コーヒー摂取が食餌誘導性肥満モデルマウスにおけるインスリン感受性に及ぼす影響

The effect of coffee intake on insulin sensitivity in diet-induced obese mice

○江頭 健二、高橋 祥子、阿部 啓子、加藤 久典[1]（東大院・農、[1]東大・総括）

○Kenji Egashira, Shoko Takahashi, Keiko Abe, Hisanori Kato[1] (Todai-in, [1]Todai-sokatu)

【目的】近年、コーヒーの摂取が2型糖尿病の発症リスク低減に有効であるという報告がなされているが、その発生機序に関する知見は少ない。本研究ではカフェインの有無やクロロゲン酸量の異なる各種コーヒー摂取が、食餌誘導性肥満モデルにおけるインスリン感受性に与える影響を解析した。

【方法】8週齢の雄性C57Bl6/6Jマウスに脂肪由来熱量60％の高脂肪食HF（Research Diet：D12492）と高脂肪食に各種コーヒー（カフェイン入り焙煎コーヒーCC、カフェインを除去した焙煎コーヒーDC、カフェイン入り非焙煎コーヒーGC）の粉末を２％添加したものをそれぞれ給餌した。また対照群として通常食ND（Research Diet: D12450B）給餌群を設けた。

飼育は自由摂食で行い９週目に Insulin Tolerance Test(ITT)を行った。

また、と殺時にインスリン溶液を腹部下大静脈に注入しインスリン刺激を行い、骨格筋におけるインスリンシグナルをウェスタンブロット法により解析した。

【結果】飼育期間中、摂食量に有意な差は見られなかったが、各種コーヒー（CC,DC,GC）摂取は高脂肪食給餌による体重の増加及び内臓脂肪の蓄積を有意に抑制した。ITTではHF、コーヒー給餌群でインスリン感受性の低下がみられたものの、各種コーヒー給餌群においてはHFと比べ改善傾向が見られた。また、骨格筋におけるインスリン依存的なIRS1のチロシンリン酸化はHFでは対照群と比べ、減少傾向を示したが、各種コーヒー給餌群では改善傾向が見られた。

本研究において、給餌した全てのコーヒーに高脂肪食誘導性の体重増加抑制効果が見られ、またインスリン感受性悪化の改善傾向が見られたことから、コーヒーはインスリンシグナルを介して2 型糖尿病の発症を抑制している可能性が示唆された。

現在、詳細を検討中である。

insulin , coffee, obesity

講演番号：2J12p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ J校舎12会場

アスパラテインの抗糖尿病作用とその機構

Anti-diabetic effect of aspalathin and their modes of action *in vitro*

○孫　銘辰、三浦　豊、矢ヶ崎一三（東京農工大学・院・応用生命科学）

○Myoungjin Son, Yutaka Miura, Kazumi Yagasaki

[Introduction] Rooibos contains many strong antioxidant substances. In particular aspalathin has the higher antioxidantive ability in comparison with other components. Although rooibos and its flavonoids have been reported to show protective effects against DNA damage, inflammation, and cancer promotion, the research in the field of diabetes is not sufficiently characterized. We investigated mechanism for aspalathin effect, employing a rat skeletal muscle derived cell line (L6) and a rat derived pancreatic β-cell line (RIN-5F).
[Methods] L6 myoblasts were cultured in DMEM containing 10% FBS, and grown for 11days to form myotubes. After serum starvation for 2 hrs, the myoblasts were cultured in Krebs-Hensleit-Hepes (KHH) buffer containing 11mM glucose without or with aspalathin for 4 hours. Glucose uptake was calculated from the differences between initial and final glucose concentrations in KHH buffer. AMPK activation and glucose transporter 4 (GLUT4) translocation to plasma membrane were detected by western blot analysis and transfection of an expression vector of HaloTag-rat glut4. Rin-5F cells were cultured in RPMI 1640 containing 10%FBS. After being cultured for 72hrs, RIN-5F cells received 1% FBS/RPMI 1640 without or with aspalathin. Effect of aspalathin on oxidative stress was examined by measuring intracellular reactive oxygen species (ROS) with a flow cytometer
[Results] Aspalathin increased dose-dependently glucose uptake by L6 myotubes and induced AMPK phosphorylation. We have constructed an expression vector of HaloTag-rat glut4 in order to pursue the position of GLUT4 in muscle cell. Addition of aspalathin activated GLUT4 translocation and colocalization of GLUT4 and Caveolin used as a biomembrane marker. Aspalathin was found to scavenge ROS in RIN-5F cells. Advanced glycation end products (AGEs) were found to increase the ROS level of RIN-5F cells. Aspalathin was found to suppress the AGEs-induced rises in ROS.

Glucose metabolism, GLUT4 translocation, Anti-diabetic effect

講演番号:2J12p20
講演日時、会場:3月23日17:48～ J校舎12会場

糖尿病に対するダイゼインとエクオールの作用解析

Anti-diabetic effect of daidzein and equol and their modes of action

○古橋 慶亮[1]、伊藤 克晃[2]、長岡 真聡[2]、三浦 豊[2]、矢ヶ崎 一三[2]（[1]東京農工大・農、[2]東京農工大・院・応用生命化学）

○Keisuke Furuhashi, Katsuki Ito, Masato Nagaoka, Yutaka Miura, Kazumi Yagasaki (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】近年、糖尿病患者数は増加しており、その対策が急務とされている。食品因子を用い血糖値上昇を制御できれば、その発症、進展を早期から予防、抑制することが可能になると考えられる。ダイゼインは大豆中に含まれるイソフラボンであり、腸内細菌によりエクオールに変換されることが知られている。私たちは、ダイゼインとエクオールがL6筋管細胞においてグルコース取り込みを促進することを既に報告した。本研究では、ダイゼインとエクオールのL6筋管細胞におけるグルコース取り込み促進機構およびダイゼインとエクオールの2型糖尿病モデルdb/dbマウスにおける*in vivo*での作用を検討する。【方法】100μMダイゼインまたは1μMのエクオールと11 mMのグルコースを含む実験培地中で培養したL6筋管細胞中のAMPKのリン酸化、細胞膜へ移行したGLUT4をWestern blottingによって検出した。HaloTag glut4 expression vectorをトランスフェクションしたL6筋芽細胞を100μMダイゼインまたは1μMのエクオールと11 mMのグルコースを含む実験培地中で30分培養し、Halo-GLUT4とcaveolin-3の共局在を抗Halo-Tag抗体と抗caveolin-3抗体、および蛍光プローブを結合した二次抗体を用いて可視化することによってGLUT4の細胞膜移行を検討した。マウスは正常群としてmisty雄マウス、糖尿病群としてdb/db雄マウスを用いた。糖尿病群は血糖値、体重が等しくなるよう2群に分け、対照群と実験群とした。正常群、対照群、実験群のそれぞれに、0%、0%、0.1%のダイゼインを含む20%カゼイン食を摂取させた。この間、体重、食下量、週に一度絶食時血糖値を、また解剖後には血清脂質やアディポカイン、肝臓中の脂質を測定した。【結果】ダイゼインとエクオールを培地中に添加することでGLUT4の細胞膜移行量とAMPKのリン酸化レベルが増加した。このことから、ダイゼインとエクオールはAMPKシグナル経路を活性化することによりGLUT4の細胞膜移行を増加させ、L6筋管細胞におけるグルコース取り込みを促進することが示唆された。GLUT4の配列を含まないベクターをトランスフェクションしたL6筋芽細胞ではHaloTagタンパク質およびcaveolin-3はそれぞれ核を除く細胞全体に発現が見られ、共局在は認められなかった。一方、GLUT4の配列を含むベクターをトランスフェクションしたL6筋芽細胞ではHalo-GLUT4とcaveolin-3の共局在が認められ、さらにダイゼインとエクオール存在下では細胞膜上での共局在が強く認められた。*in vivo*については現在検討中である。

Type 2 Diabetes, isoflavone, AMPK signaling

講演番号：2J13a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ J校舎13会場

リン脂質過酸化物により劣化した分化PC12細胞への各種抗酸化剤の効果

Effects of Various Antioxidative Agents on Differentiated PC12 Cells Deteriorated by Phosphatidylcholine Hydroperoxides

○山中 裕佳子、羽柴 澄子、山田 瞳、酒井 芙弥子、川口 真規子[1]、土井 裕司（武庫川女子大・食物栄養、[1]甲子園大・フードデザイン）

○ Yamanaka Yukako, Hashiba Sumiko, Yamada Hitomi, Sakai Fumiko, Kawaguchi Makiko[1], Doi Hiroshi (Mukogawa Women's Univ., [1]Koshien Univ.)

【目的】社会の高齢化に伴いアルツハイマー型認知症は増加してきている。本研究では、老化メカニズムの一つとして脂質過酸化物は細胞骨格を傷害し、認知症を招くと考えている。昨年度までの研究で、リン脂質過酸化物(PO)が細胞骨格の形成を阻害し、生細胞数を減少させること、また細胞膜を損傷させることを明らかにした。そこで次に老化予防法を見出すため、POにより劣化させた細胞への各種抗酸化剤の効果を細胞培養実験で検討した。

【方法】細胞には、神経細胞モデルであるラット副腎由来PC12細胞を分化させて用いた。POは大豆由来リン脂質を光増感酸化させて得た。抗酸化剤として9種類の既知抗酸化物質を用いた。PO 20～100 μMの存在下で劣化させた分化PC12細胞の培地に各種抗酸化剤を添加した。生細胞数への影響はCell Counting Kit(WST-8)を用い測定した。細胞骨格形成への影響はGTPase活性、抗酸化系酵素の影響の一つとしてSOD活性を測定し、更に、DPPP法を用いて細胞膜の過酸化の状態に検討を加えた。

【結果及び考察】POで劣化させた細胞にエピカテキンまたはβ-カロテンを添加すると抗酸化剤無添加と比べて生細胞数が増加し、それらの濃度依存性もみられた。細胞骨格形成の検討ではケルセチンまたはエピカテキン添加の効果が認められた。更に、β-カロテンまたはケルセチン添加で細胞内のSODの活性化が認められた。また、β-カロテン、エピカテキン、サポニンの添加により細胞膜の過酸化が減少した。

このことより、抗酸化剤によって劣化した細胞の増殖に関係するもの、劣化した細胞骨格形成を形成しなおすもの、細胞内抗酸化系であるSODの活性化をするものがみられた。

Antioxidative agents, PC12 cell, Phosphatidylcholine hydroperoxides

講演番号：2J13a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ J校舎13会場

神経変性疾患関連タンパク質における脂質過酸化に由来する翻訳後修飾の解析

Analysis of posttranslational modification against the proteins related to neurodegenerative disorder

○日坂 真輔、林 佳美[1]、田嶋 翔一、吉村 知優里、赤津 裕康[2]、永井(社本) 雅代[3, 4]、加藤 陽二[5]、能勢 充彦、丸山 和佳子[3]、大澤 俊彦[6]（名城大・薬、[1]名大院・生命農学 [2]福祉村病院、[3]長寿医療センター、[4]JSPS特別研究員 RPD、[5]兵庫県立大学・環境人間、[6]愛知学院大学・心身科学）

○Shinsuke Hisaka, Yoshimi Hayashi[1], Shoichi Tashima, Chiyuri Yoshimura, Hiroyasu Akatsu[2], Masayo Shamoto-Nagai[3, 4], Yoji Kato[5], Mitsuhiko Nose, Wakako Maruyama[3], Toshihiko Osawa[6] (Meijo University, [1]Nagoya University, [2]Fukushimura-hospital, [3]National center of Geriatrics and Gerontology, [4]JSPS Research Fellow, [5]University of Hyogo, [6]Aichi Gakuin University)

【目的】加齢は、アルツハイマー病（AD）のような神経変性疾患発症において重要なリスクファクターの一つといわれている。また、加齢に伴い生体内の酸化ストレスが増加することも知られている。一般的に、この酸化ストレス下では、多価不飽和脂肪酸は容易に酸化され、反応性に富んだ脂質過酸化物が生成する。これら脂質過酸化物は、生体成分であるタンパク質に対して非酵素的な修飾反応を示し、特徴ある付加構造が形成される。本研究では、このような付加修飾構造を酸化ストレスマーカーとして捉え、タンパク質修飾と神経変性疾患、とりわけ AD との関連性を検証することを目的としている。

【方法・結果】本研究では、脳内に最も多く有するドコサヘキサエン酸（DHA）の酸化物に由来するリジン付加体、N-(propanoyl)-lysine（PRL）に着目した。この PRL を検出するモノクローナル抗体を作製し、AD 患者の脳切片における免疫組織化学染色を行った結果、コントロールと比較して顕著な免疫染色像が認められた。また、この陽性染色像は AD の特徴的な病理像である老人斑と局在が一致することが観察され、ヒト髄液を用いた解析からアミロイドβ（Aβ）がプロパノイル化の標的タンパク質の一つであることが認められた。現在、このプロパノイル化による Aβ の生理作用の変化について検証している。

lipid peroxidation, oxidative stress, Alzheimer’s disease

講演番号：2J13a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ J校舎13会場

皮膚モデル培養細胞へのUVA照射による過酸化コレステロールの生成と膜マイクロドメインへの分布

Production of peroxidized cholesterol and its distribution to membrane microdomain in UVA-irradiated fibroblast cells.

○中村　俊之、松井　直子、島田　祥子、河合　慶親[1]、寺尾　純二（徳大院・HBS研究部、[1]名大院・農）

○Toshiyuki Nakamura, Naoko Matsui, Sachiko Shimada, Yoshichika Kawai[1], Junji Terao (Graduate School of Nutrition and Bioscience, the University of Tokushima, [1]Nagoya University Graduate School of Bioagricultural Sciences)

【目的】皮膚は外部環境から生体を保護する役割を担っており、常に様々な危険因子に曝されている。その危険因子の一つに紫外線があり、全体の90%以上を占める長波長紫外線UVAは真皮に到達し活性酸素種（ROS）を産生すると考えられる。ROSは生体膜の主要構成脂質であるcholesterolを過酸化しcholesterol hydroperoxide（Chol-OOHs）を生成する。我々はこれまでに、UVAを照射したマウス皮膚において皮膚光老化に関与するコラーゲン分解酵素であるmatrix metalloproteinase-9（MMP-9）の発現が上昇していること、およびChol-OOHsの皮内注射によりMMP-9活性が上昇することを見出した[1]。本研究では、真皮モデル細胞としてNIH-3T3マウス繊維芽細胞を用い、UVA照射した細胞に生成するChol-OOHsの分析を行うとともに、コレステロールに富む膜マイクロドメインに着目してChol-OOHsの細胞膜分布を検討した。

【方法】UVA照射したNIH-3T3細胞を超遠心し、膜マイクロドメイン画分と非画分に分離した。各画分について、DPPP-TLCブロット法[2]による分離・前処理を行った後、TMS誘導体としてGC-MS-SIM分析を行った。

【結果】GC-MS-SIM分析の結果、UVA照射した細胞溶解液からChol-7α-OOHおよびChol-7β-OOHとともに一重項酸素酸化反応特異的異性体であるChol-5α-OOHが検出された。さらに、細胞溶解液をカベオラ／ラフト分離キットを用いた超遠心法により、Chol-OOHsの膜マイクロドメインへの分布が確認された。さらに、Chol-OOHsを細胞に添加した場合も膜マイクロドメイン画分に取り込まれた。これらのことから、UVA暴露により発生したROS（一重項酸素を含む）が脂質過酸化反応を惹起することで、膜マイクロドメインにChol-OOHsが蓄積し膜構造変化が起こることが示唆された。

[1]Minami et al. *J. Nutr. Biochem.* 20:389-398(2009)
[2]Minami et al. *Lipids* 42:1055-1063(2007)

Cholesterol hydroperoxide, Membrane microdomain, Photoaging

講演番号：2J13a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ J校舎13会場

脂質過酸化を誘導したラットへの過酸化物還元活性を有する乳酸菌の投与効果

The effect of administration of lactic acid bacteria with hydroperoxide reducing activity to the rat induced lipid peroxidation

○渡邊 昭夫[1,2]、安富 葉子[3]、室田 佳恵子[3]、古川 令[4,2]、佐藤 純一[2]、新村 洋一[2]、寺尾 純二[3] ([1]大洋香料、[2]東農大応生科・バイオ、[3]徳島大院・ヘルスバイオサイエンス、[4]古川リサーチ＆コンサルティング)

○Akio Watanabe[1,2], Youko Yasutomi[3], Kaeko Murota[3], Satoru Furukawa[4,2], Junichi Sato[2], Youichi Niimura[2], Junji Terao[3] ([1]TAIYO Corporation, [2]Tokyo University of Agriculture, Department of Bio-Science, [3]The University of Tokushima, Graduate School of Nutrition and Bioscience, [4]Furukawa research & consulting,)

【目的】　私達は菌体外の過酸化水素を還元する乳酸菌*Pediococcus pentosaceus* Be1株、過酸化脂質を還元する*Lactobacillus plantarum* P1-2株を分離し、過酸化物還元には生菌であること、生育基質を必要とすることを見いだしている。分離乳酸菌株は線虫短寿命突然変異体に投与したところ、平均寿命が延長され死滅直前まで活動が賦活化される効果が得られ、*L. plantarum* P1-2株は線虫が加齢時に蓄積するリポフスチンの蓄積を抑制する結果を得た[1)]。線虫での検討結果を踏まえ小腸、大腸を有する動物で検討する為に、鉄剤で消化管の脂質過酸化を誘導[2)]したラットを用いて分離乳酸菌の投与効果を検討した。

【方法と結果】　6 週齢、Wistar 雄性ラットを試験に供した。消化管内に脂質過酸化を誘導する為、フマル酸鉄を投与した。乳酸菌は *P. pentosaceus* Be1 株、*L. plantarum* P1-2 株、対照乳酸菌として *Streptococcus thermophilus* NRIC 0256^T 株の凍結乾燥末を精製飼料 AIN-76 に配合して使用した。精製飼料 AIN-76 投与による 1 週間の予備飼育期間後、2 週間 0.5%フマル酸鉄、5%乳酸菌末を配合した飼料を投与した。心臓または腹部大動脈から採血し屠殺後、血漿、胃、小腸、大腸、肝臓を摘出して各臓器ホモジネートを調製した。脂質過酸化の指標として各臓器ホモジネート中のマロンジアルデヒド（MDA）を比色法にて測定し、ホモジネート中のタンパク質当たりの濃度に算出して各臓器の脂質過酸化を比較検討した。

フマル酸鉄は大腸、肝臓ホモジネート中の MDA を投与量依存的に上昇させた。また、各乳酸菌死菌末の投与、対照乳酸菌の投与では各臓器ホモジネート中 MDA に有意差は観察されなかった。一方、*L. plantarum* P1-2 株生菌末投与群は大腸ホモジネート中 MDA が有意に低値を示した。これらの結果をもとに、過酸化物還元活性を有する乳酸菌の他の動物及び人間への投与効果を検討していきたい。

1)　菌体外の過酸化物還元能力を有する乳酸菌の線虫短寿命突然変異体への投与効果　渡邊ら、本大会、2011年

2)　Miyamoto S. *et al*; Yoshikawa T (ed): Oxidative Stress and Digestive Diseases. Basel, Karger, 2001, pp 103-113

Lactic acid bacteria, Lipid peroxidation, Probiotics

講演番号：2J13a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ J校舎13会場

親油性ORAC測定法の改良による分析精度の向上

Improvement and validation of lipophilic-ORAC method for measuring antioxidant capacity

○渡辺 純、竹林 純[1]、沖 智之[2]、山崎 光司[3]、安井 明美、石川（高野） 祐子（農研機構食総研、[1]国立健栄研、[2]農研機構九州研、[3]太陽化学）

○ Jun Watanabe, Jun Takebayashi[1], Tomoyuki Oki[2], Koji Yamasaki[3], Akemi Yasui, Yuko Takano-Ishikawa (Natl Food Res Inst, [1]Natl Inst Nutrition, [2]Kyushu Okinawa Agric Res Cen, [3]Taiyokagaku Co.)

【目的】Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 法では、ペルオキシルラジカルがフルオレセインを分解し蛍光強度が減弱する過程を測定し、蛍光強度の曲線下面積 (AUC) をもとにTrolox当量として抗酸化能を表す。本研究は、親油性物質のORAC (L-ORAC) 測定における分析精度が悪い要因を明らかにし、精度が向上した改良法を開発することを目的とした。

【方法】親油性抗酸化物質の緩衝液への溶解にメチル化シクロデキストリンを含有する50 %アセトン溶液を用いるL-ORAC標準法[1)]、L-ORAC改良法の2法により代表的な親油性抗酸化物質5種（α-tocopherol, γ-oryzanol, di *t*-buthylhydroxytoluene, *t*-buthylhydroxyanisole, 2,6-di *t*-buthyl-*p*-cresol）のDMSO溶液（1 g/L)、食品抽出液（カボチャ, ホウレンソウ, ニンジン, ブロッコリー, レタス凍結乾燥物のヘキサン-ジクロロメタン（1:1）抽出液をDMSOに転溶した溶液）のL-ORAC測定を反復して行い、併行精度・中間精度を比較した。

【結果】L-ORAC標準法による5種の抗酸化物質の抗酸化能測定の併行精度は相対標準偏差として10.0 - 24.5 %、中間精度は9.3-32.5 %であり、分析精度は十分でないと考えられた。分析精度が悪い要因として、試料溶液からのアセトンの揮発、試料の希釈・分注に用いるプラスチック容器からの可塑剤の試料溶液への混入が考えられた。測定プレート上部にプレートシールを貼付し、試料の希釈・分注にガラス容器およびガラスキャピラリーを用いるL-ORAC改良法を構築した。また、親水性ORAC (H-ORAC) 測定と同様に[2)]試料の希釈倍率がL-ORAC値と正の相関を示したことから、1段階目の測定でL-ORAC予測値を算出し、全ての試料が同程度のAUCを示す希釈倍率で2段階目の測定を実施するH-ORAC改良法と同様の改良をL-ORAC改良法に取り入れた。L-ORAC改良法による5種の抗酸化物質の抗酸化能測定の併行精度は1.3 - 8.0 %、中間精度は5.0 - 9.5 %であり、L-ORAC標準法と比較して大幅な精度の向上が見られた。5種の食品抽出液の抗酸化能測定の併行精度は2.3 - 3.2 %、中間精度は2.1 - 4.7 %であり、抗酸化物質溶液の抗酸化能測定と同程度の精度で評価できるものと考えられた。

[1)] Jimenez-Alvarez *et al*, *J Agric Food Chem*, **56**, 3470 (2008).

[2)] Watanabe *et al*, *Anal Sci*, in press.

antioxidant capacity, lipophilic-oxygen radical absorbance capacity, method validation

講演番号：2J13a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ J校舎13会場

ESRを用いた脂溶性抗酸化物質の評価法の開発

New antioxidant capacity assay for lipophilic compounds using ESR

○高橋　有志、一守　康史[1]、岡野　和史[2]、後藤　浩文、五十嵐　友二（日本食品分析セ、[1]ギガテック（株）、[2]（株）JEOL RESONANCE）

○Yushi Takahashi, Kohji Ichimori, Masahito Okano, Hirofumi Goto, Tomoji Igarashi(Japan Food Research Laboratories, [1]Gigatec Co.,Ltd., [2]JEOL RESONANCE Inc.)

【目的】

抗酸化力の評価法にはDPPHラジカル消去活性やスーパーオキシド消去活性、活性酸素吸収能力(ORAC)など数多くが存在する。そのなかでORACは、脂溶性の抗酸化物質を測定することができることに特徴がある。開発者である米国農務省で用いられているORAC法は水溶性のORAC(H-ORAC)と脂溶性のORAC(L-ORAC)を別々に測定しそれらを合計した値をTotal-ORACとしている。このL-ORACの方法では脂溶性をターゲットにしているが、反応系が水系のために脂溶性抗酸化物質の測定では支障をきたす場合がある。このように現在の評価法の多くは、反応系が水系で設計されているために脂溶性抗酸化物質の測定には必ずしも適しているわけではない。そのためわれわれは電子スピン共鳴装置(ESR)を用いて、反応系を含めて全て有機溶媒を使用した脂溶性の抗酸化力を評価する方法について検討したので報告する。

【方法】

ラジカル発生剤にはDi-*tert*-butyl peroxide(tBuOOtBu)を用い、紫外線を当てることでペルオキシドラジカルを発生させた。発生したラジカルはスピントラップ剤であるDMPOで捕捉しESRで測定した。ESRは日本電子製Multi-Analyzer(MA10)を用いた。試薬の調製と測定には基本溶媒としてアセトニトリルを用いた。

【結果】

tBuOOtBuの吸収スペクトルを測定した結果，400nmより長波長側の光をほとんど吸収しなかった。しかし、400nm以下の紫外線を照射するとDMPOに影響を与えることと、エネルギーの高い紫外線照射によるサンプルへの影響を考慮し、紫外線は短波長カットフィルタと熱線カットフィルタを用いて400～730nmの光を照射するように調整した。測定系の最適化の検討を行い、紫外線照射時間は15秒とし、DMPOとtBuOOtBuの終濃度はそれぞれ5mM及び250mMとした。また、tBuOOtBuの調製にガラス器具を用いると値が大きくばらついた。このため試薬の調製と反応の際にはPP製のチューブを用いた。この結果、値のばらつきは解消され安定した。以上のように決定した反応条件でカテキン(0～2mM)、α-トコフェロール(0.4～1mM)及びトロロックス(0～3mM)を測定した。それぞれの抗酸化力と濃度には直線性がみられ、その相関係数はカテキン0.999、トロロックス0.996及びα-トコフェロール0.993であった。以上のことから今回検討した方法は、脂溶性の抗酸化物質の評価法として活用できることが示唆された。

ESR, lipophilic-antioxidant

講演番号：2J13a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ J校舎13会場

ビタミンC欠乏SMP30/GNLノックアウトマウスへの経口投与によるオリーブオイルポテトチップス「オリービー」の抗酸化活性の評価

Evaluation of antioxidant activity of olive oil potato chips “Olivee” after oral administration in vitamin C-deficient SMP30/GNL knockout mice

○佐久間 塁、近藤 嘉高[1]、市澤 恵、石原 克之、久保 美沙子、半田 節子[1]、麦田 裕之、丸山 直記[1]、古賀 秀徳、石神 昭人[1]（カルビー株式会社、[1]東京都健康長寿医療センター・老化制御）

○Rui Sakuma, Yoshitaka Kondo[1], Megumi Ichisawa, Katsuyuki Ishihara, Misako Kubo, Setsuko Handa[1], Hiroyuki Mugita, Naoki Maruyama[1], Hidenori Koga, Akihito Ishigami[1] (Calbee, Inc., [1]Aging Regulation, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

【目的】ポテトチップス（PC）は、薄くスライスしたじゃがいもを短時間のフライ調理で水分を蒸発させることによる濃縮効果により、ビタミンCをはじめビタミンB群やミネラルを豊富に含んでいる。日本農芸化学会2010年度大会において、我々はPCに含まれるビタミンCはヒトにおいて腸管吸収された後、血中に移行することを報告した。しかし、PCより摂取したビタミンCの臓器移行については明らかとなっていなかった。本研究では、PCに含まれるビタミンCの臓器・組織への移行及びPCの生体内における抗酸化能について、ビタミンCを合成できないSMP30/GNLノックアウト（KO）マウスを用いて検討した。
【方法】PCはオリーブオイルでフライしたPCである「オリービー」（カルビー株式会社、ビタミンC含量78 mg/100 g）を用いた。PC配合飼料は、粉砕したPCとビタミンC欠乏粉末飼料（CL-2、日本クレア株式会社）を混合することにより調製した。KOマウスは4週齢で離乳後、5匹ずつ4群（20%（w/w）PC配合飼料投与群、10%（w/w）PC配合飼料投与群、ビタミンC欠乏群、1.5 g/L ビタミンC水投与群）に分けて飼育した。7週間飼育したKOマウスから採血後、臓器・組織（脳、眼球、心臓、肺、胃、小腸、大腸、精巣、足底筋、平目筋）を採取し、総ビタミンC（還元型及び酸化型の合計）濃度と活性酸素種（ROS）を測定した。総ビタミンCは、高速液体クロマトフラフィー−電気化学検出器を用いて測定した。ROSの測定はcarboxy-H_2DCFDAを検出試薬として用いた。全ての動物実験は、東京都健康長寿医療センター動物実験委員会の承認を得て実施した。
【結果】血漿中の総ビタミンC濃度は、ビタミンC水投与群に比べて20% PC配合飼料投与群では89%、10% PC配合飼料投与群では14%、ビタミンC欠乏群では1%であった。また、臓器・組織中の総ビタミンC濃度は、20% PC配合飼料投与群では80-105%、10% PC配合飼料投与群では24-51%、ビタミンC欠乏群では3-8%であった。飼料中のPC配合率が高くなるにつれて血漿中や臓器・組織中の総ビタミンC濃度が高かったことから、PC中のビタミンCはKOマウスに吸収されて血中に移行し、さらに臓器・組織へ到達することが分かった。一方、ROSは20% PC配合飼料投与群では94-117%、10% PC配合飼料投与群では115-194%、ビタミンC欠乏群では142-322%と、飼料中のPC配合率が高くなるにつれてROSは少なかった。以上の結果から、PCに含まれるビタミンCは臓器・組織へ移行し、さらにPC摂取は臓器・組織中のROSを低減できることが示された。

potato chips, vitamin C, reactive oxygen species

講演番号：2J13a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ J校舎13会場

トコトリエノールによる細胞分裂寿命の延長

Tocotrienol extends replicative lifespan of normal human fibroblasts

○永塚 貴弘、仲川 清隆[1]、西田 浩志、倉田 忠男、宮澤 陽夫[1]（新潟薬大・応生科、[1]東北大院農・機能分子解析）

○Takahiro Eitsuka, Kiyotaka Nakagawa[1], Hiroshi Nishida, Tadao Kurata, Teruo Miyazawa (Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, [1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

【目的】正常細胞は一定の分裂回数の後に増殖を停止して老化に至る。染色体末端に存在するテロメアは末端複製問題のため細胞分裂の度に徐々に短縮する特徴があり、テロメアがある一定の長さ以下になると細胞は分裂を停止することが知られている。近年、酸化ストレスがテロメアの短縮を促進することが明らかになった。このことから、酸化ストレスの軽減により細胞の分裂寿命を延ばすことができると考えられる。不飽和ビタミンEであるトコトリエノール（T3）は抗酸化、抗血管新生、癌細胞増殖抑制などの多様な生理作用を示し、トコフェロール（Toc）よりも高い生理活性を有することが示唆されているため、近年注目を集めている。本研究では、T3のテロメア短縮抑制を介した細胞分裂寿命の延長効果を培養細胞試験により検証することを目的とした。

【方法・結果】α-T3を生理的な濃度（1μM）でヒト皮膚由来線維芽細胞NB1RGBに処理して継代を繰り返し、細胞分裂回数（population doubling level; PDL）をセルカウンターで計測した。NB1RGBはPDL58で分裂を停止したが、α-T3の添加により分裂寿命が延び、PDL66で細胞老化に陥った。老化マーカーとして知られるSA-β-Gal（senescence associated β-galactosidase）の発現を調べたところ、α-T3を処理したNB1RGBでは発現レベルが抑制されていた。継代の際にDNAを抽出し、サザンブロット法とQ-PCR法でテロメア長を測定した。その結果、PDLの増加に伴ったテロメア長の短縮が認められたが、α-T3はテロメアDNAの短小化を効果的に軽減した。テロメア短縮に由来する老化シグナルは、p53とp21の発現誘導によって細胞分裂を停止させることがわかっている。リアルタイムRT-PCRを用いた遺伝子発現解析により細胞老化に対する影響を評価した結果、α-T3を添加することでp53とp21のmRNA発現が抑制された。細胞内の活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）をDCFH（2',7'-dichlorodihydrofluorescein）法で測定したところ、α-T3はROSレベルを有意に低減させた。以上より、α-T3は酸化ストレスの軽減を介してテロメアの短縮を防止するため、老化マーカーであるSA-β-Gal、p53、p21の発現が抑えられ、結果、細胞の分裂寿命が延長することがわかった。なお、α-Toc（1μM）のテロメア短縮抑制効果はα-T3よりも弱く、α-Tocを処理したNB1RGBはPDL61で細胞分裂を停止した。本研究により、テロメア短縮抑制を介したアンチエイジングにT3を活用できる可能性が期待された。

Tocotrienol, Telomere, Anti-aging

講演番号：2J13a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ J校舎13会場

リコピンによる皮膚中抗酸化物質産生の誘導

Lycopene enhances the antioxidant productions in human skin cells.

○久野　江梨子、小田　由里子、植田　文教、(富士フイルム株式会社)
○Eriko Kuno, Yuriko Oda, Fumitaka Ueda, (FUJIFILM Corporation)

トマトなどの植物に多く含まれているリコピン（Lycopene）はカロテノイドの一種であり、複数の疾病に対する予防や治癒効果が期待されている。

一方、加齢や喫煙、ストレスなどにより生体内で引き起こされる酸化ストレスは、メタボリックシンドロームや肝機能障害をはじめとする様々な疾患を引き起こす。皮膚では、紫外線などにより生じた酸化ストレスが、細胞死や炎症を惹起し、しみ、しわ、くすみ、ターンオーバーの乱れなどの肌トラブルの原因となっている。

このような酸化ストレスに対する生体防御の主要なものとしてKeap1-Nrf2（Keap1:Kelch like ECH associated protein 1, Nrf2: NF-E2 related factor-2）経路が知られている。通常、Nrf2タンパクはKeap1タンパクと結合し細胞質中に存在しているが、酸化ストレスなどによりNrf2タンパクがKeap1タンパクから解離されると核へと移行する。核へ移行したNrf2タンパクはsmall Maf タンパクと共にARE領域に結合し、第二相異物代謝酵素や抗酸化タンパク質をコードした一連の抗酸化関連遺伝子の転写を誘導する。

本研究では、皮膚Keap1-Nrf2経路に対するリコピンの作用について着目し、HaCaT（ヒトケラチノサイト）細胞を用い検討を行った。その結果、リコピンが皮膚細胞において、Keap1-Nrf2経路を亢進し、細胞内抗酸化物質であるグルタチオンの産生を誘導することが明らかとなった。

Keyword1 : Lycopene, Keyword2 : skin, Keyword3 : Nrf2

講演番号：2J13a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ J校舎13会場

タイトル　亜臨界水抽出による新規嗜好性緑茶の開発に関する化学的研究

Title Chemical study on the new palatability green tea development by sub-critical water extraction.

○宮下　知也、衛藤　英男[1]（静大創造・バイオサイエンス、[1]静大・農）

○Tomoya Miyashita, Hideo Etoh[1]（Shizudaisouzou、[1]Shizudai）

【目的】現代では、ペットボトル飲料のお茶が普及し若者を中心に消費者に受け入れられているが、お茶独特の苦味や渋味は好まれておらず、美味しく飲みやすい緑茶製品が求められている。そこで、亜臨界水抽出装置により、緑茶の味、風味の改善を試みた。その結果、高濃度のカテキン含有でありながら苦渋味が従来の抽出方法等に比べ、明らかに抑制された緑茶エキスを得ることに成功した。亜臨界水抽出により緑茶の苦渋味が軽減されること、また緑茶の味、香りに関与する成分が変化することを官能および化学分析により評価し検証を行うことを目的とした。

【方法】緑茶（茶葉）に水を混合し、熱水抽出、加圧抽出、亜臨界水抽出と異なる抽出方法を用いて処理を行った。熱水抽出は90℃、加圧抽出は130℃(約0.3MPa)、亜臨界水抽出は120～180℃、3.0MPa（圧力）以上の条件で抽出を行い、その後濾過した抽出エキスを試験サンプルとした。それぞれの緑茶エキスサンプルに対してまずカテキン量を測定し、その後カテキン含有量を同一させての試飲官能評価、味覚センサー分析、抗酸化能測定、アミノ酸分析、全糖量測定、におい識別分析等により得られた緑茶エキスサンプルの味、香りに対する成分の化学的な分析を行った。

【結果】それぞれの抽出方法により得られた緑茶エキスサンプルのカテキン含有量を同一(200mg/g）に調整して試飲・官能評価を行ったところ、熱水抽出、加圧抽出により得られた緑茶サンプルに比べ、亜臨界水抽出で得られた緑茶エキスはカテキン特有の苦渋味が抑制され飲みやすくなっていた。この結果を受け、味、香りに関連する成分を各種化学的分析により評価を行った。味覚センサー分析の結果では熱水抽出サンプルに対して亜臨界水抽出サンプルは渋味(先味、後味）のパラメーターが低くなっていることが確認された。アミノ酸分析の結果では亜臨界水抽出の緑茶エキスサンプルが熱水抽出、加圧抽出サンプルに比べ総アミノ酸量が増えていることが確認され、また全糖量についても同様に増加していることが分かった。この結果によりアルギニン等のアミノ酸や糖の成分が苦渋味レセプターに結合してマスキングすることにより苦渋味を抑制しているのではと示唆された。また、緑茶の香りの変化についてにおい識別装置により評価した結果、緑茶としては好ましくないにおい成分が熱水抽出、加圧抽出の緑茶エキスと比較して低下することが確認され抽出方法により香りの質が異なるという結果が得られた。今後、苦渋味抑制メカニズムの解明や呈味改善効果の化学的分析評価や得られる緑茶エキスの機能性について検討を行っていく予定である。

sub-critical water, new palatability , green tea

講演番号：2J13a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ J校舎13会場

コーヒー豆の亜臨界抽出に関する研究

Sub-critical Water Extraction of Coffee Beans

○加藤 久喜、衛藤　英男[1]（静大院・農、[1]静大・農）
○Kyuki Kato, Hideo Etoh[1] (Shizudaiin, [1]Shizudai)

【目的】温度374℃、圧力22.1MPaの臨界点より低い温度の100～374℃の範囲かつ、気―液平衡線以上の圧力の高温高圧下で液体状態を保った水を亜臨界水と呼ぶ。亜臨界水は比誘電率の値が有機溶媒と同程度となるため、有機溶媒のように疎水性物質を抽出することが出来る。さらに水中の水素イオン濃度、水酸化物イオン濃度が共に高く、酸触媒、塩基触媒として働くため強い加水分解反応が起きる。その他にも高温のために焙煎効果も期待できる。これらの特性を生かし、天然成分からのエッセンシャルオイル、抗酸化物質などの有用成分の抽出、難分解性および有害物質の分解、有害物質の除去、タンパク質からアミノ酸生成、多糖から単糖および有機酸の生成など、亜臨界水を利用した研究が現在盛んに行われている。当研究室ではすでに大麦から麦茶様エキスの製造、ヘマトコッカスからアスタキサンチンの抽出を行ってきた。今回、生コーヒー豆を用いることにより今までにないコーヒー様エキスを製造し、焙煎コーヒーとの成分の違い、機能性を追求することを目的とした。
【方法】生コーヒー豆の粉砕物10gと水250mlを混合し、3MPaの圧力、160、180、200、220、240℃の温度、1、5minの保持時間で亜臨界水抽出を行い、これを亜臨界抽出サンプルとした。さらに、焙煎豆を90℃の熱水で抽出したものを熱水抽出サンプルとした。各種サンプルにおいて味覚評価を行い、単糖、全糖、タンパク質、アミノ酸、クロロゲン酸類、桂皮酸類、カフェイン、トリゴネリン、ナイアシン、メラノイジンなどをそれぞれ分析、定量を行い、抗酸化活性などを測定した。
【結果】味覚評価では200℃が最もコーヒーに近い結果を得たが、焙煎コーヒーとは異なる多くの特徴のある非常に興味深いコーヒー様エキスが得られた。さらに香りはレギュラーコーヒーよりインスタントコーヒーに近いことが明らかになった。成分分析において、亜臨界水抽出サンプルは熱水抽出サンプルと比較して各成分の2～50倍の高い抽出量が認められた。しかしナイアシンは全体的に熱水抽出サンプルよりも量が少なく、メラノイジンは220℃までは熱水抽出サンプルよりも少なかった。アミノ酸、グルコース、桂皮酸類は200～220℃において減少しており、この間の温度においてメラノイジンが増大していることからメラノイジン生成に関与していると示唆された。抗酸化活性は温度が上がるにつれて上昇し、熱水抽出サンプルよりも高い抗酸化活性であることが明らかになった。以上の結果、亜臨界水コーヒーエキスは従来の焙煎コーヒーと異なり、各成分が豊富に含まれている機能性のあるものが得られた。

sub-critical water, coffee beans, antioxidant activity

講演番号：2J13a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ J校舎13会場

アントシアニジンの膜脂質過酸化抑制作用

Inhibition of membrane lipid peroxidation by anthocyanidins

森定敬雅、神林大樹、○原口博行　（福山大・生命工）
Takanori Morisada, Daiki Kanbayashi, Hiroyuki Haraguchi (Fukuyama Univ.)

【目的】有色野菜に含まれるアントシアニンは抗酸化作用が期待される。本稿では、それらの発色団であるアントシアニジンの作用を検討した。今回は、ラット肝臓より調製したミトコンドリア及びミクロソームにおける膜脂質過酸化系に対する抗酸化活性を報告する。

【方法・結果】ペラルゴニジン、シアニジン、デルフィニジン、ペオニジン、マルビジンはそれぞれミトコンドリアにおける電子伝達依存性(NADH及びコハク酸誘導) 及びアスコルビン酸-Fe系による膜脂質過酸化を抑制した。また、これらアントシアニジンはミクロソームにおける電子伝達依存性(NADPH及びNADH誘導)、P-450依存性(CCl_4及び*t*-BuOOH誘導)及びアスコルビン酸-Fe系による膜脂質過酸化も抑制した。さらに、酸化ストレスを与えたミトコンドリアにおける呼吸鎖酵素活性の低下を抑制した。特に、デルフィニジンは強力にミトコンドリア機能を保護した。

anthocyanidin, antioxidative activity, mitochondria

講演番号：2J13a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ J校舎13会場

サルナシ（*Actinidia arguta*）果皮の抗酸化成分（2）

Antioxidative constituents in sarunashi(*Actinidia arguta*) peels (2)

○松坂　裕子（藤女大・食物栄養）、川端　潤（北大院農）
○Yuuko Matsusaka(Fujijyodai), Jun Kawabata(Hokudaiin)

【目的】果実には皮などの部位に実の部分を酸化から守る抗酸化性があり、防御物質などの役割をなしていると考えられている。身近な果実であるマタタビ科のキウイフルーツは、部位別の抗酸化性およびポリフェノール含量の研究がされている。一方、同じマタタビ科のサルナシは、皮ごと食することができ、果実酒などに利用されているが、果皮の抗酸化性の報告は少ない。著者らは、サルナシ果皮の抗酸化性およびポリフェノール含量が果実部、種子部に比べて顕著に高いことを示し、抗酸化性にはプロシアニジン類が寄与していることを示唆した[1)]。今回は他の活性画分より新たな抗酸化成分を同定したので報告する。
【方法】サルナシを凍結乾燥後、部位別に50％エタノールで24時間抽出した。抽出物を酢酸エチルで溶媒分配し、活性の高かった酢酸エチル可溶性画分をセファデックス LH-20カラムクロマトグラフィー、TLC分析、逆相HPLCにより活性成分を精製した。なお、抗酸化性の指標には、DPPHラジカル消去活性を用いた。
【結果】サルナシ果皮のポリフェノール含量および抗酸化性は果実部、種子部に比べて高く、ポリフェノール含量とDPPHラジカル消去活性は正の相関が得られた。活性画分はTLCおよび逆相HPLC分析の結果、標準物質との比較より、ケルセチン配糖体の存在が示唆された。さらに、FD-MSおよび^{1}H-NMR分析に供し、ケルセチン-3-*O*-ガラクトシドを同定した。ケルセチン-3-*O*-ガラクトシドは高い抗酸化性を有するので、サルナシ果皮の抗酸化性に寄与していることが示唆された。

1）日本食品科学工学会　第58回大会講演集（2011年）

Antioxidative constituent,　Sarunashi peels,　Quercetin 3-galactoside

講演番号：2J13a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ J校舎13会場

高感度分析機器を用いた沖縄県産柑橘類中有効成分の分析比較

Analysis comparison of the active ingredient contained in citrus fruits grown in Okinawa by highly-sensitive analytical instrumentation

○當山瑛子　神谷志織[1]　藏屋英介[2]　濱田泰輔[3]　池松真也[3]
（沖縄高専 創造システム工学専攻 生物資源工学コース　[1]静大・農学部・共生バイオ [2]沖縄高専 技術支援室　[3]沖縄高専 生物資源工学科）
○Akiko Touyama, Shiori Kamiya[1], Eisuke Kuraya[2], Taisuke Hamada[3] Tokashiki Tadaaki[4], Shinya Ikematsu[3](cour. of Bioresources Eng. Majo. of crea., ONCT, [1]Dis. of Bio., Dep.of Agr.Univ.of Shizuoka, [2]ONCT Technical Support Center, [3]Dep.of Bioresources Eng.ONCT.)

【目的】沖縄県産の柑橘類は，ポリメトキシフラボノイド(PMF)類であるノビレチン，タンゲレチン，シネンセチンやフラバノン類のヘスペリジン，ナリルチンなどが含有している.そこで本研究では,2009 年 9 月～2010 年 1 月に収穫されたシークヮーサーのカーアチー,無核シークヮーサー，クガニー(勝山，伊豆味，大宜味，伊豆味大宜味)の果皮に含まれる機能性成分(総ポリフェノール量，抗酸化活性，PMF，フラバノン)の含有量を調べ，品種別，収穫時期別，他の柑橘類との比較を行うとともに，PMF とフラバノンについて HPLC と UPLC-MS の 2 つの手法を用いて測定を行い，分析結果の比較を行うことを目的とした.
【方法】＜サンプル調製＞乾燥させた果皮を粉砕し，75%エタノールで 2 週間浸漬し，遠心分離後の上清を測定サンプルとし，総ポリフェノール量，抗酸化活性，PMF，フラバノンをそれぞれ分析した．フラバノンの HPLC 用サンプルは，エタノール:DMSO=1:1 で 1 日浸漬した.
＜総ポリフェノール量の定量＞フォリン・チオカルト法により没食子酸相当量として総ポリフェノール量を求めた．各サンプル溶液にフェノール試薬，10%$NaCO_3$を加え 30 分反応後 700nm の吸光度を測定した.＜抗酸化活性測定法＞DPPH 法を用いた.サンプル溶液に DPPH を加え 20 分反応後，520nm の吸光度を測定し，Trolox 当量として換算した.＜HPLC による分析＞PMF は，移動相にメタノール：10mM リン酸=6：4 を用い，波長 340nm で，フラバノンはメタノール：10mM リン酸=4：6 を用い，波長 285nm でそれぞれ定量した．＜UPLC-MS による分析＞UPLC-MS(Waters 社製)により，移動相に 0.1%ギ酸：アセトニトリル(90:10→40:60 3.5min)，ノビレチン，タンゲレチン，シネンセチン(POS)，ナリルチン，ヘスペリジン(NEGA)で定量を行った.
【結果】総ポリフェノール量，抗酸化活性，PMF は本土の柑橘類より沖縄県産シークヮーサーが高値を示した.フラバノンは本土の柑橘類の方が高値を示した.月別では，各機能性成分は 9 月から 10 月に高値を示した.産地別では伊豆味クガニーが総ポリフェノール量，抗酸化活性において高値を示した.フラバノンの HPLC 分析では，分離が悪く十分な感度が得られなかったが，UPLC-MS 分析では感度良く分析することができた．その結果，他の品種に比べ伊豆味クガニーにヘスペリジンが多く含有されていることが分かった.

Shiikuwasha, flavonoid, PMF

講演番号：2J13a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ J校舎13会場

チオレドキシン高含有酵母抽出物による細胞傷害保護効果および口腔内炎症予防効果

Protective effect of cell damage, and prophylactic effect of oral inflammation by thioredoxin-enriched yeast extract

○伊井野 貴史、山下 裕輔、堀江 健二、金 武祚（株式会社ファーマフーズ）
○Takashi Iino, Yusuke Yamashita, Kenji Horie, Mujo Kim
(Pharma Foods International Co., Ltd.)

【目的】
チオレドキシンは生体が酸化ストレスや炎症に曝されたときに誘導され、抗酸化効果・抗炎症効果を発揮するタンパクである。チオレドキシン高発現遺伝子組み換え動物や実験動物へのチオレドキシン投与実験において、これまでに多数の抗炎症効果・抗酸化効果が報告されている。今回、我々は、チオレドキシン高含有酵母抽出物を用いた細胞傷害保護効果を検証するためのインビトロ実験、および口腔内炎症予防効果を検証するためのヒトボランティア試験を実施したので報告する。
【方法】
細胞傷害保護効果を検証するためのインビトロ実験
ヒト口腔上皮由来細胞株であるKB細胞をPBSで洗浄後、チオレドキシン高含有酵母抽出物および対照物質を添加し、1%過酸化水素水中で２時間インキュベーションし、細胞傷害を与えた。その後、FACLS(Fluorometric Assay based on Cell Lysis and Staining)法により細胞傷害の程度を測定した。
口腔内炎症予防効果を検証するためのヒトボランティア試験
唾液中の炎症マーカー(LDH)の比較的高いヒトボランティアを被験者とし、チオレドキシン高含有酵母抽出物を10 mg/錠含有するタブレットおよびプラセボタブレットを１時間毎に合計９回摂取（噛まずに口中で溶解）してもらい、摂取前後で唾液を採取し、唾液中のLDH活性を測定した。
【結果】
細胞傷害保護効果を検証するためのインビトロ実験
チオレドキシン高含有酵母抽出物を添加した場合、対照物質であるBSAやFCS(ウシ胎児血清)よりも強く濃度依存的に細胞傷害を抑制した。
口腔内炎症予防効果を検証するためのヒトボランティア試験
チオレドキシン高含有酵母抽出物を含有するタブレットを摂取した場合、唾液中の炎症マーカー(LDH)が低下する傾向が見られた。
以上の結果より、チオレドキシン高含有酵母抽出物は口腔内炎症予防用の機能性食品素材として適していることが示唆された。

thioredoxin, cell damage, oral inflammation

講演番号：2J13p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ J校舎13会場

オウゴンエキスの美白効果とその作用機序の解明

Whitening effects of *Scutellaria baicalensis* and its underlying mechanism

○工藤 倫子、小川 達也、小林 久美子、内藤 健太郎 ((株)ディーエイチシー)
○Michiko Kudo, Tatsuya Ogawa, Kumiko Kobayashi, Kentaro Naito (DHC Corporation)

色素細胞は色素性メラニンを恒常的に産生し、紫外線から皮膚を防御する役割を担う。一方、顔や体などの皮膚上に局所的に沈着する色素斑は局所性色素斑と位置づけられ、一般にシミと呼ばれる。白く美しい肌を理想とするアジア圏の女性を中心に、シミは美容的観点から改善したい要素であり、より効果的な美白効果を持つスキンケア対策が求められている。

我々は美白効果の高い成分を見出すため、美白効果があることで知られる約140種類の植物エキスライブラリの中から、マウスB16メラノーマ細胞を用いたメラニン定量による評価方法を基にスクリーニングを行った。その結果、最も美白効果の高い植物エキスとして『オウゴンエキス』を見出した。

次にオウゴンエキスの有効成分を特定するため、複数の有機溶剤を用いた段階的な抽出を行い、メラニン定量による評価を進めた。その結果、極性の異なる2種類の抽出フラクションに美白効果を見出した。さらにHPLC解析を進めた結果、見出した2種類の抽出フラクションの組成がフラボノイドを中心としたものであり、5種類のフラボノイド配糖体とアグリコン、すなわちbaicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, oroxylin Aがそれぞれ異なる比率で含まれることを見出した。

そこで、5種類のフラボノイドについてメラニン定量による評価を進めた結果、baicalinおよびwogoninに美白効果が見られ、特にwogoninの効果が高かった。一方、これまでにbaicaleinが美白効果を有していることを示唆する知見が報告されているが、我々の評価においてはその美白効果はほとんど見出せなかった。さらに個々のフラボノイドに関する細胞毒性の検証を進めた結果、baicalinには美白効果が得られる濃度域において毒性が見られる一方、wogoninにはその濃度域において毒性がほとんど見られなかった。以上の結果から、オウゴンエキスに含まれる有効成分はbaicalinおよびwogoninであること、そしてwogoninがより高い美白効果を有した有効成分であることが示唆された。

我々はオウゴンエキス、およびbaicalinおよびwogoninがもたらす美白効果の作用機序について、現在、メラニン形成の過程を含め色素細胞に及ぼす影響について複数の機能解析の検証を進めており、メラニン産生を抑制すること以外にも効果を有する可能性が示唆されたことから、今回はその最新の知見も含めて報告する。

【参考文献】

Fregrance Journal, 16(3), 99-108, (1988)
Int J Mol Med., Jun;25(6), 923-7, (2010)

Scutellaria baicalensis, Baicalin, Wogonin

講演番号：2J13p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ J校舎13会場

セサミン・エピセサミンの代謝および作用メカニズムの比較

The metabolism of sesamin and episesamin in human body

○安田 佳織、生城　真一、若山　周人[1]、伊藤　俊将[1]、山本　恵子[1]、鎌倉　昌樹、太田 美穂[2]、榊　利之（富山県大・工、[1]昭和薬大・創薬、[2]相愛大・人間）
○Kaori Yasuda, Shinichi Ikushiro, Shuto Wakayama[1], Toshimasa Itoh[1], Keiko Yamamoto[1], Masaki Kamakura, Miho Ohta[2], Toshiyuki Sakaki (Dep. of Biotech., Fac. of Engineer., Toyama Pref. Univ., [1] Fac. of Pharm. Sci., Showa Pharmaceutical Univ.., [3]Dev. Nourish. Dep., Soai Univ.)

セサミンはゴマに含まれるリグナン類の一つであり、さまざまな生理作用を持つことが知られている。その生理作用の中には、抗酸化作用のように代謝物による作用と考えられるものもあり、生理作用のメカニズムを知る上で、ヒト体内での代謝を知ることが重要となる。一方で、医薬品との安全な併用という観点から、薬物代謝酵素に与える影響を調べることも重要な課題である。セサミンはゴマ油からの精製過程で約半分がエピセサミンに転換し、健康食品として市場に出ているものは、セサミンとエピセサミンの等モル混合物となっている。

これらセサミン類のヒト体内での代謝を予測するために、まず、市販のヒト肝ミクロソーム画分および細胞質画分を用いて代謝を調べたところ、セサミン、エピセサミンともに、シトクロムP450(CYP) により抗酸化作用の高いモノカテコール体へと変換された後に、その大部分が UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)によってグルクロン酸抱合体となることがわかった。CYP によるモノカテコール化への代謝を詳細に解析したところ、両者のカテコール化に最も寄与率の高い分子種は CYP2C9 であり、CYP2C9 発現酵母のミクロソーム画分を用いた酵素学的解析から、エピセサミンのカテコール化はセサミンが基質の場合と比べ、6 倍程度起こりにくいことがわかった。すなわち、ヒト体内においてエピセサミンはセサミンよりも代謝されにくく、代謝されない状態で生理活性を発揮する場合にはエピセサミンの方が有利であるといえる。一方、抗酸化能のように、代謝されカテコール体になることによって効果が現れるものについてはセサミンの方が有利である可能性が高い。両者とも、CYP2C9 に対して不可逆阻害(MBI)を起こすことが明らかになったが、その程度はエピセサミンの方が小さく、CYP2C9 で代謝される医薬品を併用する場合には、エピセサミンの方が好ましいと考えられる。

前述したように、多くのサプリメントはセサミンとエピセサミンの等モル混合物であるが、セサミンとエピセサミンは代謝と作用メカニズムがかなり異なっており、用途に応じて使い分けていくことが好ましいと考えられる。

Sesamin, P450, Metabolism

講演番号：2J13p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ J校舎13会場

マンゴスチンの抗酸化性成分の効率的な抽出とその加工食品への利用

Effective extraction of antioxidants from mangosteen and its utilization for processed food

○SUKATTA UDOMLAK[1,2]、竹中真紀子[1]、七山和子[1]、小野裕嗣[1]、五十部誠一郎[1]（(独）農研機構　食品総合研究所[1]、カセサート大学[2]）

○SUKATTA UDOMLAK[1,2], Makiko Takenaka[1], Kazuko Nanayama[1], Hiroshi Ono[1] and Seiichiro Isobe[1]
([1]NFRI, [2]Kasetsart University)

Mangoteen, *Garcinia mangostana* Linn (Guttiferae) is the tropical fruit native to Southeast Asia and it cultivated in the southern and eastern area of Thailand. The xanthones from peel of mangosteen possessed antioxidant, antibacterial, antitumoral and anticancer activities. The objectives of this research were to investigate qualitative and quantitative evaluation of xanthones in each part of mangosteen and prepare useful extract as food material which garantees high concentration of xanthones. Purification of the hexane extract of dried mangosteen peel was led to the isolation of two main compounds α-mangostin and γ-mangostin which were separated by using silica gel column chromatography and their structures were determined using NMR techniques. The quantitatively determined α-mangostin and γ-mangostin by using HPLC showed that dried mangosteen peel contained α-mangostin and γ-mangostin, 52.2 and 13.4 mg/g in dried powder, respectively. The antioxidant activities were evaluated for ethanol extract and their pure compounds in term of both DPPH and FRAP bioassay. All of ethanol extract and pure compounds were found to be a potent antioxidation in these assays. The results from DPPH assay showed that contribution rate of α-mangostin and γ-mangostin in dried mangosteen peel were 11.7 and 30.9 precent, respectively. Whereas the contribution rate of α-mangostin and γ-mangostin in dried mangosteen peel from FRAP assay were 11.6 and 16.4 percent, respectively. It was suggest that ethanol extract of dried mangosteen peel and xanthones from dried mangosteen peel can used as supplement or valuable material of processed foods.

Mangosteen, Xanthones, Antioxidation.

講演番号：2J13p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ J校舎13会場

ベトナム産植物Tramに含まれる抗酸化成分の分析およびUV-A照射への効果

Analyses of antioxidants derived from Tram, Vietnamese plant, and effects of them on UV-A irradiation

○能見 祐理、建守 聡子[1]、清水 咲[2]、大塚 譲（お茶大・生環研セ、[1]お茶大院・ライフ、[2]お茶大生科・食物栄養）
○Yuri Nomi, Satoko Tatemori, Saki Shimizu, Yuzuru Otsuka (Ochanomizu univ.)

【目的】ベトナムで生育するTram（*Syzygium zeylanicum(L.) DC.*：右図）と呼ばれる植物には多くのポリフェノールが含まれ、その抽出物は非常に高い抗酸化活性、抗炎症作用を示すことがわかっている[1, 2)]。しかし、抗酸化活性を示す物質の特定にはいたっておらず、抗酸化機構についても不明である。



そこで我々は、Tramに含有される抗酸化活性を示す物質を同定するとともに、細胞培養実験により抗酸化のメカニズムを明らかにすることにした。本研究では特に、皮膚繊維芽細胞を用いた紫外線照射下におけるTram抽出物の効果について検討した。

【方法および結果】Tramの凍結乾燥粉末をメタノールで抽出し、得られた乾固物を順次各種有機溶媒にて分画した。DPPHラジカル消去活性を指標にして検討したところ、ブタノールおよび水画分に活性がみられた。各々の画分をDiaionHP20カラムクロマトグラフィーにより分画し、活性が高かった20%メタノール溶出画分をHPLCにて分析したところ、270nm付近に極大吸収を持つピークを複数検出した。これらピークを分取HPLCにて単離し、現在MS、NMRによる構造解析を行い物質の同定を試みた。

次にこの抗酸化物質について、新生児正常皮膚繊維芽細胞NB1RGBを用いてUV-A照射による酸化ストレス抑制効果を検討するため、酸化ストレス応答遺伝子の発現および細胞生存率への影響について調べた。細胞を培養後ハンクス緩衝液に培地交換し、UV-Aを10J/cm^{2}照射した。UV-A照射に対するTram由来抗酸化物質の添加の影響をみるため、培地に戻してRNAを抽出し、酸化ストレスやDNA修復、アポトーシスに関わる遺伝子発現を調べるとともに、ROSの測定を行った。結果、Tram由来抗酸化物質がUV-A照射による酸化ストレスに与える影響を明らかにした。

1) Mai, TT *et al.*, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 53(3), 267-276, 2007.
2) Sone, Y *et al.*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2259-2264, 2011.

antioxidant, UV-A, oxidative stress

講演番号：2J13p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ J校舎13会場

乳酸菌*Streptococcus thermophilus* YIT 2001が産生するLDL酸化抑制成分

Principal component that inhibits low-density lipoprotein oxidation in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*

○楠原 史朗、佐藤 直、横井 稚恵、池邨 治夫、外谷 英嗣、原田 勝寿、木村 一雅、宮﨑 幸司、伊藤 雅彦（ヤクルト中研）

○Shiro Kusuhara, Tadashi Sato, Wakae Yokoi, Haruo Ikemura, Hidetsugu Sotoya, Katsutoshi Harada, Kazumasa Kimura, Kouji Miyazaki, Masahiko Ito(Yakult Central Institute for Microbiological Research)

【緒言】低比重リポ蛋白質（LDL）の酸化は、動脈硬化の発症において重要な過程であると考えられており、食品成分によるLDLの酸化抑制効果が種々報告されている。しかしながら、乳酸菌によるLDLの酸化抑制に関する報告は少ない。我々は、乳酸菌の中からLDL酸化抑制活性が高い*Streptococcus thermophilus* YIT 2001を選抜し、高脂肪・高コレステロール食負荷ハムスターへの投与試験において、本菌株が血漿LDLの酸化および大動脈への脂質沈着を抑制することを既に報告した[1)]。今回、本菌株に含まれる活性成分を同定したので報告する。

【方法】ヒト血清から超遠心法でLDL画分を調製し、嫌気条件下においてPBSで一晩透析した。本画分に所定量のサンプルを加えた後、2,2’-azobis-4-dimethylvaleronitrile（V-70；酸化開始剤）を添加し、過酸化脂質濃度の経時変化を共役ジエン法（234 nmの吸光度）で測定した。V-70の添加から過酸化脂質濃度の上昇が始まるまでの時間（酸化lag time）を求め、LDL酸化抑制活性とした。

【結果】*S. thermophilus* YIT 2001の抽出物を逆相クロマトグラフィーにより分画し、強いLDL酸化抑制活性を示す画分についてLC/MS、NMRを用いた解析の結果、当該画分に還元型グルタチオン（GSH）が含まれることが判明した。また、GSHはLDLの酸化を濃度依存的に抑制し、チオール基を誘導体化処理するとLDL酸化抑制活性は消失した。菌体抽出物も同様に誘導体化すると活性は低減した。乳酸菌菌体中のGSH含量を測定した結果、本菌株は他の乳酸菌（同種の*S. thermophilus*を含む）に比べて最もGSH含量が高かった。さらに、本菌株のGSH含量は対数増殖期後期の菌体で最も高く、GSH含量と活性との間には有意な正の相関が認められた。

【結論】*S. thermophilus* YIT 2001の高いLDL酸化抑制活性にはGSHが寄与していることが示唆された。

１）伊藤ら、第29回日本フリーラジカル学会学術集会　日本過酸化脂質フリーラジカル学会第31回大会　合同学会（2007）

low-density lipoprotein, glutathione, lactic acid bacteria

講演番号：2J13p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ J校舎13会場

タイトル　ガーリック由来香気成分diallyl trisulfideの白血病細胞における分子標的の解明
Title　Identification of molecular target of diallyl trisulfide in leukemia cell.

○須田 峻[1]、木村 広慈[1]、細野 崇[1,2]、細野（深尾）友美[3]、荻原 淳[2]、有賀 豊彦[1,2]、関 泰一郎[1,2]
([1]日大院･生資科･応生科、[2]日大･生資科･生命化、[3]お茶大･生環セ)
○Shun Suda[1], Koji Kimura[1], Takashi Hosono[1,2], Tomomi Hosono-Fukao[3], Jun Ogihara[2], Toyohiko Ariga[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon University Graduate School, [2]Nihon University, [3]Ochanomizu University)

【目的】Diallyl trisulfide (DATS)はガーリックを破砕したときに生じる香気成分の一つである。我々は、DATSがヒト大腸がん細胞に対して細胞骨格タンパク質であるβ-tubulinのシステイン残基のチオール基を酸化的に*S*-allyl修飾することにより、細胞周期をG_2/M期で停止させて、アポトーシスを誘導することを報告してきた。さらにDATSは薬物代謝機構に作用し、第2相解毒酵素を誘導する一方、第1相解毒酵素を阻害することを明らかにしている。これらのことからDATSはtubulinだけでなく、いくつかのタンパク質のシステイン残基を標的とし、酸化修飾することで様々な機能を発現することが考えられた。そこで本研究では、白血病細胞におけるtubulin以外のDATSの標的タンパク質を明らかにするために、システイン残基の変化を検出することが可能なredox 2D-PAGEを用いて網羅的に解析した。
【方法】ヒト単球性白血病細胞株U937を 2×10^5cells/mLで播種し、10%FBS含有RPMI1640培地中で24時間前培養した。終濃度20 μMのDATSを添加して10分後に細胞を回収した。細胞タンパク質を抽出し、redox 2D-PAGEに供した。すなわち、一次元目を非還元状態で泳動し、二次元目を還元状態で泳動した。ゲルを蛍光染色し、特定のスポットを含むゲルを切り出した。トリプシン消化後、LC-MS/MSによる解析を行った。
【結果・考察】Controlと比較して、DATS処理により特異的に出現するスポットが複数検出された。これらのスポットは対角線よりも下に現れたことから、分子間ジスルフィド結合を形成するタンパク質であることが示唆された。約27 kDaのタンパク質についてLC-MS/MSを用いて解析したところ、heat shock protein 27 (Hsp27)と同定された。現在、U937細胞におけるHsp27の機能解析とともに、その他のタンパク質について解析中である。
【結語】DATSにより分子間ジルスルフィド結合を形成するタンパク質が複数存在すること、Hsp27はDATSの分子標的の１つであることが明らかとなった。

garlic, diallyl trisulfide, leukemia

講演番号：2J13p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ J校舎13会場

Diallyl trisulfideが薬物代謝酵素に及ぼす影響

The effect of diallyl trisulfide on drug metabolism enzyme in mice

○木村 広慈[1]、中濱 佑亮[2]、須田 峻[1]、渡辺 師成[2]、今井 孝俊[2]、細野 崇[1]、細野(深尾) 友美[3]、有賀 豊彦[1]、関 泰一郎[1] ([1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生命化、[3]お茶大生環セ)

○Koji Kimura[1], Yusuke Nakahama[2], Shun Suda[1], Kazunari Watanabe[2], Imai Takatoshi[2], Takashi Hosono[1],Tomomi Hosono-Fukao[3], Toyohiko Ariga[1], Taiichiro Seki[1] ([1]Nihon University Graduate School, [2]Nihon University, [3]Ochanomizu University)

【目的】我々はニンニク由来香気成分であるdiallyl trisulfide (DATS)が第二相薬物代謝酵素を誘導し、四塩化炭素による肝障害を予防することをラットやラット由来培養肝細胞を用いた実験により明らかにした。近年、第二相薬物代謝酵素の誘導にはNF-E2-related factor 2 (Nrf2)が関与していることが報告されている。そこで本研究では、DATSによる第二相薬物代謝酵素の誘導機構を明らかにする目的で、Nrf2欠損マウスを用いて検討した。またNrf2欠損マウスの実験に先立ち、マウスの第二相薬物代謝系酵素に及ぼす影響について基礎的な検討を行なった。

【方法】実験1；DATSの投与濃度を検討する目的で、野生型マウス(7週齢雄性)を一週間予備飼育後、DATS(0, 50, 100, 250, 500 μmol/kg body weight/day)を5日間経口投与した。対照群には、DATSの溶解に使用した大豆油を投与した。最終投与後、16時間絶食し臓器を回収した。肝臓の細胞質画分を超遠心分離を用いた方法により調製し、各種第二相酵素に特異的な基質を用いて酵素活性を測定した。

実験2；DATSの誘導メカニズムを明らかにする目的で、野生型マウスとNrf2欠損マウス(9～11週齢雄性)にDATS(100 μmol/kg body weight/day)を投与し、実験1と同じ方法により各種酵素活性を測定した。

【結果】実験1；DATS投与がマウス肝臓の第二相薬物代謝酵素NQO1, GSTに及ぼす影響について検討した。NQO1活性は、DATS投与濃度依存的に上昇し、対照群と比較し100 μmol/kg body weight/day投与で1.5倍、250 μmol/kg body weight/day投与で1.8倍上昇した。GST-μ活性は、100 μmol/kg body weight/day のDATS投与により上昇する傾向を示した。これらの成績からNrf2欠損マウスに対するDATSの投与量を100 μmol/kg body weight/dayに設定した。

実験2； 100 μmol/kg body weight/dayのDATSを5日間経口投与した結果、NQO1とGSTの活性は野生型マウスで有意に上昇した。一方Nrf2欠損マウスでは、DATSによるNQO1とGST活性は変化しなかった。これらの結果から、DATSがNrf2の活性化を介してNQO1とGST活性を上昇させることが強く示唆された。

【結語】DATSはNrf2の活性化を介して第二相薬物代謝酵素を誘導することが明らかになった。

DATS, Nrf2, GST

講演番号：2J13p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ J校舎13会場

大豆サポゲノールによるNrf2-ARE経路の活性化作用

Activation of Nrf2-ARE pathway by soyasapogenol

○片山 茂、久志本 尚子、中村 宗一郎（信州大・農）
○Shigeru Katayama, Syouko Kushimoto, Soichiro Nakamura（Faculty of Agric., Shinshu Univ.）

【目的】老化にともなって引き起こされる正常細胞の機能低下は，酸化ストレスによる細胞障害が深く関与している。それゆえ，生体の抗酸化防御機構を高いレベルで維持することが健康維持・老化防止に重要と考えられる。生体内には種々の抗酸化酵素や抗酸化物質が存在し，これらのレドックス制御系によって酸化ストレスによる細胞障害を抑制している。その機構の一つとして，抗酸化酵素系遺伝子群の転写調節を担うNrf2-ARE経路が挙げられる。これまでに我々は，大豆サポニン粗画分の酸化ストレス軽減効果を明らかにしてきた。そこで本研究では，大豆サポニンおよびそのアグリコンである大豆サポゲノールのNrf2活性化作用について，ヒト培養肝細胞HepG2を用いて検討した。
【方法】供試試料として，グループAサポニン，グループBサポニン，ソヤサポゲノールA，ソヤサポゲノールBを使用した。ヒト肝細胞モデルとして，ヒト肝臓癌由来細胞株HepG2を用いた。HepG2 細胞は10%FBSを含むD-MEM/F-12培地で前培養を行った後，これらの供試試料をHepG2に添加し，20時間培養した。続いて，total RNAを抽出し，Nrf2-ARE経路制御下の抗酸化酵素群（Mn SOD，Cu/Zn SOD，NQO-1，GSH synthetase，GCLc，GCLm，HO-1）のmRNA発現量をリアルタイムPCR法で測定した。Nrf2活性化については，核内におけるNrf2タンパク質の発現量をウエスタンブロット法により測定することで評価した。
【結果】リアルタイムPCRにて抗酸化酵素遺伝子のmRNA発現を測定したところ，すべての供試試料において，活性酸素消去酵素であるMn SOD，Cu/Zn SODや異物代謝酵素であるNQO-1とともに，抗酸化物質グルタチオン（GSH）合成を促進するGSH合成酵素群（GSH synthetase，GCLc，GCLm）の発現上昇が認められた。供試試料のなかでは，サポゲノールBの作用が最も顕著であった。しかしながら，Nrf2の代表的な標的遺伝子であるHO-1については，いずれの試料においても著しい発現上昇は認められなかった。一方，転写因子Nrf2の活性化作用は，サポニンよりもサポゲノールが高く，なかでもサポゲノールBで強い作用が認められた。以上の結果から，大豆サポニンについては，そのアグリコンであるサポゲノールにNrf2活性化作用を有することが明らかとなった。また，サポゲノールBはサポゲノールAのC21位に水酸基を含まない構造を有することから，この水酸基の有無がNrf2活性化に大きく寄与することが示唆された。

Nrf2, sapogenol, HepG2

講演番号：2J13p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ J校舎13会場

酸化ストレスマーカー8-OHdG の生成に対する黒大豆種皮抽出物の阻害効果

Inhibition effect of black soybean seed coat extract on 8-OHdG production as a DNA damage biomarker

○張　天順、保田倫子[1]、中村俊之[1]、芦田　均（神戸大院・農、神戸大・自然科学）
○Tianshun Zhang, Michiko Yasuda[1], Toshiyuki Nakamura[1] and Hitoshi Ashida (Graduate School of Agriculture Science, Kobe University, [1]Organization of Advanced Science and Technology, Kobe University)

【目的】8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)は、DNA の構成成分である deoxyguanosine が酸化ストレスにより生成し、様々な疾病の発症や老化に関与することが知られている。黒大豆種皮抽出物(BE)は、anthocyanin や procyanidin などの polyphenol が多く含まれており、多様な機能性が期待されている。我々は、これまでの研究により、BE に含まれる cyanidin-3-glucoside (C3G)と procyanidins が benzo(α)pyrene [B(α)P]および 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)に対して抗変異原性を示すことを見出した。本研究では、2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)により誘導された 8-OHdG の LC/MS/MS による測定方法を確立し、BE およびそれに含まれる polyphenol による 8-OHdG 生成の阻害効果を検討した。
【方法】BE、C3G 除去 BE (BE-C3G)および BE に含まれる polyphenol (catechin、epicatechin、C3G、 procyanidins)をヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞に短時間(1 h)と長時間(36 h)作用させた後、核を回収した。これに AAPH を 3 時間作用させ、DNA を抽出・精製した。LC/MS/MS 分析により、8-OHdG および 8-mercaptoguanosine (内部標準)の分析条件を確立した。確立した方法を用いて、BE および各 polyphenol が DNA 中の 8-OHdG 生成に及ぼす効果を調べた。
【結果】BE の polyphenol を短時間作用させた場合、procyanidin の dimer と trimer、catechin および epicatechin は 8-OHdG の生成を阻害したが、C3G は阻害しなかった。さらに、長時間作用させた場合、procyanidin の tetramer にも阻害効果が見られた。これらの結果から、BE に含まれる procyanidin 類, catechin および epicatechin が AAPH による 8-OHdG の生成阻害に有効であることが判った。

procyanidin, 8-OHdG, LC/MS/MS

講演番号：2J13p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ J校舎13会場

開発したウニ魚醤の抗酸化性と香りの特性

Antioxidant and fragrant characteristics of sea urchin gonad sauce by using ORAC and GC/MS methods

○原田 和樹、宮崎 泰幸、和田 律子、前田 俊道、島田 和子[1]、松井 健二[2]（水大校・食科、[1]山口県大・看護栄養、[2]山口大・院・医学系）

○Kazuki Harada, Taiko Miyasaki, Ritsuko Wada, Toshimichi Maeda, Kazuko Shimada[1], Kenji Matsui[2] (National Fisheries Univ., [1]Yamaguchi Prefectural Univ., [2]Yamaguchi Univ.)

【目的】本大会などにて、既に、我々が開発して商品化された、フグから作った「ふく魚醤」、クジラから作った発酵調味料の「くじら醤油」が持つ抗酸化性[1)]や、次世代食品機能性評価法出調べた抗炎症作用[2)]について報告してきた。今回は、ウニの生殖巣を発酵させた「うに魚醤」について、抗酸化性や、香りの特性、嗜好性について報告する。

【方法】試料は、既に商品化された市販品の「うに魚醤」、対照試料には、大豆こいくち醤油やナンプラーの市販品を用いた。抗酸化性は、米国農務省（USDA）が世界標準抗酸化能測定法として提唱しているORAC（Oxygen Radical Absorbance Capacity）法を用いて調べ、ペルオキシラジカル消去活性で評価した。香りの成分分析はGC/MSで行い、条件は、固相（DVD/CAR/PDMS）マイクロ抽出（SPME）法を用いた。GC/MS装置はPerkinElmer社製のTurbo Massを用い、J & W Scientific社製のDB-5MSカラムを用い、スプリットレス、n=3で測定を行い、得られた結果は、NIST、NBS、WILEYのベータベースで物質同定を行い、香りの特性は米国コーネル大学の「Flavonet and human odor space」データベースで調べた。官能検査は、下関市立水族館「海響館」の来館者に対して行った。1,519名の来館者に対して、風味のブラインド嗜好順位法の官能検査を行い、有効アンケート数956枚（10才以上）について調べた。

【結果】抗酸化性の結果であるORAC値は、大豆こいくち醤油では、5,116 μmolトロロックス等量（TE）/100gであったのに対し、うに魚醤では、6,336トロロックスTE/100gという高い抗酸化性を示した。一方、GC/MS分析結果では、未同定成分も含めて156成分が検出できた。共通成分として、ethanolやacetic acid ethyl ester、3-methyl-1-butanolなどがあり、大豆こいくち醤油と異なる成分としては、2,3-butanediolや3-methylthio-propanalなどの果実・ナッツ系の香りと、弱いながらフラン系化合物の2-furanmethanolや、2-methyl butanal、3-methyl butanalなどによる香ばしさが加わった香りを呈していると考えた。また、うに魚醤には、ナンプラーに特徴的に存在するbutanoic acidは検出されなかった。香りの評価は、スニッフィングテストでも確認した。官能検査の結果は、順位和法で示し、嗜好性の順は、くじら醤油＞うに魚醤＞ふく魚醤＞ナンプラーであり、それぞれどの関係にあっても、$p < 0.01$の関係が成り立った。

1) K. Harada, T. Maeda, Y. Hasegawa, T. Tokunaga, Y. Tamura and T. Koizumi: Mol. Med. Rep., **3**, 663-668, 2010.
2) K. Harada, K. Kazumura, T. Maeda, T. Miyasaki, R. Wada, K. Shimada and K. Matsui: Oral Presentation Abstracts of 5th International Conference on Food Factors (ICoFF2011), 86, 2011.

sea urchin gonad, fish sauce, GC/MS analysis

講演番号：2J13p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ J校舎13会場

チャガに含まれるsyringic acidの細胞過酸化水素感受性増感作用

Sensitization of hydrogen peroxide toxicity by syringic acid

○布施　佑樹、中島　裕希、西田　浩志、小西　徹也（新薬大・応用生命）
○Fuse Yuuki, Nkajima Yuki, Nishida Hiroshi, Konishi Tetsuya (NUPALS)

【目的】チャガ（*Inonotus Obliquus*）は、寒冷地の白樺に寄生している真菌類であり、古くから抗腫瘍作用、抗炎症作用などの薬理作用があるとされ、ロシアでは抗がん剤の原材料としても用いられている。また、チャガには細胞周期の停止を伴ったアポトーシスの誘導を通して、がん細胞の増殖抑制効果が報告されている。当研究室では、チャガのフェノール成分の研究を行っており、これまでに 3,4-dihydroxybenzalacetone にガン細胞増殖抑制効果を確認されている。本研究ではチャガのフェノール化合物の一つである Syringic acid (SA) が、過酸化水素酸化ストレスを与えたがん細胞の細胞死を増強することを見出したので、その機構を細胞周期チェックポイントおよびアポトーシス経路を中心に検討した。
【方法】細胞生存率は、96 穴プレートに 1×10^4 Cells / dish になるように細胞を撒いたのち、SA 及び過酸化水素を添加し、48 時間培養後 MTT 法により測定した。細胞内 ROS の変化、細胞周期分布、DNA 合成阻害及び細胞死への影響は、それぞれ DCFH-DA 蛍光染色、Propidium Iodide(PI)染色、BrdU 蛍光染色、PI/Annexin V 二重染色を行いフローサイトメーターを用いて解析した。細胞内シグナルへの影響は、ウエスタンブロット法を用いて解析した。
【結果・考察】SA 自身は PA-1 細胞に対して細胞致死効果を示さなかったが、過酸化水素と併用することで、過酸化水素による細胞致死を増感した。フローサイトメトリーにより SA の作用を解析したところ、致死細胞の割合に変化は見られなかったがアポトーシス細胞の割合は減少していた。細胞内シグナル伝達分子に対する影響を観察したところ、過酸化水素により活性化されるストレスキナーゼ JNK が SA 処理により抑制され、さらに Cleaved Caspase-3 の発現も減少することが示された。これらのことから、SA による細胞致死増感作用はアポトーシス以外の経路によるものであることが示唆された。さらに、細胞増殖挙動について過酸化水素と SA の効果を調べたところ、過酸化水素単独処理と比較して SA/過酸化水素併用処理では細胞増殖の遅延が起こることが分かった。細胞周期を FACS で解析すると、SA は S 期阻害を増強することが分かった。また、それに応じて Sub-G1 の割合の増加が観察された。S 期阻害の増強が見られたので DNA 合成を BrdU の取り込みで観察したところ、SA/過酸化水素併用処理した細胞でより DNA の合成が阻害されていた。チェックポイント分子群への影響を調べた結果、G1/S 期チェックポイントである p53、intra-S 期チェックポイントである SMC1 のリン酸化が増強されており、G2/M 期チェックポイントである Chk1 のリン酸化は抑制されていた。これらのことから、この細胞致死増感作用には、DNA 合成阻害が関係していることが示唆されたが、今後その機構についてさらに詳細な解析が必要である。

Keyword1 syringic acid, Keyword2 Sensitization H2O2, Keyword3 chaga

講演番号：2J13p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ J校舎13会場

食品由来ペプチドのin vitro系および食品モデル系での抗酸化活性

Antioxidant activity of food-derived peptides in vitro and in food screening models

○朴 恩榮、山田　聡子、中村 考志、佐藤 健司（京府大院・生環）
○EunYoung Park, Satoko Yamada, Yasushi Nakamura, Kenji Sato
(Kyoto Prefectural University・Graduate School of Life and Environmental Sciences)

【目的】食品タンパク質酵素分解物には抗酸化能があることが知られているが、単離された抗酸化ペプチドを食品に添加することはコスト等の面で困難である。そのため食品や生体に投与可能なペプチド分画物の抗酸化機能については報告例が少ない。また、in vitroで高い抗酸化活性を持つペプチドを食品に添加した場合、in vitroでの結果とは必ずしも一致しない場合がみられる。そこで本研究では、自己等電点電気泳動（Autofocusing)装置により植物、動物、水産物由来ペプチドを分画し、分画物の試験管内での抗酸化活性と、食品への添加における抗酸化活性を評価、比較することを目的とした。
【方法】小麦グルテン・大豆・カゼイン・鮭ペプチドを合成アンフォラインを用いない等電点電気泳動(Autofocusing)で分画し、各分画物のin vitroでの抗酸化活性をラジカル消去能（OH、DPPHラジカル)、金属キレート能、ORAC法を用いて検討した。また、豚挽肉に各分画物を添加後、加熱調理し、冷蔵保存した。保存期間中の脂質の酸化程度を過酸化脂質分解物であるマロンジアルデヒドの濃度を測定することにより食肉中での抗酸化活性を評価した。
【結果】各画分の食肉中での抗酸化活性は、大豆ペプチドのDPPHラジカル消去活性、小麦グルテンペプチドのOHラジカル消去活性との間で相関傾向が認められた。しかし、すべてのペプチド画分で比較した場合、in vitroでの抗酸化活性は食肉中での抗酸化活性との相関はほとんどみられなかった。以上の結果より、in vitroでの抗酸化スクリーニングが必ずしも食肉中での抗酸化活性と相関を示さないことが確認された。また、食肉中では複数のメカニズムの相互作用により酸化が抑制されていることが示唆された。

Antioxidant activity, Peptides, Autofocusing

講演番号：2J13p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ J校舎13会場

茶葉のオゾン処理によるポリフェノール類の強化

Polyphenol fortification of tea leaves by exposure to ozone

○渡辺祥子[1]、小川剛史[1,2]、榊原啓之[1]、下位香代子[1]、小林栄人[3]、中村順行[3]、吉川(小林)知子[4]、小林裕和[1]（[1]静県大院・生活健康、[2]しずおか産業創造機構、[3]静岡県立農林技術研究所茶業研究センター、[4]ケーイーコーポレーション）

○Shoko Watanabe[1], Takeshi Ogawa[1,2], Hiroyuki Sakakibara[1], Kayoko Shimoi[1], Eiji Kobayashi[3], Yoriyuki Nakamura[3], Tomoko Kobayashi-Kikkawa[4], Hirokazu Kobayashi[1] ([1]Grad. Sch. Envir. Sci., Univ. Shizuoka; [2]Food Sci. Center, Shizuoka Org. Creation Industries; [3]Tea Res. Center, Shizuoka Pref. Research Inst. Agr. For.; [4]K-E Corporation)

【背景】静岡県は茶葉生産量日本一を誇り、煎茶として品質が良い品種ヤブキタがその9割を占める。しかし近年、抗アレルギー効果が期待されるベニフウキ、脂肪吸収抑制効果があるプーアル茶など、付加価値を持つ茶の需要が高まっている。そのため、静岡県でも競争力のある茶葉の生産が求められている。植物は自らの意思で移動できないため、環境ストレスから自己を護る機能を発達させている。環境ストレスに曝されると、遺伝子を発現し、代謝物質の調節を行う。したがって、酸化ストレスに対して、植物体内では抗酸化物質が産生・蓄積されるのではないかと考えられる。茶葉はEGCgなどのカテキン類、ルチンなどのフラボノール類など、抗酸化成分に富む。これら成分を酸化ストレスにより更に増大させ、付加価値を持つ茶葉の作製を目指した。酸化ストレスとしては、フッ素に次いで酸化力が強く、安価で容易に生産可能で、残留毒性のないオゾンに着目した。

【方法】摘み取った生茶葉を一定時間オゾン（0.4 ppm）に曝露させ、電子レンジで1分加熱し、酵素を失活させた後、直ちに液体窒素下で粉砕した。0.5%酢酸付加水メタノールで3回抽出後、濃縮遠心を行い、0.5%酢酸付加メタノールで抽出・ろ過し、UPLC-TOF-MS（Waters）にて、ポリフェノール類を分析した。フラボノール類は、植物体内では安定した配糖体として存在する。配糖体は種類が多く、標品の入手が難しいため、*O*-グリコシドを特異的に切断するβ-グルコシダーゼ処理により糖を外し、アグリコンとしてから抽出後、アグリコン標品を用いて同定・定量した。

【結果】オゾン曝露により、フラボノール類の増加が確認された。6時間オゾン曝露茶葉において、フラボノール類アグリコンであるケンフェロールおよびケルセチン含量が有意に増加した。ケンフェロールおよびケルセチンは強い抗酸化作用を有する。そのため、これら成分の増強の付加価値は高いと考えられる。一方、カテキン類では再現性のあるデータが得られなかった。カテキンは天然にはエピ型として存在するが、熱により非エピ型となる。電子レンジ処理などの加熱によりカテキン類の全量が正しく測定できていない可能性がある。抽出条件や電子レンジ処理時間を検討している。今後、オゾン濃度や曝露時間を検討し、抗酸化成分を更に増加できる条件を特定する。また、増加の確認されたフラボノール類について、モデル植物シロイヌナズナの各種遺伝子欠失系統を用いて増加機構の解明を試みている。

Tea polyphenol, flavonoid, ozone

講演番号：2J13p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ J校舎13会場

カテキンの自動酸化反応による活性酸素種の発生に及ぼす遊離鉄イオンの抑制効果

Suppressive Effect of Free Iron Ion on Reactive Oxygen Species Generation by Autoxidation of Catechin

○井上 司、濱本 勝美、白井 理、加納 健司（京大院農・応用生命）
○Tsukasa Inoue, Katsumi Hamamoto, Osamu Shirai, Kenji Kano (Kyoto University)

【目的】カテキンによる活性酸素種の発生については、否定的なものも含め、不明な点が多い。その原因として、活性酸素種の一つである過酸化水素の検出法が挙げられる。しばしば、ペルオキシダーゼによる過酸化水素の還元に伴い、蛍光基質が酸化され蛍光物質に変換される反応が利用される。しかし、カテキンやビタミンＣ等の還元剤が存在する条件では、共存還元物質と蛍光基質が競合し、実際よりも小さい信号となるか、一切検出されなくなるため、別の特異的検出法を用いなければならない。また、生体内に普遍的に存在する鉄イオンについて考慮していない点も問題である。鉄イオン存在下では、カテキンの自動酸化により発生した過酸化水素が、それに続くフェントン反応によりヒドロキシルラジカルに変換される可能性がある。そのため、活性酸素種の発生を定量するには、過酸化水素濃度だけでなく酸素濃度も同時に追跡しなければならない。加えて、カテキンと鉄イオンが錯形成する点も考慮する必要がある。以上より、本研究では、選択的に過酸化水素を検出できるセンサを構築するとともに、過酸化水素濃度及び酸素濃度、錯形成の面から、鉄イオン存在下でのカテキンによる活性酸素種発生機構を検討した。
【方法】酸素濃度は、市販のクラーク型酸素電極を用い、−600 mVを印加した際の還元電流を測定した。過酸化水素濃度は、市販のクラーク型酸素電極で用いられるPTFE膜を、分子量が100以上の物質を透過しないセルロースエステル膜(MWCO:100)に交換し、600 mVを印加した際の酸化電流を測定した。鉄イオンとカテキンの錯形成は、紫外可視分光光度計を用いて確認した。カテキンのモデル化合物として、エピガロカテキンガレート(EGCg)を用いた。全ての実験系をTris-HCl緩衝液により、pH 8に調整した。
【結果】セルロースエステル膜(MWCO:100)を用いた過酸化水素センサについて検討した結果、EGCgの影響を受けないことを明らかにした。
　次に、鉄イオン存在下でのカテキンによる活性酸素種発生機構について検討した。まず、鉄イオン非存在下では、EGCgの自動酸化を通じて、酸素は定量的に過酸化水素まで還元された。次に、二価鉄イオン存在下では、急激な酸素消費の後、酸素消費及び過酸化水素発生が抑制された。一方で、EGCg非存在下において、二価鉄イオンによる酸素消費が確認されたことから、前述の急激な酸素消費は二価鉄イオンの自動酸化反応によるものと分かった。三価鉄イオン存在下では、急激な酸素消費は見られず、酸素消費及び過酸化水素発生が抑制された。さらに、紫外可視分光法によりEGCgと三価鉄イオンの錯体を確認した。したがって、前述の酸素消費及び過酸化水素発生の抑制は、EGCgと三価鉄イオンの錯形成による遊離のEGCgの減少によるものと示唆された。以上の結果より、EGCgによる活性酸素種の発生が確認され、遊離の鉄イオンによる抑制効果が明らかになった。

catechin, reactive oxygen species, iron ion

講演番号：2J13p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ J校舎13会場

グルコシノレートによるカテキン溶液の褐変化抑制作用

Inhibition of the browning in catechin solutions by glucosinolate

○横山 征也、宇田 靖、橋本 啓（宇都宮大・農）
○Seiya Yokoyama, Yasushi Uda, Kei Hashimoto (Utsunomiya University)

【目的】色は食品の品質において重要な要素を占めているが、非酵素的な褐変化が問題となる場合も多い。例えば、ジュース、ワインなどの飲料においてはカテキンなどのポリフェノール化合物が非酵素的に酸化され着色を引き起こすことがある。共存するアスコルビン酸は、カテキンなどの酸化による褐変化を短期間では抑制することができるが、より長期間では却って促進してしまうことが知られている。これは、アスコルビン酸が分解されデヒドロアスコルビン酸と過酸化水素を生成しカテキンの酸化を促進するためであると考えられている。

これまでに、我々はアブラナ科野菜に含まれるグルコシノレートが、アスコルビン酸の加熱による分解を抑制することを報告している。そこで本研究では、代表的なグルコシノレートであるシニグリンがカテキンやアスコルビン酸の酸化、それにともなう褐変化に及ぼす影響を検討した。

【方法】シニグリン、(+)-カテキン、アスコルビン酸はそれぞれ0.5 mg/mLとなるように精製水に溶解し、試験に用いる混合溶液を調製した。試験溶液は1.2 mLずつネジ蓋付き試験管に採り密栓し、4℃、30℃、45℃暗所条件下所定の期間インキュベーションした。

残存アスコルビン酸量およびシニグリン量は、C30-UG-5を用いたHPLCにより定量した。溶離液にはメタノールと50 mM リン酸（pH3.0）の混液を用いた。検出波長はそれぞれ265 nm、225 nmとし、ピーク面積を標品と比較することにより定量した。

また、反応液は分光光度計によりスペクトルを測定し、カテキンの残存量や褐変化の度合いを評価した。

【結果】45℃、2週間インキュベーションしたカテキン溶液は428 nmにおける吸光度が約0.5となった。アスコルビン酸共存下では吸光度は0.6程度に上昇した。カテキンの残存率もそれぞれ、約6割と約2割であったことから、アスコルビン酸によりカテキンの酸化が促進され褐変化が進んだたものと考えられた。一方、カテキンとシニグリンを含む溶液では吸光度は約0.2に抑えられ、約8割のカテキンが残存していた。同様に、カテキン、アスコルビン酸およびシニグリンを含む溶液でもアスコルビン酸によるカテキン残存率の低下と褐変化がいずれも抑制されていた。

アスコルビン酸は1週間インキュベーションすることにより4℃においても約6割にまで減少し、30℃、45℃ではほとんど消失してしまうが、シニグリン共存下ではそれぞれ約9割、7割、4割のアスコルビン酸が残存していた。

以上の結果から、シニグリンはカテキンの非酵素的な褐変化を抑制することが見出された。また、アスコルビン酸により促進されたカテキン褐変化も抑制したが、これはシニグリンによるアスコルビン酸の安定化が寄与しているものと考えられた。

sinigrin, catechin, browning

講演番号：2J13p17
講演日時、会場：3月23日17:15～ J校舎13会場

フラボノイドの抗糖尿病効果とメタボローム解析

○五十嵐喜治[1]、倉兼静江[1]、臧　延青[1]、及川　彰[2]、曽我　朋義[3]
（[1]山形大農，[2]理研 PSC、[3]慶応先端生命研）

【目的】フラボイドの抗糖尿病効果については多くの報告があるが、効果と化学構造との関連について詳細に検討されている例は少ない。本研究ではとくに、ケンペロール、ケルセチンとその配糖体に注目し、それらの抗糖尿病効果について各種糖尿病マーカーの応答性から、検討するとともに、メタボローム解析による代謝産物の応答性からも検討し、メタボローム解析による食品素材成分の機能解明の可能性について検討した。
【方法】ケンペロール、ケルセチンとその配糖体を食事成分として、2型糖尿病マウス、KK-A^yに4週間投与し、期間中、空腹時血糖、耐糖能などの測定を行なうとともに、投与最終日には12時間絶食後、採血、肝臓などの採取を行ない、生化学的各種糖尿病マーカー、サイトカインなどの測定を行なった。また、肝臓についてはCE-MSによる代謝産物の同定・定量を行なった。尚，ネガテイブコントロールとしてはC57/BLマウスを用いた。
【結果】ケンペロール、ケルセチンとその配糖体のいずれも、耐糖能，HbA_{1c} を改善あるいは改善する傾向を示したが，フラボノイド間による効果には明確な差がみられなかった。一方、メタボローム解析ではチアミン、イノシンモノホスフェート、NADH などが糖尿病の改善と対応してよい応答性を示した。

flavonoid, diabetes, metabolome analysis

講演番号：2J13p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ J校舎13会場

組織内微小領域における緑茶カテキンの二次元可視化に向けた質量分析イメージング法の開発

Development of mass spectrometry imaging toward two-dimensional visualization of green tea catechin in tissue micro-regions

○ 萩原 立春[1]，藤村 由紀[2]，金 充喜[1]，行平 大地[1]，山口 歩[1]，三浦 大典[2]，割石 博之[1,2]，山田 耕路[1]，立花 宏文[1,2]（[1]九大院農院・生機科，[2]九大レドックスナビ）

○ Takatoki Hagihara, Yoshinori Fujimura, Yoon Hee Kim, Daichi Yukihira, Ayumi Yamaguchi, Daisuke Miura, Hiroyuki Wariishi, Koji Yamada, Hirofumi Tachibana (Kyushu Univ.)

【目的】多彩な生理作用が報告されている緑茶カテキン epigallocatechin-3-*O*-gallate（EGCG）の詳細なメカニズム解明には EGCG 自身の厳密な組織内空間分布の把握が必要不可欠である。しかしながら、現状では、EGCG などの食品因子の組織内微小領域における空間分布情報は明らかにされておらず、これは従来の分子イメージング法には標識化に基づく様々な制約（時間・コスト・特異性などに問題）が存在し、簡便に（非標識で）低分子化合物を可視化する計測技術が確立されていないことに起因している。一方、今日、生体分子の二次元局所変動を非標識で捉える *in situ* 生体分子マッピング法（質量分析イメージング）の開発が新たな分子イメージング法として注目されており、我々も本法を独自に最適化することで一連の組織内微量低分子代謝物の時空間動態の一斉可視化に世界に先駆けて成功している（*Anal. Chem.*, 82, 9786, 2010）。

そこで本研究では、独自の高感度質量分析イメージング法を先鋭化することで、これまで追跡不可能であった EGCG の組織内微小領域における二次元空間情報の可視化を目指し、本法の技術的ボトルネックである微量 EGCG 分子の可視化に必須なイオン化条件の最適化を試みた。

【方法・結果】質量分析における選択性と検出感度を決定づける最大の要因は対象物質のイオン化効率にある。質量分析イメージングで最も汎用されるイオン化法はマトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）法であり、マトリックスと呼ばれる物質のイオン化を促進する化合物が実際には標的物質のイオン化の有無を決定づけている。そのため、EGCG の最適なイオン化効率を引き出すマトリックスの創出が必要不可欠であるが、現状では EGCG を含めた微量低分子化合物をイオン化できる有用なマトリックス情報はほとんど無い。そこで、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), sinapic acid (SA), 9-aminoacridine (9-AA) など最も汎用されているマトリックスを含む 40 種類以上の化合物を用いて、EGCG を検出可能なマトリックスの探索を行った。EGCG 標品とマトリックスの混合物を MALDI-TOF-MS （AXIMA Performance, SHIMADZU）で測定した結果、汎用されているマトリックス（DHB、CHCA、SA、9-AA）では検出困難であったが、β-carboline 化合物や CHCA 構造類似物ならびに naphthalene 誘導体が EGCG に対する高い検出能（pmol オーダー）を示した。さらに、これら候補マトリックスを用いることで組織上（肝臓の凍結薄切片）における EGCG の二次元可視化にも成功した。

EGCG, mass spectrometry imaging, matrix

講演番号：2J13p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ J校舎13会場

炊飯米を添加した熱水抽出緑茶飲用後の血中エピガロカテキンの増加

Increased Plasma Concentration of Epigallocatechin after Orally Administering a Green Tea (*Camellia sinensis* L.) Extract supplement by Steamed Rice

○物部 真奈美、江間 かおり、徳田 佳子、山本（前田） 万里（農研機構・野茶研）
○Manami Monobe, Kaori Ema, Yoshiko Tokuda, Mari Maeda-Yamamoto (NARO Institute of Vegetable and Tea Science)

【目的】緑茶は様々な健康効果を有する機能性食品として注目されており，代表的な機能性成分としてカテキン類がよく知られている。緑茶の摂取方法の多くは嗜好飲料としてそのまま飲用する方法であるが，食文化の１つとして「お茶漬け」のようにご飯に緑茶をかけて食べるという食形態がある。そこで，「お茶漬け」として緑茶を摂取した場合の緑茶カテキンの血中濃度の変化を調べた。
【方法】緑茶葉 3 gあたり100 mLの熱水で抽出した緑茶にアスコルビン酸（0.25 mg/mL）またはアルファ米（5%w/v）を添加したものを空腹時にマウス（ICR; メス ; 6週令）へ1 mL，被験者へ200 mL経口投与した。摂取前と摂取後，経時的に採血し，血中のカテキン類を酢酸エチルで抽出後，エピガロカテキン（EGC），エピカテキン，エピガロカテキンガレート（EGCg），エピカテキンガレートをHPLCで測定した。
【結果】マウスを用いた試験では，アスコルビン酸添加の有無による血中総カテキンおよび各種カテキンの血中濃度に違いは認められなかったが，炊飯米を添加した緑茶摂取群において無添加の緑茶摂取群に比べて血中総カテキン量が増加した。また、炊飯米を添加することにより，ノンガレート型カテキン（特にEGC）の血中濃度が有意に増加し，一方，ガレート型カテキンの血中濃度は減少することがわかった。そこで，予備試験として同様の試験を3名の被験者で実施した結果，炊飯米添加の有無による血中総カテキン量の変化は認められなかったが，ノンガレート型カテキン（特にEGC）とガレート型カテキン（特にEGCg）の血中濃度がマウスと同様に変化した。

Green tea catechin, Steamed rice, Plasma concentration

講演番号:2J13p20
講演日時、会場:3月23日17:48～ J校舎13会場

フラボノイド類によるオートファジー誘導機構の解析

Molecular mechanism of induction of autophagy by flavonoids

石原 朋恵[1]、寺尾 純二[1]、柴田 貴広、内田 浩二、○河合 慶親（名大院生命農・応用分子生命科、[1]徳島大院ヘルスバイオサイエンス）

Tomoe Ishihara[1], Junji Terao[1], Takahiro Shibata, Koji Uchida, ○Yoshichika Kawai (Nagoya Univ., [1]Univ. of Tokushima)

【目的】オートファジーはユビキチンプロテアソーム系に並ぶ主要な細胞内分解経路であり、真核生物のすべての細胞に供えられている。オートファジーでは、オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造内にタンパク質やオルガネラが取り込まれ、最終的にリソソームとの融合によってバルク分解される。オートファジーの役割として、栄養飢餓時に応答し非選択的にタンパク質を分解することで、アミノ酸の再供給に重要であることが古くから知られていたが、障害を受けたタンパク質やオルガネラを選択的に分解することで細胞内恒常性維持に寄与していることが近年明らかとなってきた。特にオートファジー関連遺伝子に対するノックアウトマウスの樹立・解析から、オートファジー機能の欠損が神経変性疾患やがん、糖尿病など広範囲の疾患の発症に関与することが強く示唆されている。本研究では、食品成分の新たな機能性としてのオートファジー誘導に着目し、有効成分の探索及び作用機構の解析を目的とした。
【方法】HeLa細胞（ヒト子宮頸癌由来上皮細胞）に様々なポリフェノールや食品成分を添加し培養後、オートファジー分解の指標となるp62をウェスタンブロットにて検出した。オートファジー機構の解析についてはPI3K/Akt/mTOR経路を中心にウェスタンブロットにより評価した。細胞内へのポリフェノールの蓄積については、細胞抽出液をHPLC分析することで検出・定量を試みた。
【結果】様々なポリフェノールや食品成分の中でもフラボノイド類においてp62の顕著な減少が認められた。中でもシソなどに多く含まれるルテオリンが最も顕著な作用を示した。カテキン類やイソフラボンなどその他のポリフェノールにおいては、本条件では有意な効果は認められなかった。オートファジーの実行に必須な遺伝子の一つであるAtg5欠損MEF細胞においてはルテオリンによるp62の減少は認められなかったことから、ルテオリンによるp62の減少はオートファジーの促進に由来するものと示唆された。ルテオリン処理によってオートファジーの負の制御因子であるmTORのリン酸化およびmTOR-Raptor複合体形成が阻害された。さらに、ルテオリンはmTOR上流のAktリン酸化を顕著に阻害した。また、HPLC分析よりルテオリンは細胞内に取り込まれることが確認されたが、一方で水溶性の高いルテオリン配糖体では細胞内への取り込みはほとんど見られず、オートファジー誘導作用も認められなかった。以上の結果より、ルテオリンは細胞内へ取り込まれ、mTOR経路を負に制御することによりオートファジーを誘導する食品因子であることが示された。

polyphenol, flavonoid, autophagy

講演番号：2J14a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ J校舎14会場

ヤクのミルクオリゴ糖の構造解析

Structural characterization of the oligosaccharides in Yak colostrum and milk

○TAUFIK Epi、Dahal Narapati[1]、Khuukhenbaatar Ganzorig[2]、福田 健二、浦島 匡
(帯畜大、[1]NCAH-Bhutan、[2]SCVL-Mongolia)
○Epi TAUFIK, Narapati Dahal[1], Ganzorig Khuukhenbaatar[2], Kenji Fukuda, Tadasu Urashima
(OUAVM, [1]NCAH-Bhutan, [2]SCVL-Mongolia)

The present study was carried out to characterize the oligosaccharides in Yak colostrum and milk samples, in order to clarify the array of oligosaccharides structures in the colostrum and milk of Bovidae family. Milk oligosaccharides were separated from the colostrum/milk by chloroform/metanol extraction and each of them were purified by gel filtration with BioGel P-2 extra fine, ion exchange chromatography and HPLC. Each oligosaccharide structure was characterized by ^{1}H-NMR. The identified chemical structures of the neutral oligosaccharides from the samples were as follows: isoglobotriose, beta 3'-GL, beta 6'-GL and beta 3'-GalNAcL. Whereas the study for the acidic oligosaccharides is still ongoing.

Yak, Milk oligosaccharides, Bovidae family

講演番号：2J14a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ J校舎14会場

ヘキソースの加熱処理により合成した新規異性体蔗糖の構造解析

Structural analysis of novel sucrose-isomer synthesized by thermal treatment of hexose.

○山森　昭、福士　江里[1]、岡田　秀紀、川添　直樹、上野　敬司[2]、小野寺　秀一[2]、川端　潤[1]、塩見　徳夫[2] (大高酵素 (株)・総合研、[1]北大院農、[2]酪農大院・食品栄養科学)

○Akira Yamamori, Eri Fukushi[1], Hideki Okada, Naoki Kawazoe, Keiji Ueno[2], Shuichi Onodera[2], Jun Kawabata[1], Norio Shiomi[2] (General Institute of Ohtakakohso Co., Ltd, [1]Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, [2]Department of Food and Nutrition Sciences, Graduate School of Dairy Science Research, Rakuno Gakuen University)

【目的】我々は、植物エキス発酵飲料から単離したβ-D-fructopyranosyl- (2→6)-D-glucopyranose (β-F*p*2-6G)やα-D-fructofuranosyl- (2→6)-D-glucopyranose (α-F*f*2-6G)の大量合成のための初段階実験として、ヘキソースの加熱によるオリゴ糖の合成について検討し、β-F*p*2-6G やα-F*f*2-6G を含む数種類のオリゴ糖を合成した[1, 2)]。 さらに、これらオリゴ糖の諸性質についても随時報告している。今回は、同方法により新規異性体蔗糖を合成しその構造解析を行ったので報告する。

【方法】既報の方法[2)]に従って、D-グルコースおよびD-フルクトースを粉末の状態で加熱する事によりいくつかのオリゴ糖を合成した。加熱により水飴状になった反応生成物に水を加えて溶解させ糖溶液とし、活性炭セライトカラムクロマトグラフィー(φ4.8×36cm)に供し水溶出画分を回収した。この画分について濃縮後、ODS カラム (ODS-100V, 20×250mm および 4.6×250mm×3本)クロマトグラフィーを行うことにより未同定のオリゴ糖 **1** および **2** を単離した。

【結果】オリゴ糖 **1** および **2** は、酸加水分解によりそれぞれグルコース、フルクトースが 1 モルずつ遊離し、MALDI-TOF MS 分析により m/z=365 の $[M+Na]^+$ピークを与えた。また、ABEE 誘導体化分析により糖 **1** および **2** の誘導体ピークが検出されなかったことから、両糖は非還元性の糖質であることが確かめられた。さらに、二次元 NMR 解析により糖 **1** および **2** は、それぞれβ-D-fructopyranosyl- (2←→1)-β-D-glucopyranoside およびβ-D-fructofuranosyl- (2←→1)-β-D-glucopyranoside と決定した。

1) 山森ら, 日本応用糖質科学会平成 23 年度大会講演要旨集, P 58 (2011, 札幌)
2) A. Yamamori *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **74** (10), 2130-2132, 2010

Sucrose-isomer, Oligosaccharide, Thermal-treatment

講演番号：2J14a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ J校舎14会場

固相抽出法を用いた食品中のサケ鼻軟骨由来プロテオグリカン定量法の開発

Quantitative Determination of Proteoglycan from Salmon Nasal Cartilage in Foods by Solid-Phase Extraction

小泉英誉、永澤桂子、田中真実、岩間直子、○阿部馨（(地独）青森県産技セ・弘前研）
Hideyo Koizumi, Keiko Nagasawa, Makoto Tanaka, Naoko Iwama, ○Kaoru Abe
(Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center)

【目的】プロテオグリカン（PG）は、グリコサミノグリカンとタンパク質が共有結合した高分子であり、結合組織の細胞外マトリックスを形成する主要な分子のひとつである。青森県では、サケ鼻軟骨由来 PG を用いた高機能性食品の開発を進めている。PG の定量にはカルバゾール硫酸法が多く用いられている。しかし、本法は他の多糖類も発色するため、食品分析に適用するためには、PG と他の多糖類を簡便に分離する方法が必要となる。そこで本研究では、固相抽出法を用いた PG の定量法について検討した。
【方法】固相抽出カートリッジは TOYOPAK DEAE M を用いることとした。サケ鼻軟骨由来酢酸抽出 PG の他、デキストリン、ペクチン、ヒアルロン酸等の多糖類について溶出条件を検討した。PG はカルバゾール硫酸法により定量した。
【結果】サケ鼻軟骨由来酢酸抽出 PG は中性条件下で固相に保持され、0.4 M NaCl で溶出された。酸性多糖であるペクチンおよびヒアルロン酸も固相に保持されたが、0.2 M NaCl で溶出され PG との分離が可能であった。デキストリンは固相に保持されなかった。PG の定量性について検討したところ、検量線の直線性は 300 μg までの範囲において良好であった。現在、PG 入り食品への適用について検討している。なお、本研究は文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラムの一環として実施された。

Proteoglycan, Glycosaminoglycan, Solid-phase extraction

講演番号：2J14a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ J校舎14会場

アミノ酸分析計を用いた食品中のサケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの定量法の開発

Quantitative Determination of Proteoglycan from Salmon Nasal Cartilage in foods by an amino acid analyzer

田中真実、小泉英誉、永澤桂子、○岩間直子、阿部馨（（地独）青森県産技セ・弘前研）
Makoto Tanaka, Hideyo Koizumi, Keiko Nagasawa, ○Naoko Iwama, Kaoru Abe
（Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center）

【目的】サケ鼻軟骨由来プロテオグリカン（PG）は、１本のコアタンパク質にコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンが1本～100本以上共有結合した複合多糖であり、細胞外マトリックスの主要な構成成分の一つである。近年、PGの生理機能として抗炎症作用、細胞増殖促進作用、抗肥満、抗糖尿病及びヒアルロン酸合成促進などが明らかにされ、青森県を中心にPG入りのサプリメント、化粧品及び飲料水などの商品が開発、販売されている。一方、PGの定量法として、一般的に糖の呈色法が用いられているが、糖質が多い食品中のPGを分離定量することは困難である。そこで、酢酸抽出PGのコアタンパク質に着目しPGの定量法を開発した。
【方法】はじめに、遠心式限外ろ過膜（分画分子量100,000）を使用しPG含有食品中の遊離アミノ酸及びペプチドを除去した。次に、比較的高分子のペプチド及びタンパク質をC18ミニカラム（Sep-Pak C18 cartridge）で除去した。PGはC18ミニカラムに吸着されなかったことから、スルーした画分をエバポレーターにて乾固し、定沸点塩酸(5.7N)で溶解後、110℃、22時間加水分解した。更に、減圧乾固し、0.02N 塩酸に溶解後、日立高速アミノ酸分析計（L-8800）を用い分析した。試料はPG無添加試料及び添加試料の二つを用い分析し、その差からPG量を求めた。今回用いたPG標品は(株)角弘から譲渡されたものを使用した。
【結果】PGと食品中のペプチド及びタンパク質との分離には、遠心式限外ろ過膜とC18ミニカラムが有効であった。PGの定量には加水分解時に安定なアミノ酸を用い求めた。定量性はアミノ酸量として上限160μg/mlまで直線性が保たれていた。なお、本研究は文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラムの一環として実施された。

Proteoglycan, Glycosaminoglycan, Amino acid analyzer

講演番号：2J14a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ J校舎14会場

食品成分に誘導される細胞表面ヘパラン硫酸糖鎖構造の変化

Structural analysis of heparan sulfate on cell surface induced by polysaccharides

○中野由梨，永見圭太郎，金丸義敬，矢部富雄（岐阜大院・応生科・資源生命）
○Yuri Nakano, Keitaro Nagami, Yoshihiro Kanamaru, Tomio Yabe (Gifu Univ. Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci.)

【研究背景と目的】

ヘパラン硫酸(HS)糖鎖は，プロテオグリカンの糖鎖部分であるグリコサミノグリカン(GAG)の一種である。HS糖鎖はウロン酸とアミノ糖による二糖の繰り返し構造を持ち，硫酸基転移酵素により硫酸化修飾を受け，多様な構造を持つ。

これまでに当研究室では，細胞表面のHS糖鎖が生理活性物質の刺激を受けて構造変化することを報告しており，糖鎖と生理機能の相関関係に注目している。また，レモンペクチンは細胞基底膜に存在するフィブロネクチンと相互作用することを表面プラズモン共鳴（SPR）により見出しており，ペクチンの新しい生理機能を解明する手がかりとなると考えている。よって本研究では，生理作用のモデルとして線維芽細胞に食品を添加した場合の細胞表面HS糖鎖構造変化の解析と，その作用にフィブロネクチンが関与しているかの検証を目的とした。

【方法と結果】

マウス線維芽細胞(L-M細胞)にレモンペクチン，もしくはデンプンを添加した後，プロテオグリカンを回収した。プロテオグリカンよりHS糖鎖のみを精製して二糖単位にまで酵素分解し，アミノプロピルカラムに供して細胞表面上のHS糖鎖構造を解析した。その結果，レモンペクチンを添加した場合は，非硫酸化二糖(0S)が増加し，6位硫酸化二糖(6S)が減少することが示された。また，デンプンを添加した場合は，0Sが増加し，6SおよびN位2位硫酸化二糖(NS,2S)が減少することが示された。このことから，細胞表面のHS糖鎖は食品成分多糖によって構造変化が誘導され，多糖の種類によって硫酸化構造の応答が異なることが示唆された。さらに，抗フィブロネクチン抗体を用いたウェスタンブロットの結果，L-M細胞にフィブロネクチンの存在が確認されたことから，フィブロネクチンをリガンド，デンプンをアナライトとして，SPRを用いてフィブロネクチンとデンプンとの相互作用を現在検討している。

heparin sulfate, polysaccharide, L-M cell

講演番号：2J14a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ J校舎14会場

ペクチンを認識するヒト小腸由来タンパク質の同定

Screening analysis of proteins from small intestine in human for association to pectins

○本田明里，富田恭子[1]，中村綾，金丸義敬[1]，加藤宏治[2]，森雄一郎[3]，山元宏貴[3]，伊神孝生[3]，矢部富雄[1]（岐阜大院応生・資源生命，[1]岐阜大応生・食品生命，[2]修文大，[3]三基商事（株））

○Akari Honda, Kyoko Tomita[1], Aya Nakamura, Yoshihiro Kanamaru[1], Koji Kato[2], Yuichiro Mori[3], Hirotaka Yamamoto[3], Takao Ikami[3], Tomio Yabe[1] (Gifu Univ. Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., [1]Gifu Univ. Fact. of Appl. Biol. Sci., [2]Shubun Univ., [3]MIKI Corp.)

【目的】バラ科に属するプルーン（*Prunus domestica* L. ）は，ペクチンなどの食物繊維を多く含んでおり，機能性食品素材として知られている。近年，食物繊維の摂取により小腸形態や細胞分裂に変化が生じることが明らかとなり，腸管上皮細胞が食物繊維を認識して直接的に相互作用する機構の存在が示唆されている。本研究では，ファージディスプレイ法及び表面プラズモン共鳴（SPR）により，プルーン由来ペクチンと相互作用するタンパク質を同定することを目的とした。

【方法と結果】プルーン乾果の成分を抽出・濃縮したエキスから，ペクチンが主成分であるアルコール不溶性画分（AIS）を得た。AISを固定化したカラムにヒト小腸由来タンパク質を提示するファージを供した後，溶出させ，ペクチンと結合するファージを回収した。ファージが提示したアミノ酸配列を解析したところ、ペクチンと相互作用する可能性のあるタンパク質として，細胞外マトリックスの一つであるフィブロネクチンが示された。

ペクチンとフィブロネクチンとの相互作用を検証するため，SPRを利用した。フィブロネクチンを固定化したセンサーチップにプルーンペクチンをアナライトとして添加することで，センサー表面で起こる特異的相互作用をリアルタイムに測定した。また，プルーンペクチンと構造が異なることがわかっているレモンペクチンと，ペクチンの主成分であるポリガラクツロン酸もそれぞれアナライトとして使用した。その結果，フィブロネクチンはプルーンペクチンと最も強いAffinityを示した。

次に，SPRを用いた競合阻害実験を行った。フィブロネクチン同士の相互作用解析を行ったところ，フィブロネクチン同士の結合力はプルーンペクチンのフィブロネクチンへの結合力よりも弱いことがわかったため，フィブロネクチン同士の結合が，プルーンペクチン，レモンペクチン，ポリガラクツロン酸によって，それぞれ阻害されるか調べた。その結果，プルーンペクチン共存下の条件において，他の多糖よりもフィブロネクチン同士の結合を最も強く阻害することが示された。さらに，フィブロネクチンにおけるペクチンの結合部位を調べたところ，ペクチンはフィブロネクチンやヘパリンが結合する部位とは異なる部分に結合する可能性が示された。

以上の結果から，フィブロネクチンはペクチンを認識するタンパク質である可能性が示唆された。

pectin, phage display, SPR

講演番号：2J14a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ J校舎14会場

抗グリコーゲンモノクローナル抗体における糖特異性の比較解析

Comparative analysis of carbohydrate-binding specificities of anti-glycogen monoclonal antibodies

○信田 衣里[1]、鶴田(中村) 祥子[2]、保田 倫子[2]、中村 俊之[2・3]、古屋敷 隆[4]、角谷 亮[4]、高田 洋樹[4]、芦田 均[5]（[1]神戸大・農、[2]神戸大院・自然科学、[3]徳大院・HBS研究部、[4]江崎グリコ（株）・健康科学研、[5]神戸大院・農）

○Eri Shinoda[1], Sachiko Nakamura-Tsuruta[1], Michiko Yasuda[1], Toshiyuki Nakamura[1・2], Takashi Furuyashiki[3], Ryo Kakutani[3], Hiroki Takata[3], Hitoshi Ashida[1]（[1]Kobe University, [2]Tokushima University, [3]Ezaki Glico Co.）

【目的】グリコーゲンは動物細胞における貯蔵多糖であると同時に、免疫賦活活性を持つことが示唆されており、近年注目を集めている。グリコーゲンの定量や可視化のためには、抗グリコーゲン抗体が有益なツールに成り得るが、その詳細な糖特異性は十分に明らかにされていないと言える。我々はこれまでに、抗グリコーゲン抗体として知られるIV58B6について糖特異性評価を行い、IV58B6が天然グリコーゲン（NSG）に高い結合能を示す一方で、酵素合成グリコーゲン（ESG）に対する親和性が低いことを明らかにした*。そのため、酵素合成グリコーゲン（ESG）を強く認識する抗体の取得を目指し、ESGを抗原としてモノクローナル抗体（ESG1A9mAb）を作製した。本研究では、ESG1A9mAbおよびIV58B6のより詳細な糖特異性を明らかにすると共に比較解析を行うことで、両者が認識するグリコーゲン構造について検討した。

【方法】糖特異性の評価には、ELISAおよび表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いた。ELISAでは各種グリコーゲンをプレートに固定化し、一次抗体としてIV58B6またはESG1A9mAbを、二次抗体としてHRPラベル抗マウスIgM抗体を用いて測定を行った。SPRによる結合定数(K_a)の算出では、IV58B6および ESG1A9mAbをセンサーチップ（CM5）に固定化し、アナライトとして各種グリコーゲンを用いて測定を行った。また、グリコーゲン固定化チップを用いたSPR解析においては、ビオチン化したグリコーゲンを、ストレプトアビジンを介してセンサーチップ（SA）に固定化し、IV58B6およびESG1A9mAbをアナライトとして用いた。

【結果】ELISAおよびSPRによる解析の結果、ESG1A9mAbはすべてのNSGおよびESGを認識することが明らかとなった。IV58B6はNSGに結合したもののESGに対する親和性は非常に低かった。ESGをαアミラーゼ消化したグリコーゲン（RG, HMW_ESG）について検討したところ、IV58B6では酵素消化によって親和性が上昇したのに対し、ESG1A9mAbでは低下することが明らかとなった。ESGと比較してNSGやRG、HMW_ESGはα1,6分岐が分子表面付近に分布していること、およびαアミラーゼによって分子表面の低分岐領域が消化されることを考えると、IV58B6は高分岐領域を認識する一方で、ESG1A9mAbは比較的分岐の少ない領域を認識すると言える。

*JSBBA2011年度大会

glycogen, surface plasomon resonance, monoclonal antibody

講演番号：2J14a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ J校舎14会場

消化吸収を考慮した酵素合成グリコーゲン（ESG）の機能解明

Investigation of enzymatically synthesized glycogen (ESG) function and bioavailability

○保田 倫子[1]、古屋敷 隆[2]，角谷 亮[2]，高田 洋樹[2]，中村 俊之[1,3]，鶴田(中村) 祥子[1]，芦田 均[4]
([1]神戸大・自然科学、[2]江崎グリコ(株)・健康科学研、[3]徳大院・HBS研究部、[4]神戸大院・農)

○ Michiko Yasuda[1], Takashi Furuyashiki[2], Ryo Kakutani[2], Hiroki Takata[2], Toshiyuki Nakamura[1,3], Sachiko Nakamura-Tsuruta[1], Hitoshi Ashida[1] ([1]Kobe University, [2]Ezaki Glico Co., Ltd, [3]Tokushima University.)

【目的】グリコーゲンは動物における貯蔵多糖であり、エネルギー源もしくは炭素源として用いられる。近年、我々は酵素を用いてグリコーゲンを合成し、酵素合成グリコーゲン（ESG）摂取による免疫賦活活性および食物繊維様作用を報告した（R. Kakutani *et al.*, *Carbohydr. Res.* 2007, 342, 2371-9; T. Furuyashiki *et al.*, *Food Funct.* 2011, 2, 183-9; R. Kakutani *et al.*, *Glycobiology. in press*）。ESGは新規の機能性食品素材としてその効果が期待されているが、消化吸収に関する知見は限られている。そこで本研究では、消化吸収を考慮したESGの作用機序の検討を行った。

【方法】小腸上皮様に分化させたCaco-2細胞にESGを作用させ、Apical側とBasolateral側培地中のESGを、多角度光散乱検出器（MALLS）を装備したHPLCゲルろ過法、および抗グリコーゲン抗体を用いた競争ELISA法により分析した。ESG（2 g/kg体重）をICRマウスに投与した後、腸管をはじめとした消化管中の内容物についても同様に定量を行った。また、分化Caco-2細胞とマウスRAW264.7マクロファージを共培養した系においてESGをApical培地側に作用させ、サイトカインmRNA発現量およびNO産生量を調べた。

【結果】ESGが腸管内で半分以下の分子量に分解されること、その分解物は小腸上皮からは吸収されないことが示唆された。共培養系を用いた試験により、ESGがCaco-2細胞におけるサイトカインのmRNA発現を増加させることが明らかとなった。また、ESGおよびその分解物がBasolateral側に吸収されないにも関わらず、RAW264.7マクロファージのiNOS mRNA発現を誘導し、NO産生を増強する傾向が見られた。さらに、自然免疫系の受容体TLR2がRGと結合することが明らかとなった。以上より、消化吸収を考慮した評価系においてもESGが免疫賦活作用を持つ可能性が見出された。これらの作用機序については現在引き続き、詳細を検討中である。

enzymatically synthesized glycogen (ESG), Caco-2 cells, immunostimulation

講演番号：2J14a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ J校舎14会場

フェノール酸へのルチノース鎖の導入による抗ウィルス効果の改善

Improvement of anti-viral activity by addition of rutinose to phenolic compounds

○山内 雄貴、片山 茂、加藤 幸、真壁 秀文、中村 宗一郎（信州大院・農）
○Yuki Yamauchi, Shigeru Katayama, Miyuki Kato, Hidehumi Makebe, Soichiro Nakamura (Shinshu University)

【目的】ノロウィルスやロタウィルスに起因するウィルス性食中毒が世界中で蔓延している。しかし、未だにウィルス性食中毒に対する有効な予防・治療薬は存在しておらず、安全で効果的な治療薬の開発が求められる。これまでの研究で、ある種のフェノール酸や糖類にはウィルスの増殖を抑制する効果があることが明らかにされている。演者らは、先行研究において、ルチンにわずかながらも抗ウィルス効果があり、その効果はルチノースに由来することを明らかにしている。そこで、本研究では、ルチン分解酵素であるルチナーゼの逆反応を利用して、種々のフェノール酸にルチノース鎖を導入することで、より高い抗ウィルス効果を持つ化合物の創製を試みた。
【方法】ルチナーゼはダッタンソバの粉末から調製した。フェノール酸へのルチノース鎖の導入は、供試フェノール酸とルチンとの酢酸バッファー（pH5.0）懸濁液に、ルチナーゼを 15,000 unit 加え、40℃、24 h インキュベーションすることによって行った。新規ルチノシドは Inertsil NH_2 カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより分離精製した。糖鎖の導入は、LC/MS によって確認した。

抗ウィルス性試験は、供試ウィルスにノロウィルスの代替であるネコカリシウィルス（*Feline calicivirus*, FCV）を使用し、ホスト細胞にネコ腎細胞（Crandell-Reese feline kidney, CRFK）を用いて行った。供試ルチノシドとFCVを混合し、1 hインキュベーション後、その混合液をコンフルエント状態のCRFKに曝露した。引き続き、37℃、5%CO_2下で24 h培養した後、試験液を取り除き、これに2%FBS 含有 MEMを加え、3日間培養した。細胞の生存率測定はMTT試験によって行った。
【結果】シナピン酸、カフェ酸、フェルラ酸、およびバニリン酸を供試フェノール酸として4種類のルチノシドの創製に成功した。これらのルチノシドを抗ウィルス性試験に供した結果、いずれのフェノール酸においてルチノース鎖を導入させることで抗ウィルス効果が上昇することを明らかにした。特に、シナピン酸ルチノシドはシナピン酸単体よりも抗ウィルス性効果が13.2%増加する結果となった。これに対して、ケルセチンのルチノシドであるルチンはケルセチンの効果とほぼ同程度であった。以上の結果からルチノース鎖導入による抗ウィルス性の改善効果は骨格とするフェノール酸の構造に依存することが示唆された。

anti-virus, rutinose, phenolic compounds

講演番号：2J14a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ J校舎14会場

大豆から単離・精製したDNA合成酵素阻害活性物質による抗炎症作用

Anti-inflammatory effect of DNA polymerase inhibitors purified from soybean

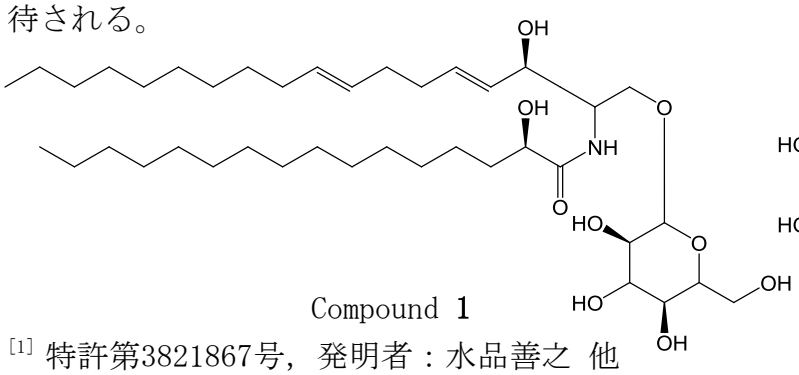
○水品 善之[1,2]、高橋 義洋[3]、竹内 倫文[4]、栗山 磯子[1]、菅原 二三男[4]、吉田 弘美[1,2]（[1]神戸学院大栄養・栄養、[2]神戸学院大・LSC、[3](株)小倉屋柳本・開発研、[4]東理大院理工・応生科）

○Yoshiyuki Mizushina[1,2], Yoshihiro Takahashi[3], Toshifumi Takeuchi[4], Isoko Kuriyama[1], Fumio Sugawara[4], Hiromi Yoshida[1,2]（[1]Kobe-Gakuin Univ., Dept. of Nutr. Sci., [2]Kobe-Gakuin Univ., LSC, [3]Oguraya Yanagimoto, Co. Ltd., [4]Tokyo Univ. of Sci.）

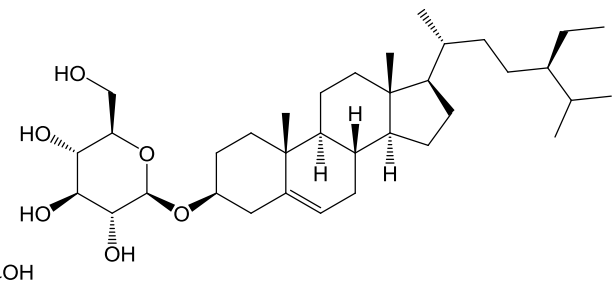
【目的】大豆（*Glycine max* L.）の新規な健康機能性開発を目指して、哺乳類のDNA合成酵素（DNAポリメラーゼ、pol）阻害活性物質を単離・精製し、その化学構造を決定した。そして、見出した活性物質の抗炎症活性を調査した。

【方法】(株)小倉屋柳本（マルヤナギ）の商品「やわらか蒸し大豆」を凍結乾燥した後、有機溶媒抽出物からpol阻害活性を指標にしてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで２つの活性物質を単離・精製した。そして、NMR、MSなどの解析で構造を同定した。哺乳類のpolは精製酵素を準備して、*in vitro*の活性測定を実施した[1]。抗炎症活性はマウス耳へ起炎剤TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) の塗布による浮腫重量差から測定した。

【結果】見出した２つのpol阻害物質は、『Cerebroside（＝Glucosyl ceramide)』(N-{1-[(β-D-Glucopyranosyloxy)methyl]-2-hydroxyheptadeca-3,7-dien-1-yl}-2-hydroxyhexadecanamide：Compound **1**）と『Steroidal glycoside』(Eleutheroside A：Compound **2**）であった[2]。これら２物質はグルコース配糖体であり、哺乳類pol分子種９種類のうちpol λを特異的に阻害した（IC_{50}値：Compound **1**＝12.2 μM、Compound **2**＝9.1 μM)。これらのpol λ阻害様式は、鋳型DNAに対して非拮抗阻害、dNTPsに対しても非拮抗阻害であった。一方、その他８種類の哺乳類pol分子種やDNA代謝系酵素を阻害しなかった。また、Compound **1**とCompound **2**は、共にマウス耳抗炎症活性を示した。これら２物質の立体構造シミュレーションによってClog P・pKa・長さ・幅を比較したところ、ほぼ同じ数値であったことから、この分子構造上の共通性が生理活性の類似性に起因していると考えられる。大豆商品由来の抗炎症成分を利用した機能性食品・化粧品の開発が期待される。



Compound **1**



Compound **2**

[1] 特許第3821867号, 発明者：水品善之 他

[2] Y. Mizushina *et al.* (2012) ***Food Chem.*** in press.

DNA polymerase inhibitor, Soybean, Glucosyl compounds

講演番号：2J14a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ J校舎14会場

エリスリトールが *Porphyromonas gingivalis* のメタボロームに及ぼす影響

Effect of erythritol on metabolome profiles in *Porphyromonas gingivalis*

○久保庭　雅恵、橋野　恵衣、Alghamdi Samar、長　洋[1]、天野　敦雄（大阪大・歯、[1]三菱化学フーズ）

○Masae Kuboniwa, Ei Hashino, Samar Alghamdi, Hiroshi Cho[1], Atsuo Amano (Osakadai, [1]Mitsubishikagaku Foods)

【目的】我々は、糖アルコールの一種であるエリスリトールが、歯面初期付着菌*Streptococcus gordonii*と、歯周病菌*Porphyromonas gingivalis*よりなる混合菌種バイオフイルムの形成を抑制することを報告した。そこで本研究では、メタボロミクスにより*P. gingivalis*の代謝に及ぼすエリスリトールの影響を包括的に検討し、同物質が有するバイオフイルム形成抑制メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

【方法】*P. gingivalis* ATCC33277株菌体（8 × 10^{10} cfu）を、バイオフイルム形成用培地である３倍希釈trypticase soy broth (dTSB)、低濃度（0.8%）エリスリトール含有dTSB、高濃度（10%）エリスリトール含有dTSBにそれぞれ懸濁した。37℃で6時間嫌気培養した後、遠心分離（6,000 ×*g*, 7分）により菌体を回収した。得られた菌体をメタノール／クロロホルム／超純水（5：5：2）溶液にて処理し、菌体内代謝産物を抽出した後、遠心分離（2,300×*g*, 5分）を行い、水相を回収した。限外ろ過の後、ろ液中の細菌代謝物を乾固させ、再び50 μlの超純水に溶解して測定に供した。測定には、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析系（CE-TOFMS）を用い、代謝産物の同定および相対的比較定量解析を実施した。

【結果】CE-TOFMSのカチオンモード、アニオンモードによる測定を実施したところ、１９５(カチオン９４、アニオン１０１)のピークが検出された。核酸合成経路であるピリミジン代謝経路およびプリン代謝経路においては、検出された３７代謝物質のうち２９物質がエリスリトール濃度依存的に減少傾向を示し、そのうちUMP、UDP、UTP、dTMP、dTDP、dTTP、dATP、IMP、CMP、AMP、アデニン、アデノシン、キサンチンでは有意な減少が観察された。一方、検出された１７種類のアミノ酸のうち、ヒスチジン、プロリン、リジンを除く１４アミノ酸においては，１０%エリスリトール群での増加傾向を認めた。さらに、核酸糖であるUDP-グルクロン酸、TDP-グルコース、およびアミノ糖である*N*-アセチルグルコサミン、UDP-*N*-アセチルグルコサミン、*N*-アセチルグルコサミン-１-リン酸、*N*-アセチルグルコサミン-6-リン酸においてはエリスリトール濃度依存的に顕著な減少がみられた。これらの結果より、エリスリトールは*P. gingivalis*の核酸合成阻害によりその増殖を抑制し、さらに菌体外多糖合成やペプチドグリカン合成の基質となる核酸糖およびアミノ糖の合成阻害によりバイオフイルムマトリックス形成能力を低下させ、複合的なメカニズムで*P. gingivalis*のバイオフイルム形成を抑制している可能性が示された。

erythritol, metabolome, *Porphyromonas gingivalis*

講演番号：2J14a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ J校舎14会場

酵素による部分分解糖脂質が小麦粉食品に及ぼす影響

Improvement of baking product by partially enzymatic degradation of glycolipid

○増子朝貞、元田兼一郎、長洋、深沢徹也（三菱化学フーズ(株)）
○Tomosada Masuko, Ken-ichirou Motoda, Hiroshi Chou, Tetsuya Fukazawa(Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation)

【目的】小麦粉中に含まれる脂質にはトリアシルグリセリドなどの非極性脂質の他に、糖脂質（GL）やリン脂質（PL）などの極性脂質が含まれる。これら極性脂質は、産地、品種間の差異はあるが、一般的にGLの方が多く存在していることが知られている。近年、極性脂質の基質選択性がGL:PL=1:2の酵素で小麦粉中の極性脂質を部分的に加水分解すると、小麦粉食品の性質が大きく変化することが報告されており、この現象は非極性脂質を分解することでは得られないとされているが、GL、PLそれぞれの分解がもたらす影響については情報が得られていない。そこで、本研究では、GLに選択性が高い酵素を新たに見出し、小麦粉中のGLの部分分解が小麦粉食品へ与える影響について検証することを目的とした。
【方法】複数の菌株を培養し、生産するリパーゼをスクリーニングした結果、*Aspergillus* sp.が生産するリパーゼが新規な基質選択性を有していることを見出した。このリパーゼはイオン交換、及び、疎水カラムクロマト法により、電気泳動的に単一となるまで精製した。得られたリパーゼは、小麦粉食品モデル（パン）により機能評価を行った。評価指標としては、焼成後の体積変化と、ファリノグラフによるパン生地の物性測定値を用いた。また、パン生地中でのGLの消長は、HPLCを用いて確認した。
【結果】得られた新規リパーゼは、GLに対する選択性が極めて高く、PLの10倍以上の活性であった。この精製酵素をパン生地モデルに添加したところ、生地形成と生地安定性に影響があることが分かった。また、焼成後のパン体積を有意に増加させた。生地中の糖脂質の分析結果から、GLの減少とGLの部分分解物および遊離脂肪酸の増加が確認されたことから、これら小麦粉食品への影響が、本酵素の作用により生成した上記物質に起因するものと推察された。これらのことから、GLの選択的分解が、小麦粉製品の製造工程、及び最終製品の物性に影響を与えることを確認した。

glycolipid, lipase, wheat

講演番号：2J14a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ J校舎14会場

混練法により作製したシクロデキストリン水飴賦形剤を用いたパルミチン酸レチノール包括粉末の特質

Characterization of encapsaluted retinol palmitate in the mixture excipient of cyclodextin and maltodextrin by kneading method.

○小枝　貴弘、和田　正、吉井 英文[1]（フジ日本精糖㈱、[1]香川大・農）
○Takahiro Koeda, Wada Tadashi, Hidefumi Yoshii[1] (Fuji Nihon Seito Corp., [1]Kagawa Univ.,)

【目的】　パルミチン酸レチノール（レチノール）はビタミンAの誘導体であり、難溶性で、酸化分解を受けやすい。よってレチノールを安定な形で一般食品や健康食品等に利用するため、粉末タイプのレチノールが利用されている。レチノールの粉末化法は、乳化エマルションの噴霧乾燥法による作製、シクロデキストリン（CD）を含有する水飴と混練してする混練法により作製されている。この混練法は、機能性食品成分をシクロデキストリンが包接するとともに非晶質のマルトデキストリンに包括して非常に安定な機能性食品粉末を作製する手法として注目されている。本研究では、混練法により作製するレチノール包括粉末の特質を明らかにするために、賦形剤としてCD水飴及びCDとマルトデキストリン（MD、DE=11）を添加した賦形剤とレチノールと混練し作製されたレチノール包括粉末の安定性について検討した。特に、混練時間とMDの添加が、粉末中のレチノール安定性に及ぼす影響について検討した。

【方法】　卓上混練器（PNV-1H、入江商会）に所定量の日本食品化工製CD水飴（CD含有率18.7wt%、含水率24.5wt%）を添加し、温度70°Cで0-80分間混練撹拌して混合賦形剤溶液を作製した。次いで、80°Cで溶解させたパルミチン酸レチノールオイルを添加し、回転数66rpmで混練した。所定時間毎に、混練スラリーを採取後、真空乾燥機（東京理科）で40°C、10Torrの条件で乾燥し混練包括粉末を得た。得られたサンプル粉末のレチノール含有量は、エタノール溶液に溶解し分光光度計を用いて325nmの吸光度を測定して求めた。粉末内のオイルの分布について観察するために、Nile redを溶解させた中鎖脂肪酸トリグリセリドオイルを混練包括した粉末を作製し、共焦点レーザー顕微鏡（FV-300、オリンパス）で観察した。

【結果】　レチノールとγ-CDとの混練により作製した粉末中のレチノールは、混合時間が長い程レチノール含有量が増加し80分の混練時間で、0.045g/g-粉末のレチノール粉末を得た。MDを15wt%添加した賦形剤の場合、レチノール含有率0.10g/g-粉末を得た。これは、MDを添加することにより賦形剤の粘度が上昇しより均一にレチノールが分散したためと考えられる。作製粉末を40-80°Cに静置して酸化安定性を測定した結果、混練法により作製したレチノールの酸化速度はアブラミの式（$R=\exp(-(kt)^n)$）で非常によく相関できた。Rはレチノール残留率、kは粉末中のレチノール酸化速度定数、nは機構パラメーターでn=0.5を用いた。MD無添加に比較して、水飴にMD15wt%を添加した粉末が非常に安定な粉末であった。MD無添加の場合レチノール酸化速度定数の活性化エネルギーが36kJ/molであったのに対して、MD15wt%添加の場合65kJ/molと大きかった。

cyclodextrin, kneading, retinol, encapsulation

講演番号:2J14a14
講演日時、会場:3月23日11:43～ J校舎14会場

タイトル 糖脂肪酸エステル、リシン結合澱粉の創出

Title Development of Lysine and Fatty Acylated Sacchadides-Conjugated Starch

○児島結花里[1]、服部誠[1]、好田正[1]、神山典樹[2]、市川淳[2]、高橋幸資[1]（[1]東京農工大・農学府、[2]日本ハム・中研）

○Yukari Kojima[1], Makoto Hattori[1], Tadashi Yoshida[1], Noriki Kohyama[2], Jun Ichikawa[2], and Koji Takahashi[1] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]R&D Center Nippon Meat Packers)

【目的】澱粉は糊化とともに粘度が急増するが、脆弱となった膨潤粒は崩壊し、粘度が低下する。特に、レトルト処理での物性劣化が著しく、冷却により諸物性が退行し、しばしば糊状感を呈し、親水性であるためにフライ衣のドライ感の維持等に問題を生じている。本研究では、馬鈴薯澱粉(PS)にリシン(Lys)を介してショ糖脂肪酸ジエステル(SE)の加水分解物(Glc/Fru脂肪酸エステル、GE/FE)を結合することで、粘度安定性が良く、糊状感を呈さず、レトルト耐性を付与し、澱粉の糊化挙動、糊液の水分散逸挙動を改質した複合澱粉を創出することを目的とした。
【方法】PSおよびLys-HClを混合し、加温したEtOHに溶解したSEを加えて混合し、風乾した。レトルトパウチに入れ密封し、オートクレーブ処理(120℃, 90 min)した。加温したEtOHで未反応のSE, GE/FEを洗浄除去し、蒸留水で未反応のLysおよびLys-GE/FEを水洗除去し、風乾しPS-Lys-GE/FEを調製した。PS-Lys-GE/FEの偏光像・褐変程度は、偏光顕微鏡・分光測色計で評価した。Lysおよびステアリン酸(SA)含量を測定し、糊化・老化挙動をDSCで、粘度挙動をRVA で評価し、70℃で30 min攪拌(500 rpm)しながら加熱したときの膨潤度および溶解度を測定した。また、100℃で加熱したときの懸濁液の重量減少から水分散逸挙動を評価した。
【結果】PS-Lys-GE/FEは、若干褐変して淡黄色を示し明度(*L**値)は約10%低下したが、未処理PSと同様の明瞭な偏光像を示した。Lysおよび SA含量は、それぞれ0.3%および1.1%であった。これは、澱粉Glc:Lys:GE/FE=286:1:1.8 (モル比)に相当する。120℃で20 min加熱しても膨潤粒は崩壊しなかったので、レトルト耐性が付与できたと考えられる。DSCにより糊化挙動を評価した結果、糊化温度は未処理PSより約13℃上昇し、糊化エンタルピーは約20%に低下したことから、澱粉の構造安定性の著しい向上が認められた。膨潤度および溶解度は、それぞれ未処理PSの約21%および約45%に著しく低下した。RVAにより粘度測定した結果、RVA曲線にピークは認められず、劇的に低い粘度を示した。また、初期老化の指標であるセットバックも未処理PSの約23%に低下した。これは、溶解度が低いために冷却時の澱粉鎖の絡み合いが少ないためと考えられる。糊液の水分散逸挙動を測定したところ、未処理PSの散逸速度は純水の約66%であったが、PS-Lys-GE/FEは約91%で良好な水分散逸性を示した。これは、澱粉粒の膨潤が抑制されて間隙が多く、澱粉溶解量も少ないために純水に近い水分散逸挙動を示したと考えられる。以上のことから、PS-Lys-GE/FEは、澱粉性食品の粘度安定性、糊状感、レトルト耐性および水分散逸性の改善に有効と期待される。

lysine and fatty acylated saccharides-conjugated starch, high vaporization of water, retort-resistant starch

講演番号：2J14a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ J校舎14会場

タイトル　オレイン酸結合による澱粉の改質

Title　　Improved properties of starch by oleylation

○安渡加奈、服部誠、好田正、丹尾式希[1]、高橋幸資（東京農工大・農、[1]味の素ｲﾉﾍﾞｰｼｮﾝ研）

○Kana Ando, Makoto Hattori, Tadashi Yoshida, Noriki Nio[1], and Koji Takahashi (Tokyo University of Agriculture and Technology, [1] Inst. of Innovation, Ajinomoto Co., Inc.)

【目的】澱粉は、50～60℃で水を急激に吸収して大きく膨潤し、一部が溶け出しながら透明度が上昇して粘稠な糊になる（糊化）。このとき脆弱となった膨潤粒は崩壊して粘度が低下するので澱粉濃度を高めると、しばしば過度の糊状感を呈し、澱粉性食品の品質を大きく損なう。糊化した際に粒子の膨潤程度が抑制できれば、膨潤粒の崩壊が少なく糊状感の発生の改善が期待される。また、一方で糊化後に膨潤粒が維持されれば、膨潤粒間に間隙が生じて水分が飛散しやすくなるため、フライ直後のクリスピーな食感が長時間保持できると期待される。これらの基本的原因は、澱粉が親水性の高い高分子であるためと考えられる。そこで本研究では、澱粉に疎水性を付与することで膨潤粒の吸水・膨潤を抑制することとした。疎水性付与の方法として、リパーゼ触媒を用いて馬鈴薯澱粉（PS）にオレイン酸（OA）を結合させ、調製したオレイン酸結合澱粉（OA－PS）の糊化・老化挙動および膨潤度・溶解度の特徴を検討し、OA－PSが低膨潤で安定性の良好な澱粉であることを明らかにすることを目的とした。

【方法】PSをリパーゼ溶液に懸濁し、EtOH脱水してリパーゼ含有澱粉を調製した。リパーゼ含有澱粉にOAおよびモレキュラーシーブを加え、脱水ヘキサン中で30℃、46 h振とうしてアシル化した。ヘキサンで未反応のOAを洗浄除去し、風乾してOA－PSを得た。OAの結合脂肪酸量はガスクロマトグラフィーで測定し、結晶性については、X線回折で評価した。糊化・老化挙動は、DSCで評価し、70℃で30 min、水を溶媒として加熱したときの膨潤度を測定した。OA－PSの偏光像および110℃で30 min加熱後の形態を観察した。また、OA－PS懸濁液を100℃で攪拌（250 rpm）しながら加熱したときの重量減少から水分飛散性を評価した。

【結果】OA－PS の OA 含量は、約 0.18％であった（OA1 残基/澱粉 Glc 956 残基 ）。OA－PS の偏光像は明瞭で、未処理 PS と同様であった。X 線回折で評価した結晶性は、対照 PS および未処理 PS より若干低下する傾向があったが本質的には同様であった。OA－PS の DSC 測定を行った結果、対照 PS は未処理 PS と比較して糊化ピーク温度が約 2℃ 低下し、OA－PS は未処理 PS および対照 PS よりも有意に上昇した。膨潤度は、未処理 PS および対照 PS と比較して顕著に低下し、また、110℃ で加熱したとき、未処理 PS および対照 PS は膨潤粒が残存しなかったが、OA－PS では膨潤粒の残存が確認されたことから、OA の結合により澱粉の構造安定性および熱安定性が増強したと考えられる。水分飛散性を調べた結果、OA-PS は蒸留水の水分飛散速度とほぼ同様で、続いて対照 PS、未処理 PS の順であった。この結果は膨潤度の結果と一致した。以上のことから、オレイン酸が結合することで、少量であっても澱粉熱安定性が向上し、諸熱物性が改質できると考えられた。

acylated starch, reduced swelling, high vaporization of water

講演番号：2J14p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ J校舎14会場

ミルクチョコレートに含まれる遊離脂肪酸の定性および定量分析

○鈴木 大介、吉松 大介、中村 愛、釜阪 寛、米谷 俊、栗木 隆、伏木 亨[1]（江崎グリコ(株)健康科学研究所、[1]京大院農・食品生物）

○Daisuke Suzuki, Daisuke Yoshimatsu, Ai Nakamura, Hiroshi Kamasaka, Takashi Kometani, Takashi Kuriki, Tohru Fushiki[1] (Ezaki Glico Co., Ltd. Institute of Health Sciences, [1]Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】チョコレートの構成成分の約35%は油脂であり、風味、食感、嗜好性等に対する影響が大きい。油脂は報酬効果を有する食品成分であり、油脂のおいしさには長鎖脂肪酸が関与していることから、本研究では、チョコレートに含まれる遊離脂肪酸に注目した。チョコレートの嗜好性と遊離脂肪酸との関係を明らかにするために、チョコレートに含まれる遊離脂肪酸を抽出・精製した後、GC/MS分析に供し、チョコレートに含まれる遊離脂肪酸の定性・定量分析をした。

【方法】特徴の異なる9種類のミルクチョコレートを実験に供した。サンプル2.5 gを入れたガラスビーカーに15 mlの精製水と30 mlのメタノールを加えて1分間ホモジナイズした。さらに60 mlのクロロホルムを加えて1分間ホモジナイズし、分液漏斗に移して下層を回収した後、エバポレーターで濃縮したものを全脂質画分とした。20 mgの全脂質画分を固相抽出カートリッジで精製し、中性脂質を除去した。得られた遊離脂肪酸画分を5%塩化水素メタノール溶液でメチルエステル化し、GC/MSで定性および定量分析した。

【結果】ミルクチョコレートに含まれる遊離脂肪酸の組成はいずれも類似しており、飽和脂肪酸は主にミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸が検出され、不飽和脂肪酸はオレイン酸、リノール酸が検出された。いずれのチョコレートも飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸を比較すると、飽和脂肪酸の割合が高かった。また、遊離脂肪酸の組成比はチョコレート間で違いが見られた。定量分析では、遊離脂肪酸量もチョコレートによって異なり、特に、不飽和脂肪酸の含有量に特徴が見られた。

本研究は生研センターイノベーション創出事業による研究資金により行われた。

Free fatty acid, Chocolate, GCMS analysis

講演番号：2J14p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ J校舎14会場

ミルクチョコレートに含まれる遊離脂肪酸と嗜好性の関係

○吉松 大介、鈴木 大介、中村 愛、山崎 祥史、釜阪 寛、米谷 俊、栗木 隆、伏木 亨[1]（江崎グリコ株式会社 健康科学研究所、[1]江崎グリコ株式会社 研究企画室、[2]京大院・農）

○Daisuke Yoshimatsu, Daisuke Suzuki, Ai Nakamura, [1]Shoji Yamazaki, Hiroshi Kamasaka, Takashi Kometani, Takashi Kuriki, Tohru Fushiki[1] (Ezaki Glico Co., Ltd. Institute of Health Sciences, [1] Ezaki Glico Co., Ltd. Research Planning Department, [2]Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】チョコレートの構成成分の約35 %は油脂であり、風味、食感、嗜好性等に与える影響が大きい。油脂は報酬効果を有する食品成分であり、油脂のおいしさには長鎖脂肪酸が関与していることから、本研究ではチョコレートに含まれる遊離脂肪酸に注目した。本研究の目的は、チョコレートの嗜好性と遊離脂肪酸との関係を明らかにすることである。

【方法】特徴の異なる9種類のミルクチョコレートを実験に供した。まず、GCMSを用いて各サンプルに含まれる遊離脂肪酸の定性・定量分析を行った。また、チョコレートを一定以上消費する20～60代女性108名被験者として、各サンプルの嗜好評価を実施した。さらに、専門パネルを用いて分析型の官能評価を行い、36項目の官能特性の定量化を行った。最後に、遊離脂肪酸の種類および量と、嗜好性および官能特性の相関関係を統計的に解析した。

【結果】サンプル中の遊離オレイン酸の比率と、好ましい官能特性である「ミルク感」「なめらかさ」との関連性が高い傾向があり、好ましくない官能特性である「雑味」とは負の相関性があることが示唆された。

本研究は生研センターイノベーション創出事業による研究資金により行われた。

Free fatty acid, chocolate, GCMS analysis

講演番号：2J14p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ J校舎14会場

チーズの苦味抑制活性とその起因となる遊離脂肪酸の解析

Analysis of bitterness-masking activity of cheese and contained free fatty acids as responsible factors

○ 本間 亮丞[1]、山下 治之[1]、舟木 淳子[2]、上田 玲子[1]、櫻井 敬展[1,3]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1]、朝倉 富子[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]福岡女子大・国際文理、[3]日清食品ＨＤ・食総研）

○ Ryousuke Homma[1], Haruyuki Yamashita[1], Junko Funaki[2], Reiko Ueda[1], Takanobu Sakurai[1,3], Yoshiro Ishimaru[1], Keiko Abe[1], Tomiko Asakura[1] ([1]University of Tokyo, [2]Fukuoka Women's University, [3]Nissin Foods Holdings)

【目的】チーズには苦味ペプチドが含まれるが、強い苦味を感じることは少ない。我々は、ある種のチーズがビールの苦味を抑制することから、チーズ中に苦味抑制物質が含まれると想定し、これまでにエタノール抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー等により4種類の画分を分離した。これらのうち苦味抑制活性が強い画分には脂肪酸が含まれることをTLC、NMR等により明らかにした。さらに苦味抑制活性の異なる4種のチーズ(バラカ、ゴーダ、ブリー、リコッタ）の脂肪酸含有量を調べたところ、苦味抑制活性が強いチーズほど遊離脂肪酸を多く含有している傾向がみられた。この結果は、チーズ中の遊離脂肪酸が苦味抑制物質の本体であることを支持する。今回は、脂肪酸を用いて官能検査を行い、苦味抑制活性を定量化した。さらに、脂肪酸による苦味抑制の作用機序を明らかにするために、苦味物質と脂肪酸の相互作用を測定した。

【方法】チーズ中の遊離脂肪酸をモデル化した溶液としてオレイン酸:パルミチン酸:ミリスチン酸:ステアリン酸=4:4:1:1の割合で含む混合脂肪酸溶液、及び苦味抑制活性の高いバラカチーズ中の脂肪酸として最も多く存在するオレイン酸溶液の2種類を調製し、官能検査に供した。脂肪酸はすべてナトリウム塩として溶解させた。0.0026%塩酸キニーネを起点とした7水準の基準液(公比1.15)を用意し、苦味識別能力の訓練を実施した被験者(n=9)に、塩酸キニーネ0.0080%を加えた各脂肪酸溶液の苦味強度を7水準基準液から回答させた。苦味抑制活性は統計処理によって定量化された。次に、脂肪酸と苦味物質間の相互作用の熱力学的パラメータを、等温滴定型カロリメーター(ITC)を用いて算出した。

【結果】オレイン酸溶液と混合脂肪酸溶液の官能検査の結果は両者とも正規分布に従っていた。平均の95%信頼区間を算出し、0.0080%塩酸キニーネの苦味が0.5 mM混合脂肪酸によって0.0049%-0.0060%に、0.5 mMオレイン酸によって0.0032%-0.0038%に抑制されることが示された。次に、オレイン酸溶液に対して塩酸キニーネ溶液を滴下し、ITCによる熱量変化を測定したところ発熱反応がみられた。滴定条件を好適化することにより、反応の解離定数は10.5 μMと算出された。以上より、脂肪酸は苦味物質に直接結合し、苦味を抑制している可能性が示唆された。

Keyword1, bitter　Keyword2, fatty acid　Keyword3, sensory test

講演番号：2J14p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ J校舎14会場

アワビ肝に存在する構成和脂肪酸・ステロールの同定

Identification of fatty acids and sterols in abalone viscera

川島 英城 （岩手県立大・短大部）
Hideki Kawashima (Iwate Pref. Univ.)

【目的】本研究では，アワビの食性や栄養価の評価に繋がる脂質関連バイオマーカーの再探索を試みた。必要な基礎データを得るために，今回はアワビ肝に存在する構成脂肪酸・ステロールについて，詳細な構造解析を行った。
【方法】常法に従って，アワビ肝から脂質を抽出・分画後，構成脂肪酸はメチルエステルに，ステロールはTMS誘導体にそれぞれ調製し，GC-MSを用いてこれら誘導体の構造解析を行った。
【結果】今回用いたアワビ肝から，これまでにアワビでは報告されていない構成成分を含む70種類の脂肪酸及び最大18種類のステロールを同定した。同定された構成成分の中には，主要な16:0，18:1n-9，18:1n-7，20:1n-13，20:4n-6，20:5n-3，コレステロール以外に，希少なPoly-methylene-interruptedタイプの不飽和脂肪酸や植物性ステロールなどが多数存在していた。これらの結果から，産地識別の可能性についても合わせて検討を行ったので報告する。

Abalone, Fatty acid, Sterol

講演番号：2J14p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ J校舎14会場

サトウキビワックスの成分組成およびポリコサノール、長鎖アルデヒドの分析

Wax, policosanol and long-chain aldehyde of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) of different cultivars

○ASIKIN Yonathan、高橋 誠[1]、広瀬 直人[2]、高良 健作[1]、和田 浩二[1]（鹿児島大院・連農、[1]琉球大・農、[2]沖縄農研センター）

○Yonathan ASIKIN, Makoto Takahashi[1], Naoto Hirose[2], Kensaku Takara[1], Koji Wada[1] (United Graduate School of Agricultural Science, Kagoshima University; [1]Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus; [2]Okinawa Prefectural Agricultural Research Center)

【Objective】Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is a highly valuable crop and is considered as a key commodity in many regions and countries. Sugarcane wax that contains policosanol (a mixture of long-chain aliphatic alcohols), is widely known to have positive effects on human health. In order to investigate differences in the composition and content of sugarcane wax in different sugarcane cultivars, the wax, policosanol and long-chain aldehyde composition of eight sugarcane cultivars were analyzed. We also observed and compared the content of policosanol and long-chain aldehydes in different parts of the sugarcane stalk (the rind and the pith), which were separated using a cane separation system. In addition, changes in the content of policosanol and long-chain aldehydes in sugarcane rinds at two different stages of maturity were also carefully evaluated.

【Materials and Methods】Whole stalks of the Ni 15 sugarcane cultivar, and the rinds of seven different sugarcane cultivars (NCo 310, F 161, F 177, NiF 8, Ni 13, Ni 17 and Ni 22), were used as source materials. Samples were extracted using a Soxhlet apparatus with approximately 150 ml of a mixture of hexane and methanol (20:1 v/v). The wax composition of sugarcane was analyzed using HPLC coupled with an evaporative light scattering detector. Furthermore, the composition of policosanol and long-chain aldehydes was determined using GC-FID and their mass fragment compounds were identified using GC-MS.

【Results】Sugarcane waxes were composed of 55–60% aldehyde and sterol esters, 32–40% alcohol, and small amounts of triacylglycerol, acid, and plant sterols. The highest content of policosanol and long-chain aldehyde compounds (500 mg and 600 mg/100 g rind, respectively) was found in the hand-peeled rind of the Ni 22 sugarcane cultivar. The composition of the policosanol and long-chain aldehyde constituents of the rinds of all of the sugarcane samples showed significant variation although octacosanol (C_{28}-OH) was the main policosanol component in each cultivar. The content of these compounds increased up to 72% during sugarcane maturation from October to January. This study indicated that the composition and content of wax, policosanol and long-chain aldehydes may vary depending on the cultivar of the sugarcane and the specific part of the sugarcane analyzed, as well as on the degree of sugarcane maturity. The results of this study could afford a basis for selection of sugarcane cultivars in agricultural areas for wax or policosanol production.

sugarcane, wax, policosanol

講演番号：2J14p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ J校舎14会場

タイトル 柿ワイン残渣添加飼料を給餌したアユの脂肪酸組成と官能評価

Title The fatty acid composition and sensory evaluation of ayu , *Plecoglossus altivelis*, fed test diets supplemented with persimmon wine residue

○山澤 広之、桑田 知宣[1]、山澤 和子、寺嶋 昌代、野澤 義則（東海学院大食健康、[1]岐阜県河川環境研）

○Hiroyuki Yamazawa, Tomonori Kuwada, Kazuko Yamazawa, Masayo Terazima, Yoshinori Nozawa (Toukaigakuindai, [1]Gifuken Kasenkankyouken)

【目的】アユはサケ目・アユ科に分類される魚で、重要な食用魚である。養殖アユは全生産量の67%を占め、その約一割を岐阜県が占める。しかしながら養殖アユは、天然アユに比べて、体色、脂肪の多さや口どけ、香り等の評価が劣る。これら養殖アユの弱点を天然アユに近い品質にできれば、高品質の養殖アユ販売が可能であると考えられる。一方、岐阜県の特産品である柿生産・加工企業では、多量の廃棄物が生じその有効利用が課題となっている。アユは草食性で天然アユはコケを主食とする。演者らは、岐阜県で多量に排出される植物性の柿廃棄物をアユの養魚飼料に混合することで、養殖アユの体色や口どけ感などが天然アユと並ぶ品質への改善効果について検証している。本報告は、特に“口どけ感”に関連する一要因である脂肪酸組成および食感や外観に関する官能評価を中心に検討した。

【方法】Ⅰ脂肪酸の分析の試料：①天然アユ；岐阜県河川環境研で人工種苗生産した稚魚を河川に放流し、約１ヶ月ごとに４回サンプリングした。②養殖アユ；稚魚を岐阜県河川環境研で引き続き養殖し約１ヶ月ごとに４回サンプリングした。Ⅱ柿混合飼料：配合飼料に柿ワイン発酵時に生じる柿ワイン残渣を 0%(対照区)、10%、20%、30%（試験区）混合した飼料で 63 日間養成し、サンプリングした。Ⅲ脂肪酸分析:背肉をナカライテスク製脂肪酸分析キットで処理した後 GC-MS を用いて行った。Ⅳ官能評価：パネルを大学生として、対照区、30%試験区の養殖アユを用いて素塩焼き調理し行った。

【結果】脂肪酸組成：天然アユにおいて特徴的脂肪酸であるリノレン酸含量の増加には放流後約2ヶ月を要した。試験区の柿ワイン残渣養殖アユでは、対照区と比較してどの区も脂肪酸組成に大きな変化は見られなかった。官能評価：①素焼きアユの外観のうち、“あぶらののり”について、30%試験区アユの方が対照区アユに比し有意傾向ではあるが良好な評価であった。しかし、そのほかの外観評価項目においては、30%試験区アユと対照区アユの素焼きについての差は認められなかった。②30%試験区アユの体色の“好ましさ”および“きれいさ”については、対照区と大きな評価差はなかった。しかし、30%試験区のアユ体色を“鮮やか”と評価した者は対照区に比べ有意に少なく、飼料中の柿ワイン残渣から移行したカロテノイド色素による体色変化は、今回の官能評価の対象者には不良であった。③食感および風味の評価については、双方の素焼きアユの評価に統計的に有意な差は認められなかった。これらより、柿ワイン残渣で飼育したアユの焼きアユ料理は、官能評価において従来の養殖魚に劣るものではない結果が得られた。

sweet fish, fatty acid, sensory evaluation

講演番号：2J14p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ J校舎14会場

低温馴化エノキタケ子実体由来脂溶性物質の機能評価とその構造解析

Characterization of function and analysis of structure on fat-soluble material from cold-acclimating fruit body of *Flammulina velutipes*

○田村 淑恵、加藤 静香、片倉 啓雄、河原 秀久、竹森 洋[1]、小出 芳栄（関西大・化生工、[1]NIBIO、[2]一栄）

○Yoshie Tamura, Shizuka Kato, Yoshio Katakura, Hidehisa Kawahara, Hiroshi Takemori[1] Yoshiei Koide[2](Kansaidai, [1]NIBIO,[2]Ichiei)

【目的】エノキタケ子実体の抽出物であるキトグルカンは、脂肪吸収の抑制と細胞での脂肪分解の促進が行われている可能性が示唆されている。我々は、低温エノキタケ菌子体を餌に混ぜてマウスに与えると、マウスの体重や血清コレステロールが減少することを見出している。そこで、本研究ではエノキタケ子実体の有機溶媒抽出物に着目し、その機能評価および、構造解析を目的としている。

【方法】(有)一栄より提供された4℃に低温馴化された凍結乾燥後のエノキタケ子実体を粉砕し、超純水中に一晩低温室(4℃)で浸け、遠心分離し、残渣をヘキサン中で抽出を行った。その後、減圧乾固し、ヘキサンで再溶解後、5回ほど超純水で分画し、ヘキサン画分とした。次に、レポーター遺伝子アッセイを用いて、PPARδの遺伝子発現量を測定した。

【結果】低温馴化エノキタケ子実体の水処理後のヘキサン抽出画分は、ブランクと比較するとPPARδを活性化するということが確認できた。この活性化は、低温ストレスを与え、さらに水浸の処理を行うときのみ著しく上昇した。また、この水処理時に熱処理を行うと活性化を示さなかった。このヘキサン抽出画分の化合物の構造解析は、現在も解析中である。

PPAR, *Flammulina velutipes* , cold-acclimation

講演番号：2J14p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ J校舎14会場

エミューオイルの機能性に関する研究

Study on functional properties of Emu oil

○ 鈴木悠士、加藤由麻、妙田貴生、桜井智野風[1]、藤森　嶺、戸枝一喜、西澤　信
（東農大生物産業・食香、[1]東農大生物産業・アクア）

○ **Yuji Suzuki, Yuma Kato, Takao Myoda, Tomonobu Sakurai[1], Takane Fujimori, Kazuki Toeda, Makoto Nishizawa**
（**Tokyo Uni. of Agri., [1]Tokyo Uni. of Agri.**）

【目的】

オーストラリア原産の走鳥類であるエミューより抽出されるオイルは、肌への浸透性が高く保湿性に優れており、現在では一部が化粧品の原料として流通している。一方、含有する不飽和脂肪酸の効果を期待して摂取されることもあるが、健康機能的な効果に対する科学的根拠は明確にされていない。我々は、これまでにエミューオイルの経口投与によりラットの脂質代謝が改善することを報告してきた。本研究では、エミューオイルの成分からこの作用に関与する物質の特定を目指し、不ケン化物の効果に着目してラットへの投与実験を行った。

【方法】

エミューオイルを常法によりケン化した。そこで得られた不ケン化物を 0.5 %、および 1.0 % エミューオイルに調合して、それぞれ不ケン化物倍量区および 3 倍量区の試料とした。ラットに 1 ml/kg/day 経口投与し、6 週間飼育した。餌と水は自由摂取とし、体重を毎週測定した。飼育終了後、無痛状態で開腹して精巣上部にある脂肪組織を採取した。コラゲナーゼで単離した脂肪細胞を用いて、アドレナリンアゴニストであるイソプロテレノールで強制的に脂肪分解を促し、放出したグリセロール量を測定した。なお、コントロールとして同量の無添加エミューオイル投与群を設けた。

【結果および考察】

エミューオイルの不ケン化物がラットの体重増加率および精巣上部への蓄積脂肪量に対する影響をみたところ、不ケン化物の投与による変化はみられなかった。次に、脂肪細胞を単離し、脂肪分解反応を促して放出されたグリセロール量を測定したところ、コントロールにおいて 4.33 ±1.11 mg/L、不ケン化物倍量投与群において 5.87±1.61 mg/L であり、不ケン化物倍量投与群はコントロールと比較して、約 40 %分解能が高いことが明らかとなった。一方、不ケン化物 3 倍量投与群は、コントロールと分解能に差はみられなかった。

以上より、エミューオイルのラットに対する脂質代謝改善効果は不ケン化物に起因することが示唆された。現在、不ケン化物の分画、精製を試みている。

Emu oil, unsaponifiables, functional constituents

講演番号：2J14p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ J校舎14会場

マウス肝臓時計遺伝子リセットに魚油が与える影響

Fish oil influences mouse liver clock gene reset

○平尾彰子、糸川未紗、長浜敬樹、大津定治、池田祐子、柴田重信
（早稲田大 先進理工）

○Akiko Hirao, Misa Itokawa, Horoki Nagahama, Teiji Ohtsu, Yuko Ikeda and Shigenobu Shibata (Waseda University School of Advanced Science and Engineering)

制限給餌が SCN 非依存的に末梢臓器における時計遺伝子発現を促すことから、摂食に由来する因子が末梢時計の調節に関与していると考えられている。先行論文、実験により制限給餌によって末梢臓器の時計遺伝子発現リズムは確認されているが、実社会に応用することは難しい。そこで、栄養素を“いつ“、“どのように”、“何を”摂取するべきかを考え、栄養素が体内時計機能に如何に関わっているかを実証した。本研究では主に、Per2-luc KI mouse を用いて ZT0、ZT6 に 2ｇの制限給餌を 2 日間行い、肝臓の Per2 遺伝子発現の位相の差を luciferase assay 法により同調効果を比較した。餌中に含まれる其々の栄養素の制限給餌の同調の影響を調べた結果、栄養素単独では同調効果が弱かった（Hirao et,al 2009）が、AIN93-G 餌成分中の脂質の種類を大豆油から魚油に変化させると、その位相後退作用に顕著な違いがみられた。

魚油とはＤＨＡ、ＥＰＡを豊富に含む油であり、やはりＤＨＡやＥＰＡの成分を置換しても同様の効果が確認され、特にマグロなどのＤＨＡ/ＥＰＡ比率の高い油の後退作用が顕著であった。

また、DHA、EPA によるインシュリンの分泌には GPR120 受容体が関与している事が解っている（Hirasawa et,al 2003）このことから、①ＳＴＺマウスを用いた実験、②GLP-1 受容体作動薬投与マウスを用いた実験を行い、魚油の位相後退作用にはインシュリンの分泌のメカニズムとが大きく関与していることを明確にし、GPR120 を介した新しいパスウェイを確立することに成功した。

講演番号：2J14p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ J校舎14会場

高脂肪食投与による脂肪肝形成に伴う肝細胞Vanin-1の発現亢進

Upregulation of vanin-1 in hepatocytes in response to a high-fat diet

○吉崎　隆之、本村　亘[1]、高橋　伸彦[2]、粂井　志麻[1]、水上　裕輔[1]、張　成宰[1]、高後　裕[1]（鹿児島大・産学官連携推進機構、[1]旭川医大・医、[2]北海道医療大・歯）
○Takayuki Yoshizaki, Wataru Motomura[1], Nobuhiko Takahashi[2], Shima Kumei[1], Yusuke Mizukami[1], Seong-Jae Jang[1], Yutaka Kohgo[1] (Kagoshimadai, [1]Asahikawaidai, [2]Hokkaidoiryodai)

【目的】我々の研究グループでは脂肪肝形成を阻止する新たな分子標的の探索を目的とし、高脂肪食負荷による脂肪肝モデルマウスを使用してその分子メカニズムの解析を行い、その結果核内受容体であるPPARγや脂肪滴表面構成分子ADRPが肝細胞内の脂肪蓄積に関与することなどを報告してきた（BBRC 2005, **336**: 215-222，BBRC 2006, **340**: 1111-1118）。今回、新たな脂肪肝関連分子としてパンテテイナーゼVanin-1が脂肪肝形成に伴い発現上昇することを見出したので報告する。
【方法】10週齢のC57Bl/6Nマウスに脂質カロリー比80%の高脂肪食を与え、食餌性脂肪肝マウスを作成した。1ヶ月後のマイクロアレイによる分析の結果からvanin-1遺伝子に着目し、リアルタイムPCRによるvanin-1 mRNAの発現量変化を経時的に測定した。さらにレプチン欠損により遺伝的肥満を呈するob/obマウスを用いて、14週齢と32週齢のvanin-1 mRNAの発現量をワイルドタイプマウスと比較した。また、in situ hybridizationを行い肝臓内におけるvanin-1 mRNAの発現分布を調べた。さらにin vitro解析として、ヒト肝癌由来細胞株（HuH-7）培養液中にオレイン酸を添加することにより細胞内への脂肪滴蓄積が起こるモデル系を用いて、vanin-1 mRNAの発現量変化を測定した。
【結果】C57Bl/6Nマウスへ高脂肪食投与後、測定した2週から12週の間、vanin-1 mRNAの発現量が通常食を与えたコントロール群と比べて4倍から6倍程度発現上昇していることが明らかとなった。さらに短い期間での高脂肪食負荷におけるvanin-1 mRNA発現量を測定したところ、投与開始1日後から大きく発現上昇が起こることが確認された。また高脂肪食を与えないob/obマウスにおいても、ワイルドタイプマウスと比べてvanin-1 mRNAの発現量が6倍程度高いことが確かめられた。in situ hybridizationの結果、vanin-1 mRNAは脂肪滴を多く有する肝細胞に多く分布していることが明らかとなった。HuH-7細胞にオレイン酸を添加したin vitroの系では、PPARα依存的に非常に低濃度（0.01 mM～）から発現亢進することが示唆された。またオレイン酸以外の脂肪酸で負荷を行うと、使用したすべての脂肪酸でPPARαの発現が亢進したものの、vanin-1の発現亢進はパルミチン酸などの中鎖脂肪酸ではあまり見られず、またvanin-1の発現亢進と脂肪滴形成との相関は認められなかった。

Vanin-1, free fatty acid, fatty liver

講演番号：2J14p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ J校舎14会場

柚子由来ナリンギンの肥満予防機能に関する研究

Study of antiobese effect of naringin from citron

馬場　美那子、室井　啓佑、植松　大樹、石井　宏和、由井　一希、○長田　恭一、東　知宏、飯田　純久[1]（明治大・農・農化、[1]東洋精糖）

Minako Baba, Keisuke Muroi, Hiroki Uematsu, Kazuhiro Ishi, Kazuki Yui, ○Kyoichi Osada, Tomohiro Azuma, Yoshihisa Iida[1] (Meiji University, [1]Toyoseito)

【目的】肥満発症モデルのであるOLETFラットに、柚子由来の高純度ナリンギンを摂取させた場合の抗肥満作用ならびにその作用機序について検討した。

【方法】4週齢のOLETF雄ラットにコーン油5%とラード2%を加え、柚子由来ナリンギンを1%添加（対照は無添加）したAIN93純化飼料を与え、LETOラットにはナリンギン無添加飼料を与えて飼育した。なお、飼料はOLETFラット間ではペアーフィーディング条件で与え、絶食することなく解剖に供した。飼育期間中に体重、腹囲、血圧を測定し、飼育70日目にエーテル麻酔を施して腹部動脈より採血死させ、各臓器を採取し、脂質代謝と肥満に関するパラメータを測定した。

【結果と考察】柚子由来ナリンギン摂取により、体重増加、腹囲増大、脂肪組織重量の増加は対照と比べて抑制された。血漿トリグリセリドと総コレステロールレベルは、ナリンギン摂取で低くなった。また、脂肪酸合成系酵素活性には大きな変化はなかったものの、脂肪酸β酸化系酵素活性およびその酵素たん白質レベルは、ナリンギンの摂取で高くなった。このように、ナリンギンは、肝臓の脂肪酸β酸化を亢進することで中性脂肪の蓄積を抑えて、抗肥満作用を発揮していると思われる。また、ナリンギン摂取で、糞中への中性ステロイド排泄レベルも高まった。
以上のように、柚子由来ナリンギンは、脂質代謝を調節して肥満を予防する有用な作用を発揮すると考えられる。

Naringin, Obese, Rat

講演番号：2J14p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ J校舎14会場

β-クリプトキサンチンは表皮においてヒアルロン酸およびアクアポリン３産生を促進する

β-Cryptoxanthin promotes hyaluronic acid and aquaporin 3 production in human epidermal keratinocyte.

○白倉　義之、高柳　勝彦、向井　克之（ユニチカ(株)中央研究所）
○Yoshiyuki Shirakura, Katsuhiko Takayanagi, Katsuyuki Mukai (R & D center, Unitika Ltd.)

【目的】表皮は人体の最も外側に位置し、厚さは0.2mm程度で保湿性の維持や、外界からの異物進入に対する防御など様々な作用を有していることが知られている。我々は、温州みかんに多く含まれるβ-クリプトキサンチンが核内レセプターであるレチノイン酸受容体（RAR）を活性化することによって脂肪蓄積を抑制する作用を見出し、2010年度の本大会において報告を行った。RARを活性化することは様々な作用を起こすことが知られているが、特に表皮では保湿機能に関与するヒアルロン酸の合成や、水やグリセリンの通り道であるアクアポリン3の産生を促進することが知られている。そこで、本研究ではβ-クリプトキサンチンによるRARの活性化がヒアルロン酸やアクアポリン3に影響を及ぼすかどうかを調べた。
【方法】正常ヒト表皮角化細胞（クラボウ製、NHEK）を専用培地にて培養し、溶媒コントロールとβ-クリプトキサンチン、陽性コントロールとしてall-transレチノイン酸（ATRA）を、血清を含まない培地に添加し、含有培地を交換することで細胞に作用させた。またRARの選択的阻害剤であるLE540とβ-クリプトキサンチンを同時添加して培養し、RARの関与を調べた。β-クリプトキサンチンなどを作用させた後、24時間で細胞を回収し、リアルタイムPCR法にてヒアルロン酸合成酵素2,3とアクアポリン3のmRNA発現量を調べた。また培地中に放出されたヒアルロン酸を測定キット（生化学工業製）により分析した。さらに、3次元ヒト皮膚モデルLSE-high（東洋紡製）を使用し、表皮側からβ-クリプトキサンチンを作用させ、経皮吸収実験を実施した。24時間ごとに作用させ、3日間細胞を培養した。その後作用部分から切片を作成し、抗アクアポリン3抗体(Santa Cruz製）を使用して免疫染色を実施した。
【結果】β-クリプトキサンチンを添加したNHEKでは、ヒアルロン酸合成酵素2,3及びアクアポリン3のmRNA発現量が溶媒コントロールと比して有意に上昇した。また培地中に放出されたヒアルロン酸量に関してもβ-クリプトキサンチン添加によって有意に増加した。RARの選択的阻害剤であるLE540をβ-クリプトキサンチンと同時添加した場合には、ヒアルロン酸合成酵素やアクアポリン3の遺伝子発現量の上昇が抑制されることから、β-クリプトキサンチンがRARを介して作用していることが確認された。3次元ヒト皮膚モデルにおけるアクアポリン3の免疫染色に関しても、β-クリプトキサンチンの添加によって蛍光強度が増加した。以上の結果より、β-クリプトキサンチンは表皮ヒアルロン酸産生促進並びにアクアポリン3の発現亢進を通じて皮膚の健康維持に寄与する可能性が示唆された。

β-Cryptoxanthin, Hyaluronic acid, Aquaporin 3

講演番号：2J14p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ J校舎14会場

飲料による口腔内油脂残存感の解析

Analysis of oiliness in oral cavity after washing with beverages

○林　由佳子、木﨑　諭希、村　絵美[1]、呉　性姫、松宮　健太郎、松村　康生、永井　元[1]（京大院農・農学、[1] サントリービジネスエキスパート）

○Yukako Hayashi, Yuki Kizaki, Emi Mura[1], Seong-Hee Oh, Kentaro Matsumiya, Yasuki Matsumura and Hajime Nagai[1] (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [1]Suntory Business Expert Ltd.)

【目的】油脂を多く使用する中華料理には、ウーロン茶が合うと言われている。吸収による生理的影響が生じていない摂取直後においてもウーロン茶が緑茶や水よりも好まれ、口腔内のさっぱり感に理由があるのではないかと考えられる。ウーロン茶による口腔内のさっぱり感の要因として「流体による物理的洗い流し」「ウーロン茶成分と油脂との相互作用」を考え、「官能評価による感覚強度の測定」「界面張力によるウーロン茶・油脂間の相互作用の定量化」「粒度分布測定による乳化能力の評価」を行った。

【方法】ウーロン茶による口腔内の油脂残存感低減の有無を検証するため、高油脂含有食品であるホイップクリームを用いた官能評価を行った。飲料としてウーロン茶および天然水（軟水）を用いた。評価は、ホイップクリームを食した直後、飲料を摂取させ、ホイップクリーム摂取直後、飲料飲用直後、飲料飲用2分後における感覚強度をVAS(100 mm)により測定した。界面張力測定は、Wilhelmy plate法、粒度分布測定は、レーザー回折式粒度分布計を用いて平均粒子径を測定した。超純水・天然水(軟水)・緑茶・ウーロン茶2種、また、カテキン成分の寄与について調べるためにエピガロカテキンガレート(EGCG)またはエピガロカテキン(EGC)、EGCGとEGC両方を超純水に溶かしたカテキン溶液を飲料サンプルとして用い、油脂として大豆油を用いた。

【結果】官能評価では、全ての評価において、飲用直後では天然水よりウーロン茶で感覚強度が有意に低かった。「ホイップクリームの味」はウーロン茶により感覚強度が弱まり、親水性の「甘さが残っている感じ」も、同様に感覚強度が弱まった。「脂が残っている感じ」も天然水よりウーロン茶で感覚強度が低かったが、飲用 2 分後でも「脂が残っている感じ」は、天然水とウーロン茶間で有意差があった。界面張力測定では、超純水、天然水、緑茶、ウーロン茶の順に低い値をとる結果が得られた。このことから、ウーロン茶が他の飲料と比較して乳化能力が高いことが示唆された。そこで、大豆油とカテキン溶液との界面張力測定を行った。カテキン濃度や温度に関わらず、EGCG, EGC を溶かしたカテキン溶液と超純水の界面張力値に顕著な差がみられなかったことから、EGCG, EGC は界面張力に影響を与えないと考えられた。粒度分布測定では、ウーロン茶における平均粒子径が最も小さくなった。EGCG, EGC を溶かしたカテキン溶液と超純水の平均粒子径は、どの油脂量においても大きな差がみられなかったことから、界面張力の結果と同様に EGCG, EGC は乳化に関係しないと考えられる。また、計時変化をみてもウーロン茶に乳化安定性が見られた。

oiliness, beverage, oral cavity

講演番号：2J14p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ J校舎14会場

タイトル貯蔵魚肉および畜肉の4-ヒドロキシアルケナール生成におよぼすFeイオン添加

Title Effects of Fe ion addition on the formation of 4-hydroxy-alkenal in stored fish and meats

○境　正，押川聖胤　（宮崎大農・応生科）

○Tadashi Sakai, Seitoku Oshikawa (Univ. Miyazaki)

【目的】魚肉・畜肉貯蔵中の脂質酸化により生じる 4-ヒドロキシアルケナールは種々の疾病の原因となることが知られている。これまでの研究結果は，その生成機構が貯蔵魚肉（4-ヒドロキシヘキセナール HHE）と貯蔵畜肉（4-ヒドロキシノネナール HNE）では異なっていた。そこで今回はその生成に Fe イオンが及ぼす影響について検討を加えた

【方法】新鮮なカンパチ、タイおよびブタ肉の筋肉組織をホモジナイズ後、対照区、鉄イオン添加、0.005%、0.01%および 0.02%添加区の 4 試験区の試料を 0℃保存し、魚肉では 4-ヒドロキシヘキセナール（HHE）畜肉では 4-ヒドロキシノネナール（HNE）を 0、3、7 日目にそれぞれ測定した。また，脂質酸化の指標として用いられるマロンアルデヒド(MA)についても測定した。

【結果】カンパチおよびタイ肉中の HHE および MA 含量は、鉄イオン，0.005・0.01・0.02%区において保存 3 日目以降に増加することが分かった。ブタ肉においても保存 3、7 日目における HNE および MA 含量は対照区、Fe イオン、0.005・0.01・0.02%添加区において有意な増加が見られた。魚肉においては特に 7 日目に MA 含量が増加する傾向が見られた。ブタ肉においては脂質自体が魚肉より少なかったにもかかわらず、3 日目以降 MA 含量の大きな増加が見られた。Fe イオン添加により得られた 4-ヒドロキシアルケナール生成はこれまで得られた多くの実験結果とは異なり魚肉および畜肉ともに同じような傾向を示した。

Lipid oxidation 4-hydoroxyhedenal 4-hydroxynonenal

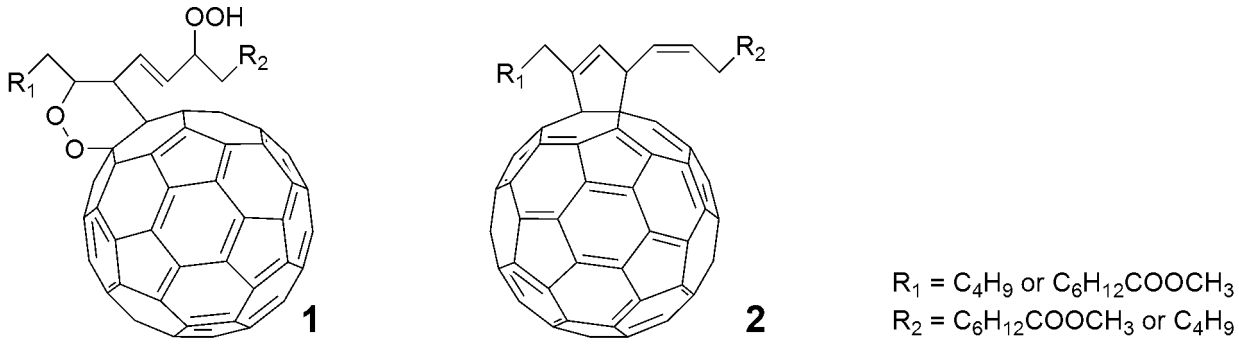
講演番号：2J14p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ J校舎14会場

リノール酸メチルの自動酸化におけるフラーレンC_{60}反応生成物

Reaction products of fullerene C_{60} during the autoxidation of methyl linoleate

○門脇 章夫、岩本 悟志、山内 亮（岐阜大院連農・生資科）
○Akio Kadowaki, Satoshi Iwamoto, Ryo Yamauchi (Gifudai)

【目的】フラーレンはフリーラジカルを捕捉して、脂質過酸化反応を抑制することが知られている。しかし、その詳細な反応機構は未だ不明である。そこで本研究では、リノール酸メチル（MeL）の自動酸化反応で生成するフラーレンC_{60}（C_{60}）反応物を分離して構造解析することによって、フラーレンの脂質フリーラジカル捕捉作用を明らかにすることを目的とした。
【方法】MeLに対して0.1 mol%となるようにC_{60}を添加し、60℃暗所で自動酸化させた。24時間反応させた試料は、シリカゲルODSカラムクロマトグラフィーで過剰のMeLを取り除いた後、分取HPLCでC_{60}反応生成物を分離した。得られた化合物は各種機器分析により構造解析した。一方、0.1 mol% C_{60}を含むMeLを60℃暗所で自動酸化させ、生成するMeLヒドロペルオキシド（MeL-OOH）とC_{60}反応生成物をHPLCで測定した。
【結果】自動酸化させた試料を逆相 HPLC で分析すると、C_{60}反応生成物と思われるピーク **1** と **2** が認められたので、これらピークを分取して化合物 **1** と **2** を得た。化合物 **1** は、さらに順相 HPLC で異性体と思われる 4 ピーク（**1a**－**1d**）に分離された。これらの化合物を NMR および MS で分析した結果、**1a** と **1b** は C_{60} と MeL-13-OOH の 9-ペルオキシ-10-アルキルラジカルとの付加体、**1c** と **1d** は C_{60} と MeL-9-OOH の 12-アルキル-13-ペルオキシラジカルとの付加体であるとそれぞれ決定した。また、化合物 **2** は C_{60} と MeL の 9,11-ジアルキルあるいは 11,13-ジアルキルラジカルとの付加体であった。0.1 mol% C_{60} を含む MeL を空気との接触面積が異なる条件（比表面積 5.7 および 0.51 cm^2/g MeL）で自動酸化させたところ、酸化一次生成物である MeL-OOH の生成はいずれも抑制され、空気との接触面積が大きい試料（5.7 cm^2/g）では、C_{60} の減少とともにまず **2** が蓄積し、その後 **1** が生成した。一方、空気との接触面積が小さい試料（0.51 cm^2/g）では、主な生成物は **2** であった。以上の結果より、C_{60} の脂質過酸化抑制作用は、連鎖開始反応で生じた不飽和脂質アルキルラジカルを C_{60} が捕捉して付加体 **2** を生成することによるものと推定した。



fullerene, lipid peroxidation, antioxidant

講演番号:2J14p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ J校舎14会場

過酸化脂質生成物4-ヒドロキシ-2,6-ドデカジエナールによるタンパク質の修飾

Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,6-dodecadienal

○浅野　亮、平野　啓太、本多　和也、柴田　貴広、河合　慶親、内田　浩二（名大院生命農・応用分子生命科）

○Ryo Asano, Keita Hirano, Kazuya Honda, Takahiro Shibata, Yoshichika Kawai, Koji Uchida (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】酸化ストレス条件下において、アラキドン酸やリノール酸などの多価不飽和脂肪酸は脂質過酸化反応を経て、高い親電子性を有する様々な短鎖アルデヒド類を生成する。これまでに、これらのアルデヒド類によるタンパク質や核酸の酸化的修飾が多様な疾病に深く関与していることが報告されている。そのようなアルデヒド類の中でも主要な脂質過酸化産物である4-hydroxy-2-nonenal (HNE)は、その高い反応性のため細胞に対して強い毒性を有することから、最も研究の進んでいる親電子性アルデヒドのひとつである。一方、アラキドン酸から12-lipoxygenaseによる酸化反応を介して生成される脂質過酸化物として4-hydroxy-2,6-dodecadienal (HDDE)が近年新たに発見された。HDDEはHNEと類似した構造を有するため、HNEと同様に様々な生理作用を持つことが予想されるが、その性質についてはまだ十分な検討が行われていない。本研究ではHDDEに焦点を当て、タンパク質との反応性の検討や求核性アミノ酸のひとつであるhistidineとの反応について詳細な検討を行った。

【方法・結果】本研究で用いるためのHDDEを、既に報告されている合成経路を参考に化学合成した(Bacot *et al., J. Lipid Res.* 2003)。タンパク質とHDDEとの反応性を検討するために、ウシ血清アルブミンとHDDEをリン酸緩衝液中、37℃で24時間反応後、SDS-PAGEにより解析を行ったところ、HDDEの濃度依存的にバンドの変化が確認された。これによりHDDEがタンパク質と反応性を有することが示唆されたことから、*N*-Acetyl-histidineを用いてHDDEとの反応性を解析した。HDDEと*N*-Acetyl-histidineをリン酸緩衝液中、37℃で反応させた後、HPLCによる分析を行った結果、時間依存的にHDDEのピークが減少する一方で、新たな生成物と考えられるピークが検出された。LC-MS分析により、この生成物はHDDEと*N*-Acetyl-histidineが1分子ずつ反応した付加体であることが示唆されたため、NMRを用いた構造解析を行ったところ、HDDEと*N*-Acetyl-histidineのMichael付加体であることが認められた。さらに、この付加体について二次元NMRを用いてより詳細な立体構造解析を行うことで、立体異性体の構造と生成比を決定した。現在、免疫化学的検出法の確立を目的として、HDDE修飾タンパク質に特異的なモノクローナル抗体の作製を試みている。

lipid peroxidation, covalent modification of protein, 4-hydroxy-2,6-dodecadienal

講演番号：2J14p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ J校舎14会場

LC/MS/MSを用いた4-ヒドロキシ-2-ノネナール-ヒスチジン付加体の定量

LC/MS/MS-based quantification of 4-hydroxy-2-nonenal histidine adduct

○平野 啓太、柴田 貴広、河合 慶親、内田 浩二（名大院生命農・応用分子生命科）
○Keita Hirano, Takahiro Shibata, Yoshichika Kawai, Koji Uchida (Grad. Sch. Agric. Nagoya)

【目的】酸化ストレス環境下では、フリーラジカルなどの様々な活性種が生成され、生体成分の酸化修飾を引き起こし、酸化的障害という形でその痕跡を残していく。酸化ストレスに伴う化学反応として最も代表的なものが脂質過酸化反応であり、様々な脂質過酸化物を生成し、タンパク質や核酸などに対する共有結合修飾の結果、細胞内情報伝達系の撹乱や変異誘発などによる細胞機能破綻を来たす。脂質過酸化物の中でも親電子性を有するアルデヒド類は、種類の多様さや反応性の高さから様々な研究がなされており、多くのアルデヒド修飾タンパク質と動脈硬化症などの疾病との関与が報告されている。このようなアルデヒド修飾タンパク質の検出には、免疫化学的手法が汎用されており、免疫組織染色などにより酸化障害を受けたタンパク質の局在などを調べることが可能であるという利点を有するが、抗体の特異性や定量性に欠けるなどの問題があるため、より高感度で定量性に優れた検出方法の確立が望まれる。本研究では主要な脂質過酸化物である４-ヒドロキシ-２-ノネナール（HNE）に着目し、そのヒスチジン付加体についてLC/MS/MSを用いた定量法の確立を目指した。
【方法・結果】標品のHNE-ヒスチジン付加体（HNE-His）を用い条件検討を行った。HNE-His付加体を水素化ホウ素ナトリウム（$NaBH_4$）によって還元反応を行い、6N HClを用いて105 ºCで24時間酸加水分解を行った。加水分解終了後、HClを完全に留去しLC/MS/MS 解析用のサンプルとした。LC/MS/MS (Waters UPLC-TQD) によりHNE-His付加体の還元反応後の酸加水分解に対する安定性および検出限界を検討した。その結果、還元されたHNE-His付加体は酸加水分解に対する安定性が認められ、検出限界はおよそ50 fmolであったことから付加体の高感度検出が可能であることがわかった。そこで、本分析法を酸化LDL中のHNE-His 付加体検出へ応用した。酸化LDL (0.5 mg/ml) を5 μM $CuSO_4$ によりPBS (pH 7.4) 中37 ºCで酸化させ、酸化LDLを調製した。$NaBH_4$ で還元反応を行い、6N HClを用いて105 ºCで24時間酸加水分解を行った。加水分解終了後、HClを完全に留去し、これをLC/MS/MS解析に用いた。その結果、LDLの酸化時間依存的にHNE-His付加体量の増加が認められた。これらのことから、本分析方法が、これまでは困難であった、病態組織などにおけるアルデヒド修飾タンパク質の定量法として有用であることが示唆された。現在、この方法を用い、血清などの生体試料におけるHNE-His付加体の検出および定量を行っている。

Lipid peroxidation, 4-hydroxy-2-nonenal , LC/MS/MS

講演番号:2J15a01
講演日時、会場:3月23日09:00～ J校舎15会場

SHRの血圧に及ぼす梅酢ポリフェノールの作用（第２報）

Effects of Umesu phenolics on blood pressure in spontaneously hypertensive rat (Ⅱ).

○山崎晋平、岸田邦博、岸岡史郎[1]、堀西朝子、矢野史子、山西妃早子[2]、三谷隆彦（近畿大・生物理工、[1]和医大・薬理、[2]和歌山県工技セ）

○Shinpei Yamazaki, Kunihiro Kishida, Shiro Kishioka[1], Asako Horinishi, Fumiko Yano, Hisako Yamanishi[2], Takahiko Mitani (KINDAI BOST, [1]Wakayama Medical University, [2]WINTEC)

【目的】昨年の本大会で我々は、梅酢から合成吸着樹脂を用いて調製した梅酢ポリフェノール(MP)を、高血圧自然発症ラット(SHR)に単回経口もしくは腹腔内に投与したところ、血圧が降下することを明らかにした。今回はSHRに対してMPの長期混餌投与による降圧作用、およびMPの作用機序に関する検討を行ったので報告する。

【方法】長期混餌投与試験として、SHRにはMP投与群（0.05%, 0.1%, 0.2%）およびMPを含まない通常飼料を与えたコントロール群の合計4群(各群 n=8)を設け、対照であるWKYラットにはMP投与群（0.2%）およびMPを含まない通常飼料を与えたコントロール群の合計2群(各群 n=8)を設け、8週間投与した。8週間後、すべての群の給餌飼料をMPを含まない通常飼料に変更して、さらに3週間給餌した。11週間の試験期間中、収縮期血圧(SBP)をラット・マウス用非観血式血圧測定装置 BP-98A((株)ソフトロン 製)を用いてtail-cuff法により測定した。次に作用機序解明のための試験として、ACE阻害剤であるEnalapril、Ca拮抗剤であるNicardipin、α1受容体遮断薬であるPrazosin、またはNO合成酵素阻害剤であるL-NAMEをあらかじめ投与したSHRに梅酢ポリフェノールを1 mg/kgBWの用量で腹腔内投与し、2時間後のSBPを測定した。

【結果】長期混餌投与試験では、SHRは、投与開始後3週付近から用量依存的にMPによる血圧の上昇抑制作用が観測され、８週では0.2%混餌区で約20%の降下率であった。給餌飼料を通常のものに戻すと、約2週間で、血圧はMPを与えていない対照群と同等の値になった。 一方、WKYは0.2%混餌投与でも、血圧には影響がなかった。摂餌量、外観、行動、体重に群間で差はなく、摂餌量から推定されるMPの摂取量は、0.05%、 0.1%、0.2%混餌でそれぞれ、44 mg/kgBW、88 mg/kgBW、176 mg/kgBWであった。また、作用機序解明のために実施した腹腔内投与試験では、ACE阻害剤、Ca拮抗剤、α1受容体遮断薬の降圧作用は、MPの降圧作用と相加的に認められたことから、MPの作用機序は、これらの薬物の作用機序とは異なるものと考えられた。一方、NO合成酵素阻害剤であるL-NAMEをあらかじめ投与しておくと、MPの降圧作用は有意に減弱されたことから、MPは、血管内皮細胞のNO産生系に何らかの作用を働きかけて降圧作用を示すことが示唆された。

Prunus mume, *p*-coumaric acid, polyphenol

講演番号：2J15a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ J校舎15会場

SHRの血圧に及ぼす梅酢ポリフェノールの作用（第3報）

Effects of umesu Phenolics on blood pressure in spontaneously hypertensive rat (Ⅲ).

○和木田直希、部屋雄一、岸田邦博、[1]岸岡史郎、山崎晋平、川端伴顕、矢野史子、堀西朝子、[2]山西妃早子、三谷隆彦（近畿大・生物理工、[1]和医大・薬理、[2]和歌山県工技セ）

○Naoki Wakida, Yuichi Heya, Kunihiro Kishida, [1]Shiroh Kishioka, ShinpeiYamazaki, Tomoaki Kawabata, Fumiko Yano, Asako Horinishi, [2]Hisako Yamanishi, Takahiko Mitani (KINDAI BOST, [1]Wakayama-med farmacol, [2]WINTEC)

【目的】

我々はこれまで、梅酢から合成吸着樹脂を用いて調製した梅酢ポリフェノール(MP)には自然発症高血圧（SHR）の血圧上昇を抑制する作用があることを明らかにしてきた。今回は、MP中の降圧作用に関与する成分の同定、およびその作用機序を解明するため、ラットの胸部大動脈の血管収縮弛緩反応（マグヌス法）を用いて検討した。

【方法】

動物は12週齢雄性Wistar Kyoto ラット（WKY）、および雄性SHRの胸部大動脈を採取し、約4mmの輪切り状態として、マグヌス装置に装着した。血管の定常状態を確認後、アセチルコリン（10^{-6} M）による弛緩反応で血管内皮細胞の生存を確認した。フェニレフリン（10^{-6} M）で血管を収縮させたのち、MP、MPのアルカリ加水分解物、ｐ-クマル酸単体による弛緩反応を調べた。また、血管内皮細胞を除去した場合やL-NAME（NO合成酵素阻害剤）による影響も合せて調べた。

【結果および考察】

MPによる十分な弛緩反応はWKYおよびSHRでは得られなかった。MPのアルカリ加水分解物による弛緩反応は濃度依存的であった。このことはMPの水解により生じたヒドロキシ桂皮酸（ｐ-クマル酸、フェルラ酸、カフェ酸など）が弛緩に関与していると考えられた。そこで、標品のｐ-クマル酸（10^{-5} ～10^{-3} M）による弛緩反応を調べたところ濃度依存的な反応が見られた。WKYの弛緩反応はSHRのそれより有意に低かったL-NAMEの存在下でｐ-クマル酸の降圧作用が減弱したことから、NO産生系を介していることが示唆された。血管内皮細胞の除去処理またはL-NAME 処理の場合ｐ-クマル酸による弛緩反応が減弱したことから、ｐ-クマル酸による弛緩反応は血管内皮細胞に依存的であることが示唆される。

umesu　phenolics , SHR, *Prunus mume*

講演番号：2J15a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ J校舎15会場

梅酢ポリフェノール画分の化学的性質（第４報）

Chemical properties for Umesu phenolics (Ⅳ)

○堀西朝子、川端伴顕、岸田邦博、多中良栄[1]、森めぐみ[1]、前田育克[1]、山西妃早子[1]、赤木知裕[1]、矢野史子、三谷隆彦（近畿大・生物理工、[1]和歌山県工技セ）

○Asako Horinishi, Tomoaki Kawabata, Kunihiro Kishida, Yoshie Tanaka[1], Megumi Mori[1], Yasukatsu Maeda[1], Hisako Yamanishi[1], Tomohiro Akagi[1], Fumiko Yano, Takahiko Mitani (KINDAI BOST, [1]WINTEC)

【目的】

梅酢より合成吸着樹脂を用いて調製した梅酢ポリフェノール画分の構造解析を進めている。これまでにウメ果肉抽出物と梅酢ポリフェノール画分においてLC-MSによる網羅的な構造推定および単離物のNMR、LC-MS分析による構造解析を行ってきた。その結果、いずれのサンプルからもクロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、プルノース類といくつかの*p*-クマル酸誘導体、カフェ酸誘導体を確認した。梅酢ポリフェノール画分からは、アルカリ加水分解物において生じるアグリコン(p-クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸、アブシシン酸)と一致する成分も確認している。本発表では新たな知見を報告し、梅酢ポリフェノール画分について総括する。

【方法】

梅酢よりカラム法で大量調製した梅酢ポリフェノール画分から、Diaion HP20, Sephadex LH20, HydrosphereC18のカラムクロマトグラフィーにより主な成分を単離し,HPLC分析、NMR分析に供した。一部のサンプルについてはさらにLC-MSMS分析をおこなった。また、これらを梅酢ポリフェノールのLC-MSMS分析の網羅的解析データと比較した。

【結果】

ウメ果肉抽出物においてLC-MSMS分析により、p-クマル酸のショ糖誘導体のOHの5個がアセチル基に置換したプルノースⅠ、同4個がアセチル基に置換したプルノースⅡ・Ⅲには各々少なくとも7種の異性体が存在することが確認され、これらポリアシル化ショ糖誘導体は、ウメ果肉に特徴的な成分であると考えられる。一方、梅酢ポリフェノール画分においてもウメ果肉由来のプルノース類の存在がLC-MSMS分析において既に確認している。さらに今回、梅酢ポルフェノール画分から*p*-クマル酸のショ糖誘導体の1個のOHがアセチル基に置換したプルノース類と考えられる新しい成分を単離し、詳細構造を確認中である。

Prunus mume, umesu phenolics, polyphenol,

講演番号：2J15a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ J校舎15会場

梅酢ポリフェノール画分の化学的性質（第５報）

Chemical properties of Umesu phenolics (V).

○岸田邦博、田中あゆみ、川端伴顕、野村英作[1]、堀西朝子、山西妃早子[2]、髙垣昌史[2]、森めぐみ[2]、多中良栄[2]、前田育克[2]、赤木知裕[2]、矢野史子、三谷隆彦（近畿大・生物理工、[1]和歌山県高専、[2]和歌山県工技セ）

○Kunihiro Kishida, Ayumi Tanaka, Tomoaki Kawabata, Eisaku Nomura[1], Asako Horinishi, Hisako Yamanishi[2], Masashi Takagaki[2], Megumi Mori[2], Yoshie Tanaka[2], Ikukatsu Maeda[2], Tomohiro Akagi[2], Fumiko Yano, Takahiko Mitani (KINDAI BOST, [1]WNCT, [2]WINTEC)

【目的】我々は、梅干し製造時の副産物である梅酢から合成吸着樹脂を用いて調製した梅酢ポリフェノール(MP)は、梅果肉由来のポリフェノール成分で構成され、様々な健康増進作用があることを報告してきた。これまで、LC/MS/MSやNMRを用いた分析により、MPは主として、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、プルノース類などのヒドロキシ桂皮酸誘導体から構成されることを明らかにしてきた。今回は、酵素およびアルカリ加水分解法により、MP中のアグリコン組成について検討した。

【方法】MPは2010年度に調製したものを用いた。酵素加水分解法として、MPをリン酸緩衝液（pH 6.5）に溶解させた溶液に、フェルラ酸エステラーゼ(rumen microorganism由来)、グルコシダーゼ(Aspergillus niger由来)、エステラーゼ(porcine liver由来)の酵素混液を添加し、37℃で３時間酵素反応させ加水分解を行った。反応終了後、酢酸エチル抽出画分をHPLCで定量した。アルカリ加水分解法は、MPをあらかじめ窒素置換した1 Mの水酸化ナトリウム水溶液に溶解させ、窒素雰囲気下、37℃で３時間加水分解を行った。反応終了後、溶液を中和したのち、酢酸エチル抽出画分をHPLCで定量した。

【結果】いずれの方法においても、検出された主要なヒドロキシ桂皮酸はカフェ酸、*p*-クマル酸、フェルラ酸であり、加水分解前の約5～10倍の濃度で検出された。*p*-クマル酸については、酵素加水分解法では*trans*体のみが検出されたのに対して、アルカリ加水分解法では、*cis*体と*trans*体の両方が検出された。酵素加水分解法では、カフェ酸、*trans*-*p*-クマル酸、フェルラ酸がそれぞれ1.3%、2.6%、0.7%程度と算出され、アルカリ加水分解法ではカフェ酸、*cis*-*p*-クマル酸、*trans*-*p*-クマル酸、フェルラ酸がそれぞれ1.3%、0.3%、2.4%、1.1%程度と算出された。得られた知見より、MP中のこれらヒドロキシ桂皮酸は、一部は遊離型として存在するが、大部分は糖や有機酸とエステルまたはグリコシド結合し、誘導体として存在すること、アグリコン組成としては、*p*-クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸の順に多く含まれていることが示唆された。

Prunus mume, Umesu phenolics, polyphenol

講演番号：2J15a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ J校舎15会場

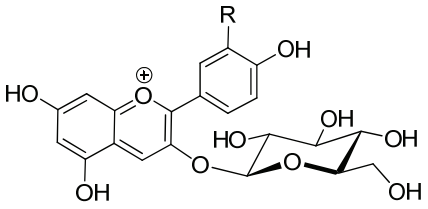
沖縄産野生種ベリーのアントシアニン分析と抗酸化活性

Anthocyanin composition and antioxidant activity of Okinawan wild berries

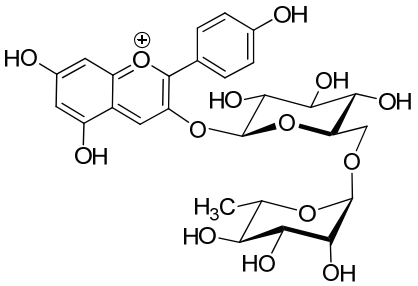
○久保田　通代、石川　千絵、杉山　靖正[1]、福本　修一[2]、宮城　健[3]、熊澤　茂則（静岡県大・食品栄養、[1]鹿児島大・水産、[2]株式会社ポッカコーポレーション、[3]沖縄県森林資源研究センター）
○Michiyo Kubota, Chie Ishikawa, Yasumasa Sugiyama[1], Syuichi Fukumoto[2], Tsuyoshi Miyagi[3], Shigenori Kumazawa (University of Shizuoka, [1] Kagoshima University, [2] Pokka Corporation, [3] Okinawa Prefectural Forest Resources Research Center)

【目的】アントシアニンはフラボノイドの一種であり、アントシアニジンをアグリコンに持つ配糖体である。植物に含まれる紫色の天然色素成分であり、天然着色料として利用されてきたが、近年では、抗酸化活性や抗肥満作用、抗糖尿病作用、視覚改善機能などといった機能性も注目されている。そのため、アントシアニンが豊富に含まれているベリー果実は、その機能性に大きな期待が寄せられている。世界には何種類もの野生種ベリーが自生しているが、その利用に関しては未だ手つかずのものも多く、品種によっては研究例のないものもある。そこで本研究では、これらベリー類の有効活用を目的として、沖縄産の野生種ベリーであるリュウキュウバライチゴ (*Rubus croceacanthus*) とホウロクイチゴ (*Rubus sieboldii*) について、含有成分の分析および抗酸化活性評価を行った。

【方法・結果】リュウキュウバライチゴおよびホウロクイチゴ果実の凍結乾燥粉末を、80% MeOH (0.5% TFA) によって抽出した。得られた抽出物については、HP-20を用いたカラムクロマトグラフィーにより分画した後、分取HPLCを用いて精製を行い、それぞれの沖縄産野生種ベリーから、2種類ずつの主要なアントシアニン成分を単離した。単離したアントシアニン成分は、^{1}H および ^{13}C-NMR, COSY, HSQC, HMBC, MSスペクトルにより同定を行った。その結果、リュウキュウバライチゴ中には、cyanidin-3-glucoside (**1**) およびpelargonidin-3-glucoside (**2**)、ホウロクイチゴ中には、pelargonidin-3-glucoside (**2**) および pelargonidin-3-rutinoside (**3**) が含有されていることが明らかとなった。



1: R = OH
2: R = H



3

また、2 種の沖縄産野生種ベリーと同様にバラ科キイチゴ属であるラズベリー (*Rubus idaeus*) を比較対象として用い、ORAC 法による抗酸化活性評価を行った。その結果、沖縄産野生種ベリーは、ラズベリーに比べて比較的高い抗酸化活性を示した。特にリュウキュウバライチゴにおいて、高い抗酸化活性を持つことが明らかとなった。

Okinawa, anthocyanin, antioxidant

講演番号：2J15a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ J校舎15会場

紅茶テアフラビン類の蛋白質に対する反応性

Reactivity of black tea theaflavins to proteins

○林　美香、石井　剛志、平松　未宇、中山　勉（静岡県大・食品栄養）
○Mika Hayashi, Takeshi Ishii, Miu Hiramatsu, Tsutomu Nakayama (University of Shizuoka)

【目的】テアフラビン類は、茶葉の発酵過程において、カテキン類の酸化重合により生成する紅茶の赤色色素成分である。先行研究において我々は、カテキン類が中性以上のpHを示す水溶液中で自動酸化され蛋白質中のチオール基に共有結合すること [1]、カテキン類の自動酸化がアスコルビン酸や血清アルブミンの存在下で抑制され蛋白質中のチオール基に対する反応性が低下することを報告した [2,3]。本研究では、テアフラビン類の蛋白質に対する反応性を明らかにすることを目的とした。
【方法】試料としてテアフラビン（TF1）、テアフラビンモノガレート（TF2A、TF2B）、テアフラビンジガレート（TF3）およびエピガロカテキンガレート（EGCg）を用いた。各試料の中性のリン酸緩衝液中における安定性を、HPLC法により1時間後の残存量を定量することで評価した。また、アスコルビン酸、血清アルブミンあるいは各種アミノ酸存在下における安定性を評価した。各試料のペプチドに対する反応性を質量分析法により評価した。また、チオール基を持つ蛋白質に対する反応性を電気泳動法により評価した。
【結果】テアフラビン類の安定性は、EGCgの安定性に比べて高かった。アスコルビン酸の添加により、EGCgの安定性は高まったが、テアフラビン類の安定性はほとんど高まらなかった。血清アルブミンの添加により、EGCgの安定性は高まったが、TF3の安定性は高まらず、TF1、TF2AおよびTF2Bの安定性は低下した。各種アミノ酸の存在下では、EGCgの安定性はチオール基を持つシステインの添加により高まったが、テアフラビン類の安定性はシステインの添加により低下した。テアフラビン類の反応性は、チオール基を持つペプチドや蛋白質で確認されたが、チオール基を持たないペプチドでは確認されなかった。蛋白質で確認された反応性は、システインの存在下で著しく低下した。
【結論】本研究により、テアフラビン類の水溶液中における安定性や蛋白質に対する反応性が、EGCgとは異なることが明らかになった。テアフラビン類は、(1) アスコルビン酸の存在下で安定性が高まらないこと、(2) システインの存在下で安定性が低下すること、(3) チオール基を持つペプチドや蛋白質に反応すること、(4) 蛋白質に対する反応性がシステインの存在下で低下することから、自動酸化を介さずに蛋白質中のチオール基と共有結合する可能性がある。

[1] Ishii, T. *et al.*: *Free Ragic. Biol. Med.*, 2008.
[2] Mori, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2010.
[3] Ishii, T. *et al.*: *Mol. Nutr. Food Res.*, 2009.

black tea theaflavins, green tea catechins, protein thiols

講演番号：2J15a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ J校舎15会場

骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少におけるequol鏡像異性体の効果の比較

Comparative effects of equol enantiomers on bone loss in ovariectomized mice

○君羅 好史、勝間田 真一、石見 佳子[1]、上野 友美[2]、内山 成人[2]、鈴木 和春、上原 万里子（東農大・応生・栄養、[1]国立健康・栄養研・食品保健機能、[2]大塚製薬㈱・佐賀栄養製品研）

○Yoshifumi Kimira, Shin-ichi Katsumata, Yoshiko Ishimi[1], Tomomi Ueno[2], Shigeto Uchiyama[2], Kazuharu Suzuki, Mariko Uehara (Department of Nutritional Science, Tokyo University of Agriculture, [1]National Institute of Health and Nutrition, [2]Saga Nutraceuticals Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

【目的】主要大豆イソフラボンの一つであるダイゼインは吸収後、腸肝循環を繰り返しequolへと変換される。equolは強い生理活性を有し、その骨量減少抑制作用についても報告されている。またequolには鏡像異性体である*S*体、*R*体および両者混合のラセミ体が存在し、各equolはestrogen receptor(ER)αまたはβへの親和性およびその後の転写活性が異なる。このことから骨量減少に対する効果の差異が推測される。そこで本研究では、卵巣を摘出した閉経後骨粗鬆症モデルマウスに*S*体、*R*体およびラセミ体equolを投与し、それぞれの骨量減少に対する効果の差異を検討した。

【方法】被験動物として7週齢雌性ddYマウスを用い、AIN-93G飼料組成に基づき、大豆油をコーン油で置換し作製した正常食にて7日間の予備飼育を行った後、卵巣摘出術(OVX)あるいは手術のストレスのみを加えた偽手術(Sham)を行った。手術後、Sham群、OVX群、OVX+ラセミ体equol(0.5mg/kg/day)投与群(Racemi)、OVX+*S*体equol (0.5mg/kg/day)投与群(*S*-Eq)、OVX+*R*体equol(0.5mg/kg/day)投与群(*R*-Eq)、OVX+E_2(17β-estradiol 0.03μ/kg/day)投与群(E_2)の5群に配し、4週間の飼育観察を行った。各投与試料は浸透圧ポンプを用いて皮下より浸透させた。飼育観察終了後、採血を行い、子宮および大腿骨を摘出した。

【結果】最終体重、飼料摂食量で全群間に有意な差はみられなかった。子宮重量はOVXにより減少し、E_2投与により増加した。各equol投与では子宮重量の増加はみられなかった。大腿骨全体の骨密度(BMD)は、OVXにより減少したが、各equolおよびE_2の投与ではSham群と有意な差はみられなかったが、大腿骨遠位部においては*R*体equol投与はSham群と比較して有意に低い値であった。Racemi群における血中および尿中*S*体equol濃度は*R*体equol濃度と比較して、非常に高い値であった。これらの結果より、*R*体と比較し、*S*体投与による骨量減少抑制効果は高いことが示唆された。しかし、*R*-Eq群では血中および尿中*R*体equol濃度が低かったにもかかわらず、大腿骨全体の骨密度は*S*-Eq群と有意な差はみられなかったことから、今後は*R*体equolの骨量減少に対する効果についてさらなる検討が必要である。

equol enantiomers, soy isoflavone, osteoporosis

講演番号：2J15a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ J校舎15会場

加熱調理によるアピオスの主要イソフラボン含量の変化

Changes of major isoflavone contents in *Apios americana* by cooking.

○奈良　一寛（東京家政学院大・現代生活）
○Kazuhiro　Nara（Tokyo Kasei-Gakuin University）

【目的】アピオスは、地下茎に小さな芋を数珠状につけるマメ科植物である。我々はアピオスにおけるイソフラボン類の検索を行い、ゲニスチン以外に大豆には見られない新規成分 Genistein-7-O-gentiobioside を見出した。本実験では、内側と外側（果皮を含む）に分別し、部位における含有量の差異について比較するとともに、加熱調理による変化についても検討した。【方法】アピオスにメタノールを加え、ミキサーにて磨砕し、イソフラボン類を抽出した。その一部を HPLC にて測定した。内側と外側（果皮を含む）を分別したもの、加熱調理したものについても同様に測定した。【結果】部位別でみると、Genistein-7-O-gentiobioside およびゲニステイン含量は果皮を含む外側で多い傾向にあった。加熱調理（皮つき）では、Genistein-7-O-gentiobiosideおよびゲニスチン含量とも減少が認められた。調理前にアピオスを45℃で加温したものではゲニステインが増加していた。

Apios, Genistein-7-O-gentiobioside, Cooking

講演番号：2J15a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ J校舎15会場

ポリフェノールとシステイン誘導体とのDPPHラジカルによる酸化反応
(ポリフェノールと生体成分チオールとの化学相互作用研究I)

Reaction between Polyphenols and a Cysteine Derivative Under DPPH Radical Oxidation Conditions. (Chemical Interactions between Polyphenols and Thiol Biomolecules I.)

○藤本　彩、増田 俊哉（徳島大院・総合）
○Aya Fujimoto, Toshiya Masuda (University of Tokushima)

【目的】

ポリフェノールは食品などの生体成分系に生じるラジカルをトラップして，ポリフェノール自身は酸化されていく性質を有する。しかしこの過程におけるラジカルを経由した成分間反応についてはそれほど明らかになっているとは言えない。我々の研究室ではこれまでにポリフェノールに脂質ペルオキシラジカルが反応した化合物を単離してきた[1)]。一方，脂質ペルオキシラジカルの他にもポリフェノールラジカルと反応する可能性のある生体成分には，チオール基を有するタンパク質やペプチドも考えられる。そこで，今回はチオール基を有する含システインペプチドのモデル物質を用いラジカル条件下でのポリフェノールとチオール基との間の反応を解析することを目的とした。

【方法・結果】

含システインペプチドのモデル物質には，ベンゾイルメチルエステル化したシステイン誘導体を用いた。ポリフェノールは，植物性食品に存在する９種のフェノール酸(エステル)と７種のフラボノイドを用いた。ポリフェノールとシステイン誘導体を１：１で混合した溶液に，今回は，ラジカル源としてDPPHを加えて反応させ，1時間または２時間後の反応液をHPLCに導入し反応生成物を分析した[2)]。その結果，今回用いたポリフェノールは，○ポリフェノールもシステイン誘導体も減少するグループと○ポリフェノールのみが減少するグループ，○システイン誘導体のみが減少するグループに分けられた。この中から，ポリフェノールもシステイン誘導体も減少するグループ(13種)において，ポリフェノールとシステイン誘導体が分子間で反応したことを確認するため，生成物のLC-MS解析を行った。その結果，10種のポリフェノール（カフェ酸メチル，ジヒドロカフェ酸メチル，プロトカテキュ酸メチル，ロスマリン酸，ケンフェロール，カテキン，タキシフォリン，モリン，ルテオリン，ミリセチン）に成分間反応生成物を確認した。また，一部のポリフェノールについては，反応生成物を単離し，その構造も解析した。その結果，反応様式は，特徴的に，カテコール構造のオルト位のみがと反応した生成物を与えたものとシステイン誘導体がカテコール構造に対してランダムに反応し，システイン誘導体は一つだけでなく，二つあるいは三つ反応した化合物も得られたものに区分できることがわかった。これらの反応の推定機構を含めて，詳細を報告する。

文献　１）T. Masuda et al, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 5947-5952 (2008)
２）A. Fujimoto et al, *Food Chem.*, in press

thiol, polyphenol, radical interaction

講演番号：2J15a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ J校舎15会場

チオール物質存在下でのカフェ酸，ジヒドロカフェ酸の酸化・抗酸化反応
（ポリフェノールと生体成分チオールとの化学相互作用研究Ⅱ）

Oxidation and Antioxidation of Caffeic Acid and Dihydrocaffeic Acid in the Presence of Thiol Molecules (Chemical Interactions between Polyphenols and Thiol Biomolecules Ⅱ.)

藤本　彩、○稲井　美由紀、中村　光裕、増田 俊哉（徳島大院・総合）
Aya Fujimoto, ○Miyuki Inai, Mitsuhiro Nakamura, Toshiya Masuda (University of Tokushima)

【目的】
先の研究において，DPPHを用いたラジカル条件でいくつかのポリフェノールはシステイン誘導体と成分間反応をすることが判明した。それらポリフェノールの中で，カフェ酸メチルとジヒドロカフェ酸メチルは化学構造が類似しているにも関わらず生成物が異なることがわかった。そこで，カフェ酸メチル，ジヒドロカフェ酸メチルを取り上げ，チオール基を有するシステイン誘導体存在下において，今回は，AMVN由来のペルオキシラジカルをラジカル源として，反応生成物の解析を試みる。また，チオールと反応することにより，ラジカル的に酸化されたポリフェノールの抗酸化性が回復する可能性が考えられたので，チオール存在下での脂質に対する抗酸化性についても検討することにした。
【方法・結果】
AMVNをラジカル開始剤にしたラジカル反応において，システイン誘導体をポリフェノールの4倍量用いることにより，成分間反応が確実に進行することが判明した。なお，カフェ酸メチルは2位のみチオールが反応し，それ以上は反応しなく，一方ジヒドロカフェ酸メチルは，チオールが次々と反応し，1分子のジヒドロカフェ酸メチルに2分子，3分子のシステイン誘導体が反応した化合物が得られることが反応生成物のLC-MS解析によりわかった。この結果は，先の実験であるDPPHを用いた実験と同様の結果であった。しかしながら，AMVNを用いた実験では，システイン付加した物質が，反応過程で徐々に減少していくことがわかった。この現象は，付加物が更なる抗酸化性を有することを意味するため，カフェ酸並びにジヒドロカフェ酸メチルにシステイン誘導体を共存させ，脂質に対する抗酸化活性を測定した。
　抗酸化活性測定は，リノール酸エチルを酸化基質に用いた。カフェ酸メチル，ジヒドロカフェ酸メチルをそれぞれシステイン誘導体と1：4で混合した溶液に脂質とAMVNを加え，37℃で反応させ，生じるリノール酸エチルヒドロペルオキシドを経時的にHPLCで定量した。その結果，カフェ酸メチル並びにジヒドロカフェ酸メチルにシステイン誘導体を共存させた系では，それぞれカフェ酸メチル，ジヒドロカフェ酸メチルのみのものに比べ，抗酸化性の継続時間(IP)が2～3倍長くなることが分かった。また，システイン誘導体存在下でのジヒドロカフェ酸メチルの脂質抗酸化反応生成物はシステインが複数反応しているにも関わらず，1分子のみのシステインと反応したカフェ酸メチルのものと同程度の脂質抗酸化活性であった。これらの現象の理由については現在検討を行っている。

thiol, polyphenol, antioxidation

講演番号：2J15a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ J校舎15会場

大腸菌と黄色ブドウ球菌におけるカテキンと相互作用する菌体表層タンパク質の同定

Identification of envelope proteins interact with catechins in *E. coli* and *S. aureus*

○島谷　佳奈果、中山　素一、重宗　尚文、継国　孝司、人見　潤、徳田　一、倉八　正篤[1]、野中　愛[1]、宮本　敬久[1]（花王(株)・安全評価研、[1]九大院・農）

○Kanami Shimatani, Motokazu Nakayama, Naofumi Shigemune, Takashi Tsugukuni, Jun Hitomi, Hajime Tokuda, Masahiro Kurahachi, Ai Nonaka, Takahisa Miyamoto (Kao Corp., [1]Kyushu Univ.)

【目的】カテキン類が各種微生物に対し高い抗菌性を示すことが古くから知られているが、菌体への吸着部位等、カテキンの抗菌メカニズムについては未知な部分が多い。我々はこれまでにカテキンの抗菌性発現には酸性条件下では菌体の細胞表層への吸着が重要であること、アルカリ条件下では更にカテキンが産生する過酸化水素も重要であることを見出した。また、カテキンで処理した菌体のSDS-PAGEにより、タンパク質の不溶化や高分子化が起こることを示してきた。今回、カテキンの抗菌作用メカニズムを明らかにすることを目的とし、カテキンの抗菌性が強く発現するグラム陽性菌の*Staphylococcus aureus*と抗菌性の発現が低いグラム陰性菌の*Escherichia coli*の2菌種について、二次元電気泳動により細胞表層タンパク質とカテキンの相互作用を調べ、カテキンと相互作用するタンパク質の同定を試みた。

【方法および結果】カテキンの主要8成分の中で抗菌性が最も高いエピガロカテキンガレート(EGCg)によりpH6.5のリン酸緩衝液中で*E. coli*と*S. aureus*を処理した。1時間処理後、菌体破砕上清を二次元電気泳動に供した。EGCg未処理菌体タンパク質の電気泳動パターンと比較した結果、両菌種においてEGCg処理において発現挙動が変化するタンパク質が多数確認された。未処理区に比べ量が低減、もしくは消失したスポットはカテキンと相互作用し、不溶化したものと考えられた。それらのタンパク質を同定した結果、*S. aureus*においては、相互作用するタンパク質の１つとしてペニシリン結合タンパク質（PBP）を同定した。PBPは細胞の伸長や隔壁形成に関与することから、EGCgが結合することでPBPの機能が抑制されたため細胞分裂が阻害され、増殖阻害を起したものと推察された。また、*E. coli*では相互作用するタンパク質の１つとして糖やアミノ酸など低分子の物質拡散に寄与する外膜に存在するポーリンが同定された。更に、EGCg処理後の菌体のグルコースの取込みに伴う呼吸活性を培養液中の溶存酸素消費量をDOX（ダイキン社製）により測定して調べた。その結果、EGCgで処理した菌体では糖の取り込みの低下による呼吸活性の低下が認められた。これらの結果から、グラム陰性菌ではカテキンが結合することによりポーリンによる親水性低分子物質の取り込みが阻害され、生体内の恒常性維持を困難にすることもカテキンの抗菌作用メカニズムの一つであると考えられた。

catechin, proteome analysis, porin

講演番号：2J15a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ J校舎15会場

カテキン類のベロ毒素活性阻害に関する研究

Study on mechanism for inhibition of Verotoxin by Catechins

○豊福星洋、木村 悦子、立木成美、中山素一[1]、重宗尚文[1]、人見　潤[1]、徳田　一[1]、本城 賢一、宮本 敬久（九大院・農、[1]花王(株)・安全評価研、）

○Seiyou Toyofuku, Etsuko Kimura, Narumi Tachiki, Motokazu, Nakayama[1], Naofumi Shigemune[1], Jun Hitomi[1], Hajime Tokuda[1], Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto (Kyushu Univ., [1]Kao Corp.)

【目的】腸管出血性大腸菌（ベロ毒素産生大腸菌：VTEC）は、主に腸管内でベロ毒素（VT）を産生し、食中毒の原因となる。VTECによる食中毒対策において、細菌の増殖抑制だけでなく、毒素の不活性化および毒素の分泌抑制も重要である。VTは、志賀毒素と同一のShiga toxin familyに分類される毒素であり、志賀毒素とアミノ酸配列が同一のVT１と、アミノ酸配列が55%同一のVT２が知られている。本研究では、カテキン類のVT活性阻害効果について検討したので報告する。

【方法】VTECとしては、VT1産生株として*Escherichia coli* O157:H7 No.33株を、VT2産生株として*E. coli* O157 No.184株を、VT非産生株として*E. coli* O157:H20 No.37株を、それぞれ使用した。No.33株及びNo.184株をLB培地に接種して37℃で一晩振とう培養した。polymixin Bを5000U/mlとなるように培養液に加えて37℃で1時間培養後、遠心分離により得られた上清をろ過滅菌したものを毒素溶液とした。毒素溶液中のベロ毒素の力価は、VTEC-RPLA「生研」(ﾃﾞﾝｶ生研)を用いて測定した。

96穴ﾌﾟﾚｰﾄにベロ細胞を播種し、24時間培養した。毒素溶液とPBSで濃度調製した試験物質を滅菌ﾁｭｰﾌﾞ中で混合し(混合液中の試験物質の最終濃度:0.1v/v%、0.01v/v%又は0.001v/v%)、37℃で1時間保温した後、ベロ細胞培養液に添加した。コントロールとして、同濃度のVT溶液のみを添加した細胞を培養した。48時間培養後、培地を除去してPBSで3回洗浄し、ホルマリン固定した後、クリスタルバイオレットで染色して595nmの吸光度を測定し、細胞の生残を調べた。

【結果】EGCg又はGCgと混合されたVT1溶液を添加された細胞は、他のカテキン類及びテアフラビンの場合と比べて細胞の生存率が向上し、EGCg及びGCgに高いVT1毒性低減作用があることが示された。VT2毒素溶液に対しては何れの試験物質にも毒性低減作用は見られなかった。 VTは、細胞のGb3レセプターから始まる共通の経路を介して細胞に毒性の影響を及ぼすことが知られているが、本試験においてEGCg及びGCgによる毒性低減効果はVT1にのみ観察され、VT2では観察されなかった。従って、EGCg及びGCgが、ベロ細胞ではなくVT1そのものに対して作用し、その毒性活性を不活化していると考えられた。

Verotoxin, Catechin, inhibition

講演番号：2J15a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ J校舎15会場

NMRを用いたテアフラビンとシクロデキストリンとの相互作用解析

NMR analysis of the interaction between theaflavins and cyclodextrins

○西澤　正人，黒田　哲矢，杉山　靖正[1]，熊澤　茂則
（静岡県大院・生活健康 、 [1]鹿児島大・水産）
○Masato Nishizawa, Tetsuya Kuroda, Yasumasa Sugiyama, Shigenori Kumazawa
(University of Shizuoka, [1]Kagoshima University)

【目的】茶ポリフェノールの一種であるカテキン類は特有の苦味・渋味を持つことが知られている。茶の発酵過程でカテキン類は重合して紅茶の主要ポリフェノールであるテアフラビン類を生成するが、テアフラビン類もカテキン類と同様に苦味・渋味があると考えられている。カテキン類にシクロデキストリン(CD)を添加することによって苦味・渋味は低減することが知られており、カテキン類と CD との相互作用は一部研究されている。しかし、テアフラビン類と CD との詳細な相互作用は明らかにされていない。そのため、本研究では NMR を用いてテアフラビン類の一種である Theaflavin 3,3′-di-*O*-gallate (TFDg)と CD との相互作用の解析を試みた (図 1)。

【方法】NMR を用いた連続変化法により、重水 (D_2O)中における TFDg と CD (α-, β-, γ-)との化学量論比を求めた。また、^{1}H-NMR スペクトル滴定法により TFDg と CD との結合能を比較した。さらに、DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)法により、TFDg が CD と相互作用した際の拡散係数を算出した。これらの結果より、TFDg と CD との包接の評価を行った。

【結果】連続変化法の結果よりTFDgと各CDとの化学量論比は1:1であった。^{1}H-NMRスペクトル滴定法の結果より、TFDgに対してCDのモル濃度が増加することで^{1}H-NMRの化学シフト値が変化した。特に、β-CDの共存下においてTFDgの化学シフト値は他のCDと比較して大きな変化を示すことが明らかとなった。さらに、得られた滴定曲線から結合定数を解析したところ、最も結合定数が高かったのはβ-CDであった。これは、TFDgとβ-CDとの相互作用による磁気的環境の変化によるものと考えられた。さらに、DOSYの結果を解析したところ、TFDgのみの場合と、CDが共存した場合の拡散係数では違いがみられた。特にβ-CD共存下におけるTFDgの拡散係数は、β-CDの拡散係数と非常に近い値を示した。したがって、TFDgは各CDの内、β-CDと最も強く包接していることが推定された。

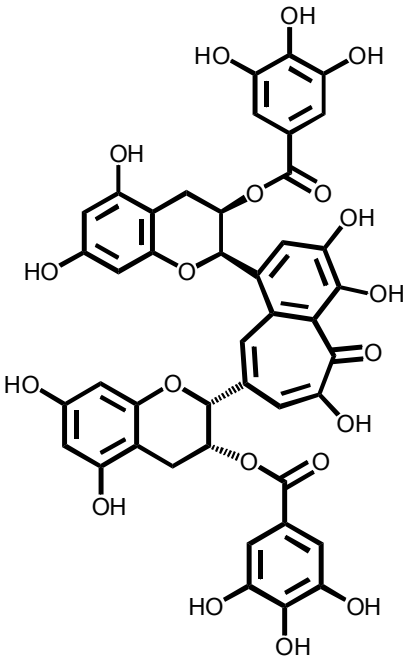


図1. TFDgの構造

NMR, theaflavin, interaction

講演番号：2J15a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ J校舎15会場

内在性ポリフェノール成分による精麦品質の評価

Evaluation of pearled barley qualities by polyphenolic constituents

○神山紀子（農研機構・作物研）
○Noriko Kohyama (NARO)

【目的】主食用や醸造用の大麦では搗精により穀粒の表層が削られる。穀粒中のフラバノール成分は、加熱による褐変の原因成分であり、搗精による効率的な除去が重要である。そこで、フラバノール及び結合性フェノール酸の含量に注目し、搗精歩合や品種による差を調べた。
【方法】H23年産のマンネンボシ、カシマムギ、ファイバースノウの未熟種子（開花後15日と18日）を穀皮、果種皮、胚乳に分画した。H23年産の裸麦6品種、皮麦7品種の完熟種子を段階的に搗精し、全粒粉及び搗精粉を調製した。各画分を75%アセトンで抽出してプロデルフィニジン B3 (PDB3)、プロシアニジンB3（PCB3）と(+)-カテキンの含量を定量し、75%アセトン抽出残渣を１NのNaOHで加水分解した後、酸性条件下で酢酸エチルで抽出したフェルラ酸とp-クマル酸含量を定量した。搗精粒をnew MG染色液で染色し、果種皮の残り具合を観察した。
【結果】登熟過程において開花後15日と18日は、フラバノールや結合性フェノール酸が蓄積する時期に相当する。いずれの品種も穀皮にはフラバノールが検出されず、フラバノール成分は主に果種皮画分に含まれ、PDB3とPCB3は開花後18日のカシマムギの胚乳画分にのみ僅かに観察され、(+)-カテキンはマンネンボシとカシマムギでは胚乳画分にも観察されたが、果種皮画分の3%未満であった。結合性のp-クマル酸とフェルラ酸は穀皮、果種皮、胚乳画分のいずれにも検出されたが、穀皮に最も多く含まれ果種皮、胚乳の順に少なかったが、特にp-クマル酸は穀皮に局在し、果種皮での含量は穀皮の4%未満であった。完熟種子において、穀皮を含まない裸麦6品種のp-クマル酸含量の平均は20.6μg/gであり、皮麦7品種の平均377μg/gに比べて顕著に小さく、p-クマル酸が穀皮に多く分布することが裏付けられた。玄麦におけるフラバノール含量とその組成には品種間差が認められた。段階的に搗精した場合、PDB3とPCB3の残存率は同様に変化し、多くの品種では60%や55%搗精麦で20%以下になった。一方、完全搗精粒率が90%以上であるマンネンボシ30%搗精麦やファイバースノウ25%搗精粒においても(+)-カテキンは玄麦の50%以上が残存していた。このため、PDB3やPCB3と(+)-カテキンの分布は異なっており、(+)-カテキンは粒溝もしくは胚乳に多く分布することが示唆された。搗精により果種皮が除去しにくい品種（ビューファイバー、関東裸糯94号）では、PDB3やPCB3、結合性フェルラ酸の残存率が他の品種と比べて顕著に高かった。以上のことからPDB3、PCB3や結合性フェルラ酸の残存率は精麦品質の指標になり得ると考えられた。

Pearled barley, Flavanol, Phenolic acid

講演番号：2J15a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ J校舎15会場

タンパク質固定化アフィニティークロマトグラフィーによるプロアントシアニジンとエラジタンニンの迅速な分離調製

Rapid preparative separation of proanthocyanidins and ellagitannins by protein-binding affinity chromatography.

○古内　亮[1,2]、松嶋　全人[1]、横山　忠幸[1]、平山　匡男[1,2]（[1]ブルボン・健康科学研、[2]新潟薬大・応生）

○Ryo Furuuchi[1,2], Akito Matsushima[1], Tadayuki Yokoyama[1], Masao Hirayama[1,2] ([1]BOURBON、[2]Niigatayakudai)

【目的】ポリフェノールの構造と生理機能に高い関心が集まっている。これらの中で、フラボノールやアントシアニン、カテキン類などを分離精製する方法は確立されている。しかし、重合物であるプロアントシアニジン（PA）とエラジタンニン（ET）の分離には複雑で多数の工程を必要とする。PAとETはブラックベリーやストロベリー、ボイセンベリーなどのベリー類に共存しており両成分を効率的に分離する方法が求められている。本研究ではPAおよびETとタンパク質が相互作用する性質に着目し、タンパク質を利用したPAとETの効率的な分離法を検討した。
【方法】ボイセンベリー種子を含水エタノールで抽出後、Amberlite XAD-7HPによりポリフェノール抽出物を得た。ポリフェノール抽出物をウシ血清アルブミン（BSA)、卵白アルブミン、カゼイン、ゼラチンと水溶液中で反応させ、遠心後に上澄みを得た。HPLC-FLおよびHPLC-PDAを用い上澄み中のPAおよびETを測定した。アフィニティー担体であるセルファインホルミルとBSAを反応させBSA固定化アフィニティーカラムを調製した。ポリフェノール抽出物をBSA固定化アフィニティーカラムに負荷し蒸留水により溶出させ、PAおよびETの溶出を確認した。
【結果】ポリフェノール抽出物とタンパク質を反応させることにより沈澱物が生じた。上澄み液の分析の結果、BSA、卵白アルブミン、カゼイン、ゼラチン上澄み溶液における回収率はPA2量体（81.9%、102.2%、34.7%、98.3%)、PA3量体（59.8%、95.5%、22.5%、30.4%)、ET（39.5%、17.4%、74.8%、1.3%）であった。カゼインとゼラチンにおいてはPA、ETともに吸着が強かった。BSAと卵白アルブミンにおいてはETの吸着は強く、PAの吸着は弱いことが明らかになった。一方で上澄みにはタンパク質の混入が認められた。そこで、より効率的な分離を達成するためにBSA固定化アフィニティーカラムを調製し分離を検証したところ、PAとETは良好な分離を示した（回収率：PA2量体（105. 2%)、PA3量体（68.2%)、ET（0.0%))。以上の結果はタンパク質固定化アフィニティークロマトグラフィーを利用した方法がPAとETの効率的で迅速な分離調製法と成りうることを示すものである。

proanthocyanidin, ellagitannin, protein-binding affinity chromatography

講演番号：2J15p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ J校舎15会場

梅酢ポリフェノール画分の化学的性質（第６報）

Chemical properties for Umesu Phenolics (VI)

○高垣 昌史、山西 妃早子、野村 英作[1]、岸田 邦博[2]、堀西 朝子[2]、多中 良栄、森 めぐみ、前田 育克、赤木 知裕、矢野 史子[2]、三谷 隆彦[2]（和歌山県工技セ、[1]和歌山県高専、[2]近畿大・生物理工）

○Masafumi Takagaki, Hisako Yamanishi, Eisaku Nomura[1], Kunihiro Kishida[2], Asako Horinishi[2], Yoshie Tanaka, Megumi Mori, Yasukatsu Maeda, Tomohiro Akagi, Fumiko Yano[2], Takahiko Mitani[2] (WINTEC, [1]WNCT, [2]KINDAI BOST)

【目的】梅干し生産地の和歌山県では、多量の梅酢が副産物として発生している。これまでに、我々は、梅酢より合成吸着樹脂を用いて調製した梅酢ポリフェノール画分の構造解析を行い、健康機能性が期待されている梅酢由来の各種ポリフェノールについて報告している。今回は、梅酢ポリフェノール画分に多く含まれている、糖について分析を行い、用途開発のための基礎データを取得する。

【方法】梅酢ポリフェノール画分をサイズ排除クロマトグラフィーによる分子量分布測定、高速液体クロマトグラフィー／質量分析法により検討し、さらに、単糖類に加水分解し、高速液体クロマトグラフィー／電気化学検出器を用いて、単糖の含量を測定した。

【結果】構成糖では、グルコース、アラビノース、キシロース、ガラクトース、ラムノースが確認でき、大部分は、細胞壁の成分であることがわかった。主成分は、ピークトップ分子量が、２０９５のヘミセルロース（キシログルカン）とペクチンに含まれるアラビナンの低分子化した成分であることがわかった。

Umesu, sugar, arabinose

講演番号：2J15p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ J校舎15会場

梅果実中の核の化学的性質について

Subcritical methanol extraction of Japanese apricot (*Prunus mumu*) stone

○川端 伴顕、堀西 朝子、多中 良栄[1]、森 めぐみ[1]、前田 育克[1]、高垣 昌史[1]、山西 妃早子[1]、赤木 知裕[1]、岸田 邦博、矢野 史子、三谷 隆彦（近畿大・生物理工、[1]和歌山県工技セ）

○Tomoaki Kawabata, Asako Horinishi, Yoshie Tanaka[1], Megumi Mori[1], Yasukatsu Maeda[1], Masafumi Takagaki[1], Hisako Yamanishi[1], Tomohiro Akagi[1], Kunihiro Kishida, Fumiko Yano, Takahiko Mitani (KINDAI BOST, [1]Wintec)

【目的】ウメ(*Prunus mume*.Sieb. et Zucc.)の種子は、核と呼ばれる厚く硬い木質の内果皮で覆われており、木質の成分（リグニン、セルロース、ヘミセルロース）で主に構成されている。梅の加工時に多量に排出され廃棄物となっている核の有効利用は、地域の大きな課題である。これまでに強力な電磁波による可溶化を行ったという報告はあるが、その条件下ではフェノール性化合物の大部分は分解されていると推定される。我々は亜臨界メタノールを用いて、核の部分的な溶解を行い、幾つかのフェノール性化合物を同定したので報告する。

【方法】超臨界装置反応容器（耐圧硝子工業株式会社）に脱脂した核乾燥粉末と脱気した溶媒（メタノール、90%メタノール、50%メタノールまたは水）を8分目まで入れ、超臨界装置温度制御装置（耐圧硝子工業株式会社）で190℃まで昇温させた。その後、送液ポンプ（日本分光株式会社）により脱気した溶媒（メタノール、90%メタノール、50%メタノール、水）を加え10MPaまで加圧した。一定時間後サンプルを抽出液と残渣を分けて回収した。溶解度は残渣の乾重で求めた。抽出液はHPLCで分析し、主要ピークは調製用HPLCで単離し、MSおよびNMR分析を行った。

【結果】亜臨界条件の水、50％メタノール、90％メタノール、およびメタノールによる核の溶解度はそれぞれ 51.3、63.9、39.8、および 25.5％であった。メタノールの割合が多くなるに伴い、HPLC に 4 本の主要なピーク（Peak1-4）が認められるようになった。Peak1-4 は NMR により、シリンガアルデヒド、シナピルアルコール、コニフェニルアルコールのγメチルエステル体、シナピルアルコールのγメチルエステル体と同定された。これらの化合物の機能性について検討中である。亜臨界水ではコニフェニルアルコール、シナピルアルコールとそのγメチルエステル体のピークは検出されず、フルフラールやヒドロキシメチルフルフラールが検出されたことから、セルロースの著しい分解が生じていると推測される。

subcritical methanol, *Prunus mume*, stone

講演番号：2J15p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ J校舎15会場

梅酢ポリフェノールの消化管吸収に関する研究

Gastrointestinal absorption of umesu phenolics in mouse and rat

○田中あゆみ、岸田邦博、川端伴顕、矢野史子、堀西朝子、赤木友裕、三谷隆彦（近畿大・生物理工、[1]和歌山工技セ）

○Ayumi Tanaka, Kunihiro Kishida, Tomoaki Kawabata, Fumiko Yano, Asako Horinishi, Tomohiro Akagi, Takahiko Mitani (KINDAI BOST, [1]WINTEC)

【目的】梅酢から合成吸着樹脂を用いて調製した梅酢ポリフェノール(MP)には約12%前後（没食子酸当量）の梅果肉由来のポリフェノールが含まれ、主として、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、プルノース類などのヒドロキシ桂皮酸誘導体から構成される。またMPには様々な健康増進作用があり、その機序解明にはMPの消化管吸収をはじめとする生体内動態の解明は重要である。今回は、ラットを用いてMPの生体内動態について検討を行ったので報告する。

【方法】Wister 系ラット（7～12 週齢、雄性）を用い、MPを経口単回投与および尾静脈単回投与した。投与量は、経口投与の場合1087、2174、4348 mg/kgBW、尾静脈投与では109、217、435 mg/kgBWとし、各群3匹で実施した。血漿中に認められたMP由来のピークを、投与10 分～240分後まで経時的に追跡し、ピークの同定および濃度変化をLC/MS により分析した。

【結果】経口投与試験では、投与直後よりMP由来の主要ピーク１と多数の小さなピークが認められた。これらのピーク面積の合計値は10～30 分後において最高濃度を示し、以降減少したが、3時間後に再び血漿中濃度が上昇し二相性を示した。投与量とAUCの間には用量依存性が認められ、MPの成分が消化管から吸収されていることが確認できた。また、検出されたピークのうち、主要ピーク1はLC/MS分析からp-クマル酸と推定されたことから、p-クマル酸が効率よく吸収されていることが示唆された。p-クマル酸のCmaxは、1087、2174、4348 mg/kgBW の経口投与試験でそれぞれ、5.79、17.7、30.7 μMであり、経口投与試験および尾静脈投与試験から得られたAUCの比較からバイオアベイラビリティを計算したところ、MP中のp-クマル酸のバイオアベイラビリティは11.1%であった。これらの知見よりMP中の遊離型ヒドロキシ桂皮酸はそのまま吸収され、エステル体等の誘導体は、消化管で消化酵素や腸内細菌により加水分解されたのちに吸収されていることが考えられた。また、一部のヒドロキシ桂皮酸誘導体はそのままの形で吸収され、小腸吸収上皮細胞や肝臓で加水分解され遊離型として血中に存在するものと推定された。

Prunus mume, umesu phenolics, absorption

講演番号：2J15p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ J校舎15会場

梅酢ポリフェノールの抗菌作用に関する研究

Antibacterial activity of umesu phenolics

○中林 良彦、太田 佳菜、川端 伴顕、岸田 邦博、堀西 朝子、石井 営次、[1]池本 重明、[2]稲葉 伸也、[1]山西 妃早子、[1]赤木 知祐、矢野 史子、三谷 隆彦（近畿大・生物理工、[1]和歌山県工技セ、[2]和歌山県農産物加工研）

○Nakabayashi Yoshihiko, Ota Kana, Kawabata Tomoaki, Kishida Kunihiro, Horinishi Asako, Ishii Eiji, [1]Ikemoto Shigeaki, [2]Inaba Nobuya, [1]Yamanishi Hisako, [1]Akagi Tomohiro, Yano Fumiko, Mitani Takahiko (KINDAI BOST, [1] WINTEC, [2] Wakayama Agrc Biol Res In)

【目的】ウメ(*Prunus mume*.Sieb. et Zucc.)は消化不良や食あたりなどの消化器系疾患の際にも、民間伝承薬的に使われており、「梅肉エキス」や漢方薬の「烏梅」が知られている。ウメの抗菌作用は含有するクエン酸やリンゴ酸等が大きく寄与すると考えられてきた。我々はウメ果実中に含まれるポリフェノールも何らかの作用があるのではないかと考え、梅酢から調製した「梅酢ポリフェノール」(MP) の抗菌作用を調べることとした。

【方法】*Citrobacter freundii* (8090)、*Enterobacter aerogenes* (13048)、*Enterobacter cloacae* (13047)、*Escherichia coli* (25922)、*Klebsiella oxytoca* (13182)、*Proteus hauseri* (13315)、*Proteus mirabilis* (29906)、*Salmonella enterica* (13311) の8株の腸内細菌を用いた。() 内はATCC番号を示す。培地はカゼイン、ペプトン、酵母エキス、ブドウ糖を含む普通液体培地で、前培養後、96well-plateを37℃で静置培養し、OD630値を定時に測定した。

【結果】MPは、用いた腸内細菌8株中7株では弱いながらも抗菌活性を示した。MPのアルカリ加水分解物はMPの10倍程度（MICとして300～400 μg/ml）の抗菌活性が増すことが判明した。MPは主として、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、プルノース類などのヒドロキシ桂皮酸誘導体から構成され、そのアグリコンであるヒドロキシ桂皮酸（p-クマル酸、フェルラ酸、カフェ酸）が抗菌作用を担っていると推察された。そこでこれらの標品を用いた試験の結果、p-クマル酸、フェルラ酸、カフェ酸、クロロゲン酸の順に抗菌活性が見られた。

一方、クエン酸は梅の中に5%程度存在しているが、これを0.03125%に希釈しても抗菌活性がみられた。この濃度におけるpHは5.4となり、低いｐHが抗菌作用に大きく寄与していると考えられる。しかし、実際の小腸内では、クエン酸はおそらく中和されてしまうので、抗菌活性は期待できないと考えられる。MPおよびその加水分解物は中性付近でも抗菌活性がみられることから、小腸内でのウメの抗菌活性の主役を担っている物質と考えられる。

antibacterial,umesu phenolics,*Prunusu mume*

講演番号：2J15p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ J校舎15会場

有色素米登熟中の機能性成分の変化

Changes in functional components in colored rice during ripening period

岩間　巧、石井　利行[1]、上野　直也[1]、○奥田　徹、廣瀬　裕子[2]（山梨大・ワイン研、[1]山梨県総農技セ、[2]山梨大・教育）

Takumi Iwama, Toshisyuki Ishii[1], Naoya Ueno[1], ○Tohru Okuda, Yuko Hirose[2] (Inst Enol Vitic, Univ. Yamanashi, [1]Yamanashi Pref. Agritech. Center, [2]Fac Edu Human Sci, Univ. Yamanashi)

【目的】近年、食スタイルの欧米化などにより長期的に米価が低迷し、農業従事者の高齢化や担い手の減少に伴い農地の減少や、耕作放棄地の増加など、生産基盤の弱体化が進行している。そこで山梨県ではより付加価値の高い米の生産として有色素米の栽培が検討されている。これら有色素米が高い付加価値を得るためには、機能性の評価が必要である。前年度の試験では赤米を試料として、苗の移植時期による機能性差異を検討したが、優位な差が見られなかった。そこで、本研究では、収穫時期の異なる赤米の機能性の分析し評価することで、より高品質な赤米の収穫時期の検討を試みた。

【方法】収穫時期や品種(夕やけもち、西南赤糯 137 号)の異なる赤米試料を 80 %エタノール溶液を用いて抽出を行い、フェノール量、DPPH ラジカル補足活性、プロアントシアニジン量及び色差値の測定を行った。またプロアントシアニジンの構造や平均重合度を測定するために、フロログルシノリシスを行った後に、HPLC により分析を行った。

【結果】フェノール量、プロアントシアニジン量とDPPHラジカル補足活性に正の相関が見られたことから、赤米の抗酸化活性はプロアントシアニジンによってもたらされることが示唆された。また、栽培中の赤米を経時的にサンプリングしたところ、収穫時期が遅くなるにつれ赤色色素は多くなるが、フェノール量およびDPPHラジカル補足活性が減少した。またフロログルシノリシスによるプロアントシアニジン組成平均重合度の算出を行なった結果、赤米のプロアントシアニジンは(+)-カテキンと(-)-エピカテキンにより構成され、末端ユニットは(+)-カテキンであることが示唆された。また品種により平均重合度が異なり、夕やけもち 9.5±0.8、西南赤糯137号 8.0±0.3であった。さらに、成熟により平均重合度が高まることがわかった。

colored rice, proanthocyanidin, color

講演番号：2J15p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ J校舎15会場

イソチオシアネート熱分解物によるポリフェノールオキシダーゼ活性の抑制

Inhibition of the polyphenol oxidase by heat-degraded isothiocyanates

○橋本 啓、萩原 めぐみ、渋江 佳子、宇田 靖（宇都宮大・農）
○Kei Hashimoto, Megumi Hagiwara, Yoshiko Shibue, Yasushi Uda (Utsunomiya University)

【目的】ワサビ、マスタード、キャベツなどのアブラナ科野菜のグルコシノレートは組織破壊により、酵素ミロシナーゼの働きでイソチオシアネートを生じる。このイソチオシアネートは抗発がん作用や抗菌作用をもつことから機能性成分として期待されている。しかし、一般にイソチオシアネートは、特に水溶液中などでは不安定であり、加熱の影響を受けることが知られている。我々は、加熱調理がイソチオシアネートの機能性に及ぼす影響を検討した結果、アリルイソチオシアネート（AITC）の熱分解物がポリフェノールオキシダーゼ（PPO）活性を抑制することを見出した。そこで本研究では、AITC熱分解物のPPO抑制活性を他のイソチオシアネート類の熱分解物の抑制活性と比較し、また阻害様式を検討した。また、活性物質の精製を進めた。

【方法】所定の濃度のイソチオシアネート溶液をネジ蓋付き試験管に採り密栓後、ブロックヒーター又は水浴中で加熱処理をした。イソチオシアネートとしてAITCのほかにもフェニル、アルケニルやメチルチオの構造を持つものについて比較した。

PPO抑制活性のアッセイには、酵素としてマッシュルーム由来のPPOを、基質としてL-DOPAを用い、490 nmにおける吸光度の上昇をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。酵素活性は単位時間あたりの吸光度の変化で評価した。

AITC熱分解物は逆相短カラムに吸着させた後、順次溶出液のアセトニトリル濃度上昇させて溶出することにより分画した。凍結乾燥物をPPO阻害活性のアッセイやHPLCによる分析・分画に供した。

HPLCによる分析・分画では、カラムとしてDevelosil C30-UG-5などを用い、溶離液にはアセトニトリルと0.1% TFAの混液を用いた。

【結果】AITCには1割程度の弱いPPO抑制活性しか認められなかったが、加熱と共に抑制活性が上昇した。抑制活性は加熱温度と時間に依存し100℃で15分間処理することにより約9割抑制し最大となった。他のイソチオシアネートにも加熱処理によるPPO抑制活性の上昇が認められたがAITC熱分解物よりも弱いものであった。そこで、加熱処理されたAITC溶液の逆相短カラムによる分画物を、HPLCで更に分画し、得られた各画分について、PPO抑制活性のアッセイを行い活性物質の単離同定を進めている。これまでのところ、部分構造としてC=Sを持ち、O原子を含む環状化合物であると推定されている。一方、Lineweaver-Burkプロットにより阻害様式を検討した結果、AITC熱分解物によるPPO阻害は混合型非拮抗阻害であると考えられた。

allyl isothiocyanate, polyphenol oxidase, thermal degradation

講演番号：2J15p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ J校舎15会場

スフィンゴシンキナーゼ阻害剤による緑茶カテキンEGCG誘導性アポトーシスの増強

Enhancement of green tea polyphenol EGCG-induced apoptotic cell death by sphingosine kinase inhibitor.

○塚本　俊太郎、黄　宇慧、鈴木　貴視、上田　直樹、山田　耕路、立花　宏文（九大院農院・生機科）

○Shuntaro Tsukamoto, Yuhui Huang, Takashi Suzuki, Naoki Ueda, Koji Yamada, Hirofumi Tachibana (Kyushu Univ.)

【目的】これまでに我々は、緑茶カテキンEGCGの受容体として67-kDa laminin receptor (67LR) を同定した。さらに、EGCGは67LRを高発現する多発性骨髄腫において、67LRを介してprotein kinase C delta(PKCδ)/酸性スフィンゴミエリナーゼ(aSMase)/ceramide産生経路を活性化することでアポトーシスを誘導するが、67LRを発現しない正常ヒト末梢血リンパ球に対して全く致死作用を示さないことを報告した。こうした結果は、EGCGの高いがん細胞特異性を示しているが、生理的低濃度におけるEGCGのアポトーシス誘導活性は低い。そこで本研究では、EGCGの67LRを介したceramide産生を増加させることでアポトーシス誘導活性が増強できるのではないかと考え、ceramide分解促進因子であるスフィンゴシンキナーゼに対する阻害剤の併用効果を検討した。

【方法・結果】EGCGはヒト多発性骨髄腫細胞株U266に対してaSMase活性を顕著に上昇させた。また、EGCGのアポトーシス誘導作用はaSMaseの発現をノックダウンさせることにより消失した。一方、スフィンゴシンキナーゼ（SHK）はceramideの分解を促進し、抗アポトーシス因子であるスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）を産生することが知られている。そこで、SHK阻害剤を用いてceramideの代謝およびS1Pの産生を抑制したところ、EGCGのアポトーシス誘導作用を顕著に増強した。また、aSMaseノックダウン細胞においては、EGCG/SHK阻害剤によるアポトーシス誘導作用は観察されなかった。このことから、SHK阻害剤はceramide代謝を阻害し、EGCG誘導性のaSMase/ceramide産生経路の活性化を維持することでアポトーシスを誘導していることが示唆された。さらに、この併用効果は67LRが発現していない正常ヒト末梢血リンパ球においては観察されなかったことから、高い特異性を有することが示された。以上の結果より、SHK阻害剤はEGCG誘導性の67LR/aSMase/ceramde産生経路の活性化を維持することで多発性骨髄腫細胞特異的にアポトーシスを誘導することが示された。

EGCG, apoptosis, Sphingosine kinase inhibitor

講演番号：2J15p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ J校舎15会場

乳タンパク質カゼインによる茶飲料の渋味抑制機構の解析

Characterization of mechanisms for reducing the astringency of tea beverages by milk casein

○御手洗 晴日、石井 剛志、北村 実穂、中山 勉（静岡県大院・食品栄養）
○Haruhi Mitarai, Takeshi Ishii, Miho Kitamura, Tsutomu Nakayama (University of Shizuoka)

【目的】茶飲料の渋味は、牛乳を添加することにより抑制されることが経験的に知られている。先行研究において我々は、牛乳の渋味抑制作用を担う成分のひとつとして乳タンパク質カゼインを見出した。本研究では、リン脂質膜に対する結合を指標としたポリフェノールの渋味評価法を利用して、カゼインによる茶飲料の渋味抑制機構に関する知見を得ることを目的とした。
【方法】実験には、茶飲料として緑茶と紅茶を使用し、茶ポリフェノールとしてカテキン類（エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレートあるいはエピガロカテキンガレート）およびテアフラビン類（テアフラビン、テアフラビンモノガレートあるいはテアフラビンジガレート）を使用した。まず、牛乳あるいは乳成分（全粉乳、脱脂粉乳、カゼインナトリウム、ホエータンパク質およびラクトース）を添加した茶飲料（緑茶および紅茶）の渋味を味覚センサにより評価し、渋味抑制作用の強弱を成分間で比較した。次に、茶ポリフェノール（エピガロカテキンガレートおよびテアフラビンジガレート）とリン脂質膜の結合にカゼインが与える影響を2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンポリマーでコートした96穴プレート（MPCプレート）を用いて解析した。さらに、MPCプレートの解析に使用した試料を回収し、電気泳動法や限外濾過法によりカゼインと茶ポリフェノールの分子間相互作用を解析した。得られた実験結果を基に、カゼインによる茶飲料の渋味抑制機構を推定した。
【結果】渋味の抑制作用は、カゼインが乳脂肪やラクトースなどの他の乳成分に比べて強かった。茶ポリフェノールのリン脂質膜に対する結合は、MPCプレートにカゼインを作用させた後に茶ポリフェノールを添加した場合、カゼインと茶ポリフェノールを混合し同時に添加した場合、茶ポリフェノールを作用させた後にカゼインを添加した場合において、いずれも阻害された。茶ポリフェノールのカゼインに対する相互作用は、回収した全ての試料において確認された。
【結論】カゼインは、カテキン類やテアフラビン類などの茶ポリフェノールと相互作用することにより、それらのリン脂質膜に対する結合を阻害し、茶飲料の渋味を抑制することが明らかになった。リン脂質膜に対する茶ポリフェノールの結合は、(1) カゼインが飲料中で遊離の茶ポリフェノールと相互作用すること、(2) カゼインが口腔内で遊離の茶ポリフェノールと相互作用すること、(3) カゼインがリン脂質膜に結合した茶ポリフェノールと相互作用することにより阻害されたと推定される。現在、渋味抑制機構の解明を目指し、カゼインと茶ポリフェノールの結合親和性、結合部位および結合構造の解析を進めている。

astringency, casein, tea polyphenols

講演番号：2J15p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ J校舎15会場

ポリフェノールの渋味評価法の開発

Development of a method for the evaluation of astringency of polyphenols

○ 石井 剛志、渡辺 紀和子、山田 弓、御手洗 晴日、上園 博美、山田 智[1]、中山 勉
（静岡県大・食品栄養、[1]日油㈱）

○ Takeshi Ishii, Kiwako Watanabe, Yumi Yamada, Haruhi Mitarai, Hiromi Uezono, Satoshi Yamda[1], Tsutomu Nakayama (University of Shizuoka, [1]NOF Corporation)

【目的】茶やワインの美味しさに影響する因子として渋味がある。渋味は、舌や口腔粘膜の表面にタンニン（ポリフェノール）や凝集した唾液タンパク質などが結合することによって生じる味覚・感覚刺激であると予想されている。渋味は一般的に官能試験によって評価されるが、個人差が大きく客観性の高いデータを得ることが難しい。渋味を客観的に評価する方法として味覚センサがあるが、測定に要する試料の量が多く一度に測定できる試料の数も少ないために、高価な試料を用いた試験や複数の試料を用いたスクリーニング試験には不向きである。本研究では、ポリフェノールの渋味を、簡便、迅速かつ高感度に一斉評価できる方法の開発を目的とした。
【方法】渋味は口腔内に存在する生体成分に渋味物質が結合することにより発現すると仮定し、緑茶の渋味成分であるカテキン類の渋味とリン脂質膜やタンパク質に対する結合親和性の関連を調査した。カテキン類は、エピカテキン(EC)、エピガロカテキン(EGC)、エピカテキンガレート(ECg)、エピガロカテキンガレート(EGCg) を用いた。渋味は味覚センサにより、リン脂質膜やタンパク質に対する結合親和性はHPLCや水晶発振子マイクロバランスにより評価した。得られた知見を基に、96穴プレートを用いたポリフェノールの渋味評価法を構築した。構築した方法によりカテキン類や食品の渋味を評価し、得られた結果を官能試験や味覚センサの結果と比較した。
【結果】カテキン類の渋味の強さは ECg > EGCg >> EC > EGCの順であり、カテキン類のリン脂質膜に対する結合親和性の強さと完全に一致した。この知見を基に、リン脂質膜に類似の構造を持つ2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーでコートした96穴プレート(MPCプレート) を用いて、ポリフェノールとリン脂質膜の結合をレドックスサイクリング染色により検出する方法を構築し、ポリフェノールや緑茶飲料の渋味を評価した。カテキン類の渋味の順番は、MPCプレートにより得られた結果と味覚センサにより得られた結果の間で一致したことから、本検出法がポリフェノールの渋味評価に有用であることが示唆された。MPCプレートにより得られる結果を渋味とし、市販の緑茶飲料を評価した結果、飲料中のカテキン含量が高まるにつれて渋味が強まること、マスキング剤であるシクロデキストリンを添加することで渋味が弱まることを、味覚センサよりも少ない試料の量で短時間に確認できた。このMPCプレートによる渋味評価は、緑茶飲料だけでなく、紅茶、ワイン、柿（水抽出物）においても可能であった。
【結論】本研究で開発したMPCプレートを用いた渋味評価法は、既存の方法に比べて必要とする試料の量が少なく、短時間に複数の試料を測定することが可能である。本評価法の活用により、食品の渋味評価や品質検査、新しい渋味マスキング剤の開発への応用が期待できる。

astringency, polyphenols, tea catechins

講演番号：2J15p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ J校舎15会場

発酵乳の嗜好性向上に与える乳酸菌および酵母の役割

Effect of lactic acid bacteria and yeast on the fermented milk taste

○川口 恭輔、小谷 恵、中村英志[1]、前野正文（カルピス(株)・発酵応用研究所、[1]味の素(株)・イノベーション研究所・フロンティア研究所）

○Kyosuke Kawaguchi, Megumi Kotani, Eiji Nakamura[1], Masafumi Maeno (Microbiology & Fermentation Laboratory, Calpis Co., Ltd., [1]Frontier Research Labs., Institute for Innovation, Ajinomoto Co., Inc.)

【目的】

乳酸菌発酵乳は、保存性が高く良好な風味を有するため、古くから世界中で飲用されてきた。その菌叢をみると、一部の伝統的な発酵乳には、乳酸菌だけではなく酵母の共生が報告され、それが独特の風味形成に関与している可能性が示唆されている。過去の研究では、発酵乳の生理作用に関する報告は多数あるものの、嗜好性に注目した研究はあまり報告がない。そこで、本研究では、発酵乳の嗜好性に及ぼす乳酸菌や酵母の役割を解析することを目的とした。

【方法】

脱脂乳、乳酸菌(*Lactobacillus helveticus*)発酵乳、乳酸菌(*L. helveticus*)+酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)発酵乳を調製後、糖度と酸度が同等となるようショ糖と乳酸を添加し、試験用飲料を調製した。嗜好性の評価には、SD(IGS)系ラット(雄、7-9週齢)を用い、二瓶選択法により48時間の試験サンプル飲用量を比較した。さらに、香りの影響を評価するために、ラット両鼻腔へ$ZnSO_4$溶液を注入して嗅覚麻痺ラットを作製し、二瓶選択法による同様の検討を実施した。

【結果】

未発酵乳(脱脂乳)飲料と乳酸菌発酵乳飲料との比較においては、飲用量に有意な差は認められなかったが、乳酸菌+酵母発酵乳飲料では、未発酵乳飲料および乳酸菌発酵乳飲料と比較して、有意に飲用量が多くなる結果が得られた。一方、嗅覚麻痺ラットを用いた実験では、乳酸菌+酵母発酵乳飲料と未発酵乳飲料との飲用量に有意な差は認められなかった。本実験条件下では、乳酸菌単独の発酵よりも、乳酸菌+酵母発酵した時の嗜好性が有意に向上したことから、酵母発酵を付加することは発酵乳の嗜好性向上に有用であることが示唆された。一方、嗅覚麻痺ラットでは乳酸菌+酵母発酵乳飲料に対する嗜好性の向上は見られなかったことから、嗜好性向上には嗅覚由来の情報を介することが示唆された。その要因としては、酵母発酵により生成する香気性成分が重要であると考えられた。

fermented milk, two bottle test, palatability

講演番号：2J15p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ J校舎15会場

清酒の疎水性呈味化合物について

Taste-active hydrophobic compounds of sake

○橋爪　克己、伊藤　俊彦、下橋　美沙子、小北　篤史、常盤野　哲生、奥田　将生[1]
秋田県大・生物資源、[1]酒総研
○Katsumi Hashizume, Toshihiko Ito, Misako Shimohashi, Atsufumi Kokita, Tetsuo Tokiwano, and Masaki Okuda [1]
Akitakendai, [1]NRIB

【目的】清酒もろみのアルコール濃度は並行複発酵により20%近くに達する。このため清酒には多くの疎水性化合物が含まれる。清酒の疎水性化合物のうち高級アルコール、酢酸エステル、脂肪酸エチルエステル等の揮発性化合物については古くからよく研究されている。一方、清酒の不揮発性の疎水性呈味化合物については、芳香族アルコール、苦味ペプチドなどが報告されているが知見は少ない。近年、製成後に活性炭素処理しない清酒が製品化されているが、その理由は疎水性化合物を吸着除去する活性炭素処理により香味の一部が失われるためと推定される。そこで、清酒の品質に影響を及ぼす可能性がある疎水性の呈味化合物について検討した。
【方法】清酒製造の最終段階で通常行われる活性炭素処理をしていない市販純米吟醸清酒（精米歩合60%）を試料とし、疎水性化合物を抽出・濃縮し、TDA（Taste Dilution Analysis）法により分析した。高いTD factorを示したRP-HPLCフラクションの濃縮物について、異なる条件下でRP-HPLCを繰り返し行い、呈味とMS分析データを指標として、分画、精製し、原因化合物の同定を試みた。さらに同定された化合物の市販純米清酒中の濃度を測定し、同定化合物に対する活性炭素処理の影響について調べた。
【結果】活性炭素未処理市販清酒試料の抽出・濃縮物をRP-HPLCで48フラクションに分け、TDA法により分析した結果、1000倍を超える高いTDファクターを示すフラクションを複数見出した。これら高いTDファクターを示すフラクションの濃縮物に対し条件を変えたRP-HPLCを複数回行い、呈味とMS分析データを指標にして精製した標品について、ESIMS、MS/MS、NMR、アミノ酸シーケンス分析等により調べた結果、トリプトフォール、苦味ペプチドなどの既知の呈味化合物とともに、２つの新規なアミノ酸10残基からなるペプチドを見出した。この２つのペプチドは、既に演者らが報告している苦味ペプチドと同様に、イネグルテリンの酸性サブユニットに由来するピログルタミン酸残基N末端とアミノ酸配列を持ち、C末端トリプトファン残基のカルボキシル基がエチルエステル化されたものであった。市販純米清酒中の同定化合物の濃度を測定した結果、活性炭素未処理のラベル表示がある試料は高い疎水性呈味化合物レベルを示し、またこれら成分が著しく低い試料も存在した。これら疎水性呈味化合物のバラツキの最大要因と推定される活性炭素処理を疎水性化合物レベルが高い試料に対して行ったところ、活性炭素処理量に応じて調べた全ての疎水性化合物濃度は減少し、特に疎水性が高い化合物は少量の活性炭素によって顕著に減少した。

sake, hydrophobic compounds, taste dilution analysis

講演番号：2J15p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ J校舎15会場

動物行動学に基づいた間接的苦味マスキング効果の定量的解析

Quantitative analysis for the indirect masking effects to bitter taste based on animal behavior.

○河合　崇行、日下部　裕子　（農研機構）
○Takayuki Kawai, Yuko Kusakabe (NARO)

【目的】苦味をマスキングするには分子カプセル抱合、フィルム成型、架橋法などで苦味そのものを味受容させない直接法と甘味や香料を添加して苦味を感じにくくさせる間接法がある。近年、食品や薬剤の開発に味覚センサーが導入され、種々の苦味マスキング剤の効果についても情報が蓄積されてきている。しかし、後者のように脳内での味覚高次処理により、苦味の嫌悪感が軽減され苦味を感じにくくなっているマスキング系に関する評価法はほとんどない。本研究では、脳処理の重要性に着目しマウスの行動学を基に、間接的苦味マスキング効果の評価を試みた。
【方法】本研究にはリック解析を利用した。マウスは提示された試料溶液の嗜好に依存して、その溶液を舐める（リック）回数が変化する。この習性を利用して、種々の濃度の安息香酸デナトニウム苦味溶液に対する嗜好性を解析した。さらに、甘味素材であるサッカリンNa、うま味素材であるグルタミン酸Na、塩味素材である塩化ナトリウムを苦味溶液に添加した場合のリック回数を解析し、変化の大きさを数値化した。
【結果】本実験の条件下では、2.5 mMサッカリンNa添加が2～3　mMの安息香酸デナトニウムの苦味を約44%、500 mMグルタミン酸Na添加が約69%、100 mM塩化ナトリウム添加が約47%低減している可能性が示された。さらに一定濃度の苦味溶液にサッカリンNaを添加した場合は添加量に依存したマスキング効果が得られるのに対し、グルタミン酸Naを添加した場合は添加量に依存しない範囲もあった。これらのことは、ヒト官能パネリストを使った解析の前段階として、実験動物を用いたマスキング効率の客観的で詳細な評価が利用可能であることを示唆している。

bitter, masking, lick

講演番号：2J15p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ J校舎15会場

甲州種ワインの苦味化合物の官能特性

Sensory Characteristics of Bitterness Components in Koshu Wine

○斉藤　史恵、山本　祐梨子、恩田　匠[1]、久本　雅嗣、奥田　徹（梨大・ワイン研、[1]山梨県工技セ）

○Fumie Saito, Yuriko Yamamoto, Takumi Onda[1], Masashi Hisamoto, Tohru Okuda (Enol. Vitic. Univ. Yamanashi, [1]Yamanashi Prefectural Industrial Technology Center)

【目的】甲州種ブドウから造られる甲州種ワインは代表的な国産白ワインであり、醸造技術の向上により品質があがり年々評価が高まってきている。しかし、甲州種ワインは辛口になるにつれて後味に独特の苦味を呈するため、この苦味が甲州種ワインにとってマイナスの要因となっている。苦味化合物としては、コーヒー酸、*p*-クマル酸、コーヒー酸エチルエステル、*p*-クマル酸エチルエステル、カフタリック酸、クータリック酸、カプリル酸エチル等が知られているが、これらのワイン中での苦味の閾値や、その他の苦味化合物についての詳細な検討はまだなされていない。そこで本研究では、水溶液条件およびモデルワイン条件で苦味化合物の弁別閾値検査および味認識装置による測定を行い、甲州種ワインの苦味に寄与する化合物の特定を試みた。
【方法】コーヒー酸、*p*-クマル酸、コーヒー酸エチルエステル、*p*-クマル酸エチルエステル、カフタリック酸、クータリック酸、カプリル酸エチルをそれぞれ超純水またはモデルワイン（5 g/L 酒石酸を含む8% エタノール溶液）に溶解し、予め硫酸キニーネによる訓練を行ったパネルによる苦味の弁別閾値検査を行った。さらに味認識装置（SA402B, インテリジェントセンサーテクノロジー）を用いた苦味値の測定も行った。
【結果】水溶液条件におけるコーヒー酸、*p*-クマル酸、コーヒー酸エチルエステル、*p*-クマル酸エチルエステル、カフタリック酸、クータリック酸、カプリル酸エチルの閾値は、それぞれ26、92、64、66、77、62、32 mg/Lであった。一方、モデルワイン条件では、それぞれ35、29、17、14、16、15、16 mg/Lであった。このことから、これら苦味化合物は水溶液中よりワイン中のほうが苦味を感じやすいことが示唆された。味認識装置の測定結果では、コーヒー酸エチルエステルと*p*-クマル酸エチルエステルが他の苦味化合物に比べて高い苦味値を示した。*p*-クマル酸エチルエステルとコーヒー酸エチルエステルは、ワイン中の濃度は高くはないが苦味が持続し後味として知覚されることから、甲州ワインのもつ独特な苦味に寄与していると示唆された。また、カフタリック酸は甲州種ワインに特に多く含まれ、モデルワイン条件での閾値を大幅に超えることが報告されていることから苦味を与える主要な要因となっていると考えられた。一方、官能検査でみられた条件の違いによる苦味の感じ方の差が味認識装置では認められなかったことから、官能検査と味認識装置との測定結果の相関性についてさらなる検討が必要であると考えられた。

Koshu wine, Bitterness, Sensory analysis

講演番号：2J15p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ J校舎15会場

ハバネロ系唐辛子（*Capsicum chinense*）の香気成分の解析

Analysis of volatile components of some hot peppers

○深見　治一、尼岡　大輝、尾張　嘉平、矢野　善久（京都学園大学）
○Harukazu Fukami, Taiki Amaoka, Yoshihira Owari, Yoshihisa Yano（Kyoto Gakuen University）

【目的】カプサイシンを多く含むホットペッパーであるハバネロ系唐辛子２品種（レッドサビナ、オレンジライプ）および最も辛いとされるブートジョロキアはいずれも華やかでフルーティーな香りを与える。唐辛子の水蒸気蒸留物やオレオレジンの分析はすでに報告されているが新鮮な唐辛子果実の揮発性成分の詳細な解析は少ない。今回、３種の唐辛子の揮発性成分をGCMSの分析結果から解析する。

【方法】唐辛子生果実の細断物の揮発性成分を MonoTrap®（GLサイエンス社製）で吸着し、塩化メチレンで溶出後、常圧濃縮し、ヘキサンに溶解し、GCMSを測定した。また、標品比較のために炭素数5から7の脂肪酸エステルを常法により合成し、GCMSを測定した。各揮発成分のマススペクトルを市販データベース集（Nist 05）や標品のスペクトルとの比較およびRI値（Retention Index）によるデータ検索（Aroma Office ver. 2）、さらにはスペクトル解析から同定した。

【結果】オレンジライプでは16種の成分を検出し、13種を同定した。レッドサビナでは21種の成分を検出し、14種を同定した。一方、ブートジョロキアでは28種の成分を検出し、20種を同定した。同定した成分において、イソ吉草酸およびイソヘキサン酸の炭素数6～8のノルマルおよびイソアルキルエステル類が含まれ、またいくつかのセスキテルペンも含まれることがわかった。特に主要成分として、イソ吉草酸イソヘキシルやノルマルヘキシルエステルが含まれた。これら揮発性エステル類やセスキテルペンがハバネロ系唐辛子の独特の香りを与えていると考えられた。

Capsicum chinense, Habanero, isovalerate

講演番号：2J15p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ J校舎15会場

ブラジル産グリーンプロポリスに含まれる辛味成分

Pungent Compounds in Brazilian Green Propolis

○秦 健敏、田澤 茂実、太田 象三、柳 美羅[1]、三坂 巧[2]、市原 賢二 （アピ株式会社　長良川リサーチセンター、[1]韓国食品研究院、[2]東大院農生科・応生化 ）

○Taketoshi Hata, Shigemi Tazawa, Shozo Ohta, Mee-Ra Rhyu[1], Takumi Misaka[2], Kenji Ichihara (Api Co.,Ltd. Nagaragawa Research Center, [1]Korean Food Research Institute, [2]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【目的】プロポリスは、ミツバチが植物の新芽や滲出物と自らのロウを固形成型化した樹脂状の天然物質である。巣の間隙に塗布され、巣の補強、外敵からの防衛、衛生環境の維持などの役割を果たしている。プロポリス抽出物の機能性は、抗菌・抗ウイルス作用や抗腫瘍作用、免疫増強作用など数多くの報告がなされており、健康食品素材として広く利用されている。国内のプロポリス市場の多くを占めるブラジル産のグリーンプロポリス抽出物は、ハーブ様の香りと特徴的な辛味を有している。この刺激感のある辛味は、利用者の嗜好性に大きく影響する。しかしながら、これまでプロポリス抽出物の辛味成分についての分析は実施されていない。本研究は、プロポリス抽出物中の辛味成分およびその作用機序を解明することを目的とした。

【方法】ブラジル産プロポリスのエタノール抽出液を、Chromatorex ODS DM1020T（富士シリシア化学製）を充填したオープンカラムを用い、30%エタノールから100%エタノールまで段階的に濃度勾配をかけ18画分に分画した。官能試験により辛味を呈する画分を判定し、該当する画分のHPLC分析を行った。さらに、HPLC分析により示唆された成分の精製品を水溶液またはドリンク処方溶液に調製し、官能試験（7名によるモニター試験）で辛味を感じる濃度を検討した。

【結果】ブラジル産プロポリスのエタノール抽出液を分画し、官能試験により辛味を判定した結果、50%エタノール溶出画分の後半から60%エタノール溶出画分の前半に辛味を感じた。この画分をHPLCにより分析した結果、『アルテピリンC（3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid ; $C_{19}H_{24}O_3$=300)』が90%以上含有されていることが明らかとなった。アルテピリンCの水溶液またはドリンク処方溶液を用いたモニター試験の結果、0.1 mg/mLから「少し辛い」と感じ、0.225 mg/mLでは「明らかに辛い」と判定された。

今回の試験により、ブラジル産のグリーンプロポリスの辛味成分がアルテピリンCであることが強く示唆された。現在、アルテピリンCが辛味を呈するメカニズムを検討するため、ワサビ辛味成分の受容体（hTRPA1）を安定発現した培養細胞を用いた試験を実施しており、これらの結果も合わせて報告する。

propolis, artepillin C, pungent compound

講演番号:2J15p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ J校舎15会場

牛乳における溶存酸素とアミノレダクトンの関係性

The relationship of dissolved oxygen and aminoreductone of heated milk

○勝野　眞也，井澤　登，島村 智子[1]，柏木　丈拡[1]，受田　浩之[1]
（雪印メグミルク㈱，[1]高知大・農）
○Shinya Katsuno, Noboru Izawa, Tomoko Shimamura[1], Takehiro Kashiwagi[1], Hiroyuki Ukeda[1]
(MEGMILK SNOW BRAND Co., Ltd., [1]Kochi Univ.)

【目的】メイラード反応の初期生成物であるアミノレダクトン（AR）は，牛乳において保存中におけるリボフラビンの光酸化を濃度依存的に抑制することが報告されている[1)]。これはAR が牛乳の品質保持に重要な役割を果たしていることを示唆している。一方，生乳の低温脱気処理により加熱殺菌前の溶存酸素濃度を低減させることにより，ＵＨＴ牛乳の風味が非脱気の牛乳より有意に優れていること，また，脱気牛乳は保存中のアルデヒド類の生成量が非脱気処理の80％まで抑制されることが報告されている[2)]。ARおよび酸素は牛乳の品質に影響を及ぼすことが報告されているが，ARと酸素との関係については検討されていない。そこで，牛乳におけるARと溶存酸素の関係性について検討した。

【方法】低温脱気装置によって溶存酸素濃度を0.28-1.48 ppmに調整した生乳をパイロットプラントで130℃，2秒加熱することにより調製した脱気牛乳と，溶存酸素濃度を調整せずに（9.54-10.6 ppm）加熱した非脱気牛乳のAR濃度を比較した。また，酸素とARの関係をより詳細に検討するために，溶存酸素を様々な濃度に調整した生乳をガラスバイアルに封入し，130℃で加熱した時の加熱前後の溶存酸素濃度，および加熱後のAR 濃度とガラクトース濃度を測定した。

【結果】パイロットプラントで調製した脱気牛乳のAR濃度は，非脱気牛乳のAR濃度よりも有意に高かった（p = 0.037）。ガラスバイアルを用いた検討において，加熱前の溶存酸素濃度が高い試料ほど加熱時の酸素の減少量が大きくなる傾向が認められた。また，加熱時の酸素の減少量が大きくなるほど牛乳のAR濃度は減少し，両者の間には直線性の有意な相関が認められた（p < 0.01）。一方で，ガラクトース濃度は酸素の減少量にかかわらずほぼ一定であった。加熱した牛乳のARとガラクトースの生成量との間には相関があることが報告されている[3)]。これらのことから，生乳の加熱により生成するAR量は一定であるが，溶存酸素量に依存して加熱時にその一部が分解していることが推定された。

以上の結果から，加熱前に生乳の溶存酸素濃度を低くすることにより加熱後の牛乳のAR濃度が高く保たれ，高く保持されたARが牛乳の品質保持や風味向上に寄与している可能性が示唆された。

1) V. Trang *et al.*: *International Dairy Journal*, **18**, 344(2008).
2) 池隅ら　：　日本畜産学会（2005）
3) V. Trang *et al.*: *International Journal of Dairy Technology*, **64**, 189(2011).

milk, aminoreductone, oxygen

講演番号：2J15p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ J校舎15会場

メイラード反応最終生成物メラノイジンのコク味への寄与

Contribution of melanoidins to kokumi taste

○安田 佳代[1]、松本 朋大[2]、渡辺 寛人[2]、早瀬 文孝[1]（明治大農・農化[1]、明治大農・生命科[2]）
○Kayo Yasuda, Tomohiro Matsumoto, Hirohito Watanabe, Fumitaka Hayase (Meiji Univ.)

【目的】食品の加工、貯蔵、調理の間に起こる成分間反応の１つにメイラード反応がある。この反応の最終生成物である褐色色素メラノイジン（MEL）は、醤油、味噌など褐変食品中の着色成分として重要な役割を有しているなど食品の2次機能（呈味・色調）の発現に深く関与している。近年メイラード反応により糖化されたペプチドがコク味に寄与することが報告されている[1]がMELの影響については明らかにされていない。そこで本研究では2次機能の中でも呈味に着目し、MELがコク味に与える影響を官能評価により統計学的に解析した。また分子間相互作用測定機器（BIACORE）を用い、MELと呈味成分との相互作用について検討した。さらに、コク味付与物質の受容にカルシウム感知受容体（CaSR）が関わることが報告されている[2]ことから、カルシウムイメージング法を用いMELがCaSRに及ぼす影響を検討した。
【方法】グルコース（2M）と各種アミノ酸（2M）（グリシン・グルタミン酸Na・アスパラギン酸Na）に炭酸水素ナトリウム（0.2M）を加え、それぞれ95℃油浴中で7時間還流した。得られた反応生成物を2週間透析後、その非透析性画分を凍結乾燥し、分子量14KDa以上のMEL（高分子量MEL）を得た。また、反応生成物を限外ろ過後、凍結乾燥を行い分子画分3～5KDaのMEL（低分子量MEL）を得た。官能評価・検定は3点識別試験法によって検知閾値を決定した。以下、MELを閾値以下の濃度で添加した。コク味については市販のブイヨンスープを用い、これにMELを添加した際の「味の強さ」と「持続性」を2点比較法を用いて評価し有意差検定を行った。また、コク味を付与することが報告されている還元型グルタチオン（GSH）[3]及び各種MELを0.01%添加したものをブイヨンスープに添加し官能評価を行いTukeyの多重比較にて有意差検定を行った。分子間相互作用について、BIACOREを用いMELとうま味物質（グルタミン酸Na、イノシン酸Na）の相互作用を測定した。さらにCaSR発現細胞に蛍光試薬fluo 4-AMを負荷しMEL・GSHを添加した際の細胞内カルシウム量の変化を観察した。
【結果】全てのMELはブイヨンスープの「味の強さ」及び「持続性」を有意に増強させた。さらに低分子量MELは高分子量MELに対し「味の強さ」及び「持続性」を有意に増強させた。これらのことからMELがコク味の付与に寄与することが統計学的に明らかとなった。BIACOREによる測定の結果、MELはうま味物質と相互作用を示さなかった。MELは細胞内のカルシウム濃度を有意に上昇させたが、その上昇はCaSRアンタゴニストNPS2143により抑制された。このことからMELのコク味への寄与の機構にCaSRが関与している可能性が示唆された。

[1] Ogasawara, M., et al.;*Food Chemistry*, **99**, 736~741 (2006).
[2] Ohsu, T., et al.; *The Journal of Biological Chemistry*, **285**(2), 1016~1022 (2010).
[3] Ueda, Y.,et al.; *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**(12), 1977~1980 (1997).

melanoidin, kokumi, taste

講演番号：2J15p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ J校舎15会場

3-deoxyxylosone由来メイラード反応生成物の同定

Identification of Maillard reaction products from 3-deoxyxylosone

○石渡　まどか[1]、臼井　照幸[1,2]、阿久津　貴大[1]、渡辺　寛人[3]、早瀬　文孝[1]
([1]明治大農・農化、[2]昭和学院短大・ヘルスケア栄養、[3]明治大農・生命科)
○Madoka Ishiwata[1], Teruyuki Usui[1,2], Takahiro Akutsu[1], Hirohito Watanabe[1], Fumitaka Hayase[1] ([1]Meiji Univ. , [2]Showagakuin Junior College)

【目的】メイラード反応は還元糖などのカルボニル化合物とアミノ酸などのアミノ化合物の非酵素的反応であり、食品中や生体内で起こることが知られている。α - ジカルボニル化合物である3-deoxyxylosone (3-DX)はメイラード反応における重要な中間体の一つである。しかし、3-DXが関与するメイラード反応についての知見はほとんど報告されていないのが現状である。最近、我々は3-DX－N$^{\alpha}$-acetyl-L-arginine (Ac-Arg)系から生成したPX2がN^{α}-acetyl-N^{δ}-[5-(2,3-dihydroxypropyl)-5-hydro-4-imidazolone-2-yl]-ornithineであると同定した。

本研究では3-DXとAc-Arg由来の未同定生成物と、3-DXとN$^{\alpha}$-acetyl-L-lysine (Ac-Lys)由来の未同定生成物の構造解析を試みた。

【方法】3-DX (50 mM)とAc-Arg (25 mM)またはAc-Lys (25 mM)を0.2Mリン酸緩衝液 (pH7.4)に溶解した。試料を37℃あるいは50℃で1、2、4、7、14日間インキュベートし、それぞれの反応混合物を逆相HPLCにて分析した。その後、反応混合物をSep-pak C18 Cartridgeにて脱塩処理後、逆相HPLCにて各主要反応生成物を単離・精製した。各生成物をUV-Vis、LC-Qtof-MS、NMRなどの機器分析に供し、構造解析を試みた。

【結果】3-DXとAc-Argの反応混合物からは既に同定されているPX2以外に、PX3とPX4が主要反応生成物として検出された。PX3とPX4はともに196 nmに吸収極大を有し、分子量328、組成式$C_{13}H_{20}N_4O_6$であった。またPX3・PX4以外にも分子量328、組成式$C_{13}H_{20}N_4O_6$、196 nm付近に吸収を有する3種の化合物が検出された。NMR測定によりPX3とPX4の両化合物はPX2 (Mw=330)の脱水素化した構造であると同定した。

3-DXとAc-Lysの反応混合物からはPX5とPX6が主要反応生成物として検出された。PX5は229 nmに吸収極大を有し、Ex 370 nm、Em 460 nmにおいて蛍光を有する、分子量550、組成式$C_{26}H_{38}O_9N_4$の架橋生成物であった。また、PX6は291 nmに吸収極大を有し、分子量266、組成式$C_{13}H_{18}O_4N_2$であった。NMR測定により、PX5は6,8-(5-acetylamino-5-carboxy-pentyl)-3,3a,8,8a-tetrahydro-3a-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-2H-furo[3',2':4,5]pyrrolo-[2,3-c]pyridinium であり、PX6はN^{α}-Acetyl-6-(2-formyl-1-pyrrolyl)-L-norleucineであると同定した。

Maillard reaction, 3-deoxyxylosone, Advanced end product

講演番号：2J15p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ J校舎15会場

グリセルアルデヒド修飾タンパク質の配列解析

Sequence analyses of glyceraldehyde-modified protein

○山岸　理、臼井　照幸[1]、増田　喜恵、渡辺　寛人[2]、早瀬　文孝（明治大農・農化、[1]昭和学院短大・ヘルスケア栄養、[2]明治大農・生命科）

○Tadashi Yamagishi, Teruyuki Usui[1], Kie Masuda, Hirohito Watanabe[2], Fumitaka Hayase (Meiji Univ., [1]Showagakuin Junior College, [2]Meiji Univ.)

【目的】カルボニル化合物はメイラード反応により、タンパク質のリシン残基、アルギニン残基等を修飾し、付加物の生成や、タンパク質の架橋、重合を引き起こす。メイラード反応によるタンパク質の構造の変化は、タンパク質の機能を著しく低下させる。食品中では、必須アミノ酸であるリシン残基の減少などをもたらし、生体内では動脈硬化や糖尿病性合併症の発症・進展に関与することが示唆されている。グリセルアルデヒドは代謝異常や糖の分解などで生成し、カルボニル化合物としてタンパク質を修飾する。グリセルアルデヒド由来のメイラード反応後期段階生成物（AGEs）として、リシン、アルギニン共存下で生成される主要な AGE である GLAP や MG-H1 が報告されている[１]。しかしながら、グリセルアルデヒドによるタンパク質のグリケーション機構についての知見は乏しい。本研究では、タンパク質としてリゾチーム、シトクロム c、リボヌクレアーゼ A を用い、グリセルアルデヒド修飾タンパク質におけるグリケーション生成物の解析と反応機構、配列解析によるアミノ酸残基の修飾部位について検討した。

【方法】グリセルアルデヒド（10 mM）とタンパク質（リゾチーム・シトクロムc・リボヌクレアーゼA、5 mg/ml）を0.2 Mリン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解し、37℃で所定時間（0時間から240時間）インキュベートし、継時的に採取した。反応溶液は脱塩および未反応グリセルアルデヒドを除くため純水中で3日間透析した。SDS-PAGEによりモノマー、ダイマー、トリマーバンドに分画後、ゲルを切り出しトリプシン消化した。これにより得られたペプチドをLC-MS/MS（LTQ Orbitrap）分析により解析を行った。

【結果】SDS-PAGEによる分析の結果、グリセルアルデヒドにより修飾されたタンパク質の多量体の経時的な増加を確認した。これは、グリセルアルデヒドがタンパク質において付加物の生成だけではなく、架橋、重合を引き起こしていることを明らかにした。LC-MS/MS分析の結果、リゾチームにおいては、アミノ酸配列のK33、K97、K116が修飾され、GLAPが生成されることが明らかとなった。また、同様にアルギニン残基においても検討し、MG-H1などの生成物を検出した。他のタンパク質においてもGLAPやMG-H1の存在部位を見出した。これらの結果から、グリセルアルデヒドにより、タンパク質中の特定のアミノ酸残基が修飾を受けていることを明らかとした。

[１]　T.Usui,K.Simohira,H.Watanabe,F.Hayase,：*Biofactors.*,21,391-394(2004).

Maillard reaction, glycation, glyceraldehyd

講演番号：2J15p21
講演日時、会場：3月23日17:59～ J校舎15会場

グアニジノ化合物によるグリセルアルデヒド由来グリケーション生成物の形成抑制

Inhibitory effects of guanidino compounds on formation of glyceraldehyde-derived glycation products

○木村　圭一、臼井　照幸[1]、渡辺　寛人[2]、早瀬　文孝（明治大農・農化、[1]昭和学院短期大・ヘルスケア栄養、[2]明治大農・生命科）
○Keiichi Kimura, Teruyuki Usui[1], Hirohito Watanabe[2], Fumitaka Hayase（Meiji Univ., [1]Showagakuin Junior Collage, [2]Meiji Univ. ）

【目的】グリセルアルデヒド（GLA）とクレアチンは、メイラード反応によってグリケーション後期段階生成物（AGEs）を生成する。このモデル系で生成する主要化合物が、GLA由来AGEsと比較してNRK-52E（ラット腎臓尿細管上皮株化細胞）の細胞増殖に対する影響について評価した。また、 AGEs形成やアミノ酸損傷度に対するグアニジノ化合物の影響について検討した。
【方法】1. GLAとクレアチンをN^{α}-アセチルリジン共存下で、リン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解し、37℃で7日間反応させた。反応溶液をセルロースカラムクロマトグラフィーにて分画後、主要生成物を逆相HPLCで単離し精製した。これらをNRK-52E細胞に添加し、24時間後にトリパンブルー排除法により細胞数を測定した。また、GLA修飾させたBSAと、クレアチン共存下でGLA修飾させたBSAを作製し、同様の実験を行った。2. GLAとグアニジノ化合物をBSAとともにリン酸緩衝液中でインキュベートした後、ゲル濾過クロマトグラフィーによりタンパク質画分と低分子画分に分画した。タンパク質画分を、6N HClで酸加水分解後、固相抽出（Sep-PakC18）に供し、GLA由来AGEsであるMG-H1、GLAP、Argpyrimidine、P4を逆相HPLCにより定量した。また、 PITCによるアミノ酸の誘導体化を行い、アミノ酸分析計にてリジン及びアルギニンの損傷率を測定した。低分子画分は逆相HPLC、LC-Qtof-MSで分析した。
【結果】GLAとクレアチン、N^{α}-アセチルリジンから得られる主要な5種の化合物であるCP0～CP4は、細胞数を減少させなかったことから、nontoxic AGEsであることが示唆された。また、GLA修飾BSAは、クレアチン共存下で作製したGLA修飾BSAと比較して有意に強く細胞増殖を抑制した。これは、クレアチンがGLAを捕捉してtoxic AGEsであるGLAPの形成を減少させたためであると考えられた。一方、9種のグアニジノ化合物共存下でGLA修飾させたBSAの場合、タンパク質画分中のAGEs形成の抑制が確認された。また、グアニジノ化合物の添加により、リジン及びアルギニンの損傷度に有意な軽減が認められた。さらに、低分子画分中に、imidazolinone骨格を有する化合物群を同定した。これら化合物は、グアニジノ化合物がGLAを捕捉することで生成した新規化合物であり、GLAによるタンパク質の修飾を抑制する上でグアニジノ化合物が重要な基質となりうることが示唆された。

glycation, Maillard reaction, guanidino compounds

講演番号:2J16a01
講演日時、会場:3月23日09:00～ J校舎16会場

ウシラクトフェリンに対する数種のマウスモノクローナル抗体の作製

Mouse monoclonal antibodies against bovine lactoferrin

○新本洋士，渡辺剛士，中村智代，川口剛，今井大樹，柳田由美，冨田信一（玉川大・農）
○Hiroshi Shinmoto, Koji Watanabe, Tomoyo Nakamura, Tsuyoshi Kawaguchi,
Taiki Imai, Yumi Yanagida, Shinichi Tomita (Tamagawa University)

【目的】抗体によるタンパク質の検出は，分子生物学，生化学，食品化学等，様々な分野で用いられている．このうち，生体内のシグナル伝達等に関係するタンパク質のウェスタンブロット解析においては，タンパク質の一次構造から合成したペプチドに対するポリクローナル抗体が用いられることが多い．このような抗体はタンパク質の一次構造を認識するため，タンパク質がどのような状態であっても一次構造が保たれていれば検出可能である．これに対して，タンパク質の立体構造を認識する抗体は，インタクトなタンパク質と変性したタンパク質とを識別することが可能であり，食品の加工中のタンパク質の状態を知る手がかりになる．

そこで本研究ではウシラクトフェリン(bLF)とピーナツアレルゲンタンパク質であるAra h1をモデルタンパク質として用い，インタクトなタンパク質と還元状態のタンパク質を識別するマウスモノクローナル抗体の取得を目的とした．

【方法】Balb/cマウスにアジュバントとともに抗原を免疫し，追加免疫後，脾臓細胞をマウスミエローマ細胞SP2/0とPEG法で細胞融合を行って選択培養し，ハイブリドーマを得た．ハイブリドーマは限界希釈法でクローニングを行った．bLFはインタクトなものと，還元カルボキシメチル化したもの(CMbLF)を用い，酵素免疫測定法(ELISA)およびウェスタンブロット解析を行った．

【結果および考察】細胞融合で得られた18クローンのハイブリドーマが分泌するマウス抗bLFモノクローナル抗体についてbLFに対する結合性を検討した．ウェスタンブロット解析の結果，ほとんどの抗bLFモノクローナル抗体はSDS-PAGEの試料調製時に2メルカプトエタノール(2ME)処理していないbLFとのみ反応し，2ME処理によってbLFに対する抗体の結合性は失われた．これらのモノクローナル抗体はELISAにおいてCMbLFには結合しなかった．

これに対して唯一クローン#10が分泌する抗bLFモノクローナル抗体は，ウェスタンブロット解析において2ME処理していないbLFには結合せず，2ME処理したbLFにのみ結合した．またクローン#10抗体はELISAにおいてインタクトなbLFにはほとんど結合せず，CMbLFに強く結合した．

さらにこれらの抗bLFモノクローナル抗体のヤギラクトフェリン(gLF)，およびヒトラクトフェリン(hLF)への結合性を検討した結果，一部の抗bLFモノクローナル抗体はgLFに結合し，bLFとgLFが共通のタンパク質分子中に抗体結合部位を持つことが明らかになった．

ピーナツアレルゲンタンパク質Ara h1を抗原として調製した数種のモノクローナル抗体においては，ウェスタンブロット解析においてAra h1を2ME処理してもしなくても，同程度の抗体の結合が見られた．このことから，Ara h1は2ME処理によっても抗体結合部位の構造が保たれるのに対し，bLFは2ME処理によって抗体結合部位の構造が大きく変化すると考えられた．

monoclonal antibody, lactoferrin, Ara h1

講演番号：2J16a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ J校舎16会場

Crystal structure of the major peanut allergen Ara h 1

○**Cerrone Cabanos[1], Hiroyuki Urabe[1], Mary Rose Tandang-Silvas[1], Taro Masuda[1], Reiko Urade[1], Shigeru Utsumi[1], Bunzo Mikami[b], and Nobuyuki Maruyama[1]**
([1]Laboratory of Food Quality Design and Development, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji, Kyoto, Japan, [2]Laboratory of Applied Structural Biology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

Ara h 1, a 7S globulin, is one of the three major allergens in peanut. Initially, we attempted to crystallize the mature Ara h 1 protein; however, due to the difficulty in obtaining crystals with good diffraction quality, the N-terminal extension and C-terminal flexible regions that can negatively affect diffraction were removed. The study thus focused on the Ara h 1 core region instead. Here, we present the crystal structure of the Ara h 1 core at a resolution of 2.43 Å. We also analyzed its thermal stability and compared its final structure against other 7S globulins. The Ara h 1 core has a thermal denaturation temperature of 88.3 °C and a structure that is comparable to other 7S globulins. Previously identified linear IgE epitopes were also mapped on the three-dimensional structure. Most linear epitopes were found in the extended loop domains and the coils between the N- and C-terminal modules, while others were found in the less accessible β-sheets of the C-terminal core β-barrel domain of each monomer. Most of these epitopes become either slightly or significantly buried upon trimer formation, implying that allergen digestion in the gut is required for these epitopes to be accessible to immunoglobulins. Our findings also suggest that the use of both whole allergens and partially degraded components should be seriously considered in the design of future diagnostic and immunotherapeutic strategies.

Keywords: peanut, food allergen, X-ray crystal structure

講演番号:2J16a03
講演日時、会場:3月23日09:22～ J校舎16会場

エビアレルゲンタンパクのメイラード反応とアレルゲン性変化

Change the allergenicity of prawn protein on Maillard reaction

〇金澤 圭二[1]、 Andeas L. Lopata[2]、 菰田 俊一[1] ([1]宮城大学、 [2]James Cook University)

〇Keiji kanazawa[1], Andreas L. Lopata[2], Toshikazu Komoda[1] ([1]Miyagi University, [2]James Cook University)

【目的】トロポミオシンは主要なアレルゲンタンパクであり、エビ･カニなどに含まれている。また、このタンパク質は耐熱性を持つため、一般的な加熱加工ではアレルゲン性を除去するのは困難とされている。そこで、我々は、高温条件下でタンパク質と還元糖が複合体を形成する反応(メイラード反応)を利用することにより、トロポミオシンのアレルゲン性を低下することができるか、検討することとした。さらに、長時間加熱を続けると、AGE(Advanced Glycation Endproducts)が生成することが知られているが、これがアレルゲン物質としてはたらく可能性が報告されているため、この反応におけるAGEの産生を評価することとした。

【方法】はじめに2種のエビ(ブラックタイガー、ブラウンタイガー)を100℃で20分間加熱し、粗タンパクを得た。この粗タンパクと2種の還元糖(グルコース、リボース)を60℃で加熱(メイラード反応)し、SDS-PAGE、ウェスタンブロット法、ELISA法により生成した複合体に対する抗体の結合能を評価した。AGEの産生は特異的抗体を用いたELISA法により評価した。

【結果】SDS-PAGEの結果、トロポミオシンのバンド(37kDa)が反応時間にともなって、高分子量側にシフトしていることが確認された。このことは、トロポミオシンが還元糖と加熱したことにより複合体を形成したことを示すものであった。ウェスタンブロット法による分析の結果からは糖を加えて加熱したサンプルでバンドの強度が次第に減少していることが示された。ELISA法の結果から糖を加えて加熱したサンプルではIC_{50}値は経時的に増加した。一方、糖を加えずに加熱したサンプルではIC_{50}値の変化はなかった。特にブラウンタイガーとリボースの組み合わせが、最も効果的に抗体との結合能を抑制することがしめされた。AGEの産生をELISA法により評価した結果からは、概ね7時間以上の加熱を行うと、CML等のAGEが増加することが示された。本研究から、メイラード反応によりトロポミオシンのアレルゲン性の低減化の可能性が示されるとともに、長時間の加熱によりAGEの産生する可能性が示唆された。

Tropomyosin, seafood allergy, Maillard reaction

講演番号：2J16a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ J校舎16会場

タンパク質工学的手法によるβ-ラクトグロブリン（BLG）の免疫原性の低減化

Reduced allergenicity of ß-lactoglobulin by protein engineering techniques

○遠藤 倫生、石井 ケイ慧、岩本 拓[1]、清水 誠[1]、戸塚 護[1]、服部 誠（東農工大院農・応生化、[1]東大院農生科・応生化）

○Michio Endo, Keisatoi Ishii, Taku Iwamoto[1], Makoto Shimizu[1], Mamoru Totsuka[1], Makoto Hattori (TAT, [1]UT)

【目的】β-ラクトグロブリン（BLG）は、必須アミノ酸を豊富に含み、乳化性、気泡性、ゲル化性などの機能特性を有する有用なタンパク質であるが、牛乳の主要なアレルゲンであることから、その利用が制限されている。そのため、BLGのアレルゲン性を低減化することが強く望まれている。我々はこれまで、タンパク質工学的手法を用いた糖鎖導入ならびに一アミノ酸置換により、BLGのB細胞抗原決定基およびT細胞抗原決定基の改変を行い、BLGの免疫原性低減化に関する知見を報告してきた。本研究では、B細胞抗原決定基とT細胞抗原決定基の双方を同時に改変し、より効果的な免疫原性低減化を達成するとともに、免疫原性低減化のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】設計した組換えBLG cDNAを、酵母発現ベクターであるpPICZαAに挿入し、ヒートショック法を用いて形質転換した酵母*P.pastoris*の発現分泌により、部位特異的糖鎖結合型BLG（D28N/P126A）を調製した。発現分泌されたBLG変異体は、イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。D28N/P126Aおよびアミノ酸置換を行っていないwtBLGをC57BL/6マウスに腹腔内免疫し、得られた抗血清の反応性を非競合ELISAにより解析した。

【結果】本研究で作製したBLG変異体（D28N/P126A）の免疫原性は、wtBLGと比較して有意に低下することが明らかになった。さらに、ピンペプチド法を用いたELISAによりD28N/P126Aのエピトープ解析を行ったところ、シグナルがほとんど消失していた。これは、糖鎖導入によりB細胞抗原決定基を遮蔽したこと、ならびに、一アミノ酸置換によりT細胞抗原決定基を改変したことによると考えられた。以上の結果から、本研究で用いた手法が、免疫原性の低減化において非常に効果的であると考えられた。

Beta-lactoglobulin , allergenicity, epitope

講演番号：2J16a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ J校舎16会場

タイトル　ε-ポリリシンとの複合体化によるβ-ラクトグロブリンの機能改変
Title　Functional improvement of β-lactoglobulin by conjugating with ε-polylysine.
○清水　麻美、好田　正、高橋　幸資、服部　誠（東京農工大院・農）
○Asami Shimizu, Tadashi Yoshida, Koji Takahashi, Makoto Hattori (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】β-ラクトグロブリン（BLG）は、必須アミノ酸を豊富に含み、乳化性、気泡性、ゲル化性などの機能特性を有する有用なタンパク質である。しかし、BLGは牛乳アレルギーの最も強力なアレルゲンであり、酸性条件および塩存在下で乳化性が低下するという問題点があるため、その機能を改変することには重要な意義がある。本研究では食品への応用を考慮して、食品加工に用いられる微生物由来トランスグルタミナーゼ（MTGase）により、BLGとε-ポリリシン（PL）を複合体化することにより、BLGの機能改変を試みた。
【方法】BLGとPLをpH7.0で48時間 MTGaseで反応させ、BLG-PL複合体を得た。アミノ酸分析により複合体の化学組成を調べた。BLGの重要な機能であるレチノール結合能は蛍光滴定法によって調べ、さらに、自然蛍光測定、抗BLGモノクローナル抗体を用いたELISAにより、複合体の詳細な構造解析を行った。複合体の乳化性（乳化活性および乳化安定性）は濁度法によって評価した。また、複合体を２系統のマウス（BALB/c、C57BL/6）に腹腔内投与して免疫し、得られた血清を非競合法ELISAに供して特異的抗体量を測定することで、複合体の免疫原性を評価した。さらに、ピンペプチドを用いたELISAによるB細胞エピトープの解析を行い、免疫原性の変化した部位を詳細に解析した。
【結果】MTGase反応により、BLG:PL=1:1.2（モル比）のBLG-PL複合体が得られた。複合体はネイティブBLGの約50%のレチノール結合能を維持していた。また、構造解析の結果から、複合体では、PLの結合により若干の構造変化が見られたものの、BLGの構造をほぼ維持していることが明らかとなった。乳化性の評価を行った結果、複合体では、BLGの乳化に不利な酸性条件下および塩存在下においても高い乳化性を持つことが明らかとなった。乳化性の改善は、親水性ならびにイオン交換能の付与により達成できたと考えられた。複合体の免疫原性については、BALB/c、C57BL/6いずれのマウスにおいても、BLG投与時と比較して複合体投与時は抗BLG抗体産生性が有意に低下していた。B細胞エピトープ解析の結果、抗複合体抗体においては、Asp33-Arg40に対するシグナルが低下していた。我々は、これまでに、タンパク質に非タンパク質成分を結合させて免疫原性を低下させるメカニズムのひとつがエピトープ部位の遮蔽によることを明らかにしており、この結果より、複合体におけるPLの結合部位はBLG分子中のGln35であることが示唆された。
　以上より、本研究の手法がBLGの乳化性の改善、免疫原性の低減化といった多面的な機能改変に有効であることが明らかとなった。

β-lactoglobulin, immunogenicity, emulsifying property

講演番号：2J16a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ J校舎16会場

米の低アレルゲン化に対する浸漬溶液および酵素処理の効果

Effect of soaking solution and enzymatic treatment on reduction in allergenicity of rice

○安田 果倫，神川 尚大，貝塚 千尋，中村 静佳[1]，深石 光男[1]，赤尾 真，熊谷 日登美
（日大・生資科・生化，[1]大塚薬品工業）
○Karin Yasuda, Takahiro Kamikawa, Chihiro Kaizuka, Shizuka Nakamura, Mitsuo Fukaishi, Makoto Akao, Hitomi Kumagai
(Dept. Chem. Life Sci., Nihon Univ., [1]Ohtsuka Chem. Indust. Co., Ltd)

【目的】近年，食物アレルギー患者数は年々増加の一途を辿り，大きな社会問題となりつつある。米アレルギー患者は，日本人の主食である米が摂取できないばかりでなく，小麦やトウモロコシなどの他の主要な穀物にもアレルギー症状を示すことが多い。また，穀類アレルギーは寛解しにくいという問題もある。これまでに，米アレルギー患者のために様々な低アレルゲン米が開発されているが，いずれも特殊な作業工程が必要なため，自分の嗜好に合った米を選べず，入手も困難である。当研究室では，炊飯時に酵素を添加する簡便な方法を用いて，米の主要アレルゲンであるグロブリンを分解し，低アレルゲン化を行ってきた。しかし，本法では，もう一つの主要アレルゲンであるアルブミンの分解が困難であり，また，この酵素処理した米には酵素が残存するため，匂いや色が悪いなどの問題点があった。そこで本研究では，これらの問題を解決するために，炊飯前に，アルブミンを溶出しやすい溶媒に浸漬し，酵素処理後，洗浄することにより，米の低アレルゲン化と嗜好性の改善を試みた。

【方法】まず，酵素処理条件の検討のため，生米を酵素溶液に一定時間40℃で浸漬し，１分間洗浄後，米からアルブミンおよび総タンパク質を抽出し，アレルゲンの分解の程度を評価した。次に，浸漬液の検討のため，各種緩衝液に生米を40℃で１時間浸漬し，アレルゲンタンパク質溶出の有無を調べた。これらの結果を踏まえ，アレルゲン溶出効果の高かった緩衝液に酵素を溶解し，一定時間40℃で浸漬し，１分間洗浄後，アレルゲン性を評価した。アレルゲンタンパク質の検出は，患者血清を用いたウェスタンブロットにより行った。また，緩衝液中で酵素処理後，洗浄し，炊飯した米飯の粘性・色・匂い・味を，未処理米のものと，官能検査により比較評価した。

【結果】酵素処理の結果，生米を１％パパイン溶液中で１時間反応させることにより，アレルゲンの分解が見られた。浸漬液中へのタンパク質の溶出に関しては，クエン酸ナトリウム緩衝液，リン酸ナトリウム緩衝液，炭酸水素ナトリウム緩衝液に浸漬することにより，米からのアレルゲンの顕著な溶出がみられた。これらの緩衝液にパパインを溶解し反応させた場合には，水に酵素を溶解させた場合よりも，さらに米のアレルゲン性が低下した。また，これらの緩衝液中で酵素処理を行い，１分間洗浄後，炊飯して得られた米飯の官能評価の結果，未処理米飯とほぼ同程度の食味となり，炊飯過程で酵素処理を行った場合よりも，嗜好特性が改善した。

reduction in rice allergenicity, soaking solution, enzymatic treatment

講演番号:2J16a07
講演日時、会場:3月23日10:16～ J校舎16会場

ラクトフェリン及びその活性ペプチドの抗菌活性を増強する乳タンパク質（MR15）の同定

Identification of milk-proteins (MR15) enhancing antimicrobial activity of bovine lactoferrin.

○村田 麻衣、若林 裕之、山内 恒治、樋田 知宏、岩附 慧二（森永乳業食基研）
○Mai Murata, Hiroyuki Wakabayashi, Koji Yamauchi, Tomohiro Toida, Keiji Iwatsuki (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【目的】ラクトフェリン（LF）は、幅広い抗菌・抗ウイルス活性を示す乳タンパク質である。LFの作用機序として、鉄のキレートによる静菌効果やLPSなどの菌の外膜成分との結合による膜傷害が考えられる。これまで、LFの抗菌活性を高める手法として、酵素分解による活性ペプチド(LFcin B) 生成の他、リゾチームや抗生物質との併用などの報告がある。本研究では、LFおよびLF酵素分解物の抗菌性を高める作用を示す乳タンパク質画分を分離・同定したので報告する。
【方法】１．目的タンパク質画分の精製：陽イオン交換樹脂を用いて、脱脂乳由来の乳タンパク質を吸着させ、0.2～1.7M NaClを用いて溶出を行った。得られた溶出画分から限外濾過膜を用いて、10～30 kDの目的タンパク質画分を精製した。２．抗菌活性増強効果の評価: a)LF（2 mg/ml）単独、および b)LF（2 mg/ml）＋精製したタンパク質画分（32 μg/ml）の存在下で大腸菌 K-12（10^6 cells/ml）を培養し、CFU測定による抗菌活性評価を行った。同様に、他のグラム陰性細菌・グラム陽性細菌・真菌を用いて、LFおよびLF酵素分解物に対するタンパク質画分の併用効果をMIC法にて検討した。３.目的タンパク質の分離と同定：目的タンパク質画分を二次元電気泳動にて分離し、分子量10～30 kDに得られたスポットを切り出した。トリプシン消化後、MALDI-TOF/MSによる質量分析を行い、MASCOT解析によりタンパク質の同定を試みた。さらに活性本体を調べるため、ゲル濾過カラムを用いて本タンパク質画分の構成成分を分画し、得られた各タンパク質のLFに対する併用効果を検討した。
【結果】陽イオン交換樹脂および限外濾過膜を用いて、脱脂乳より主として約15 kDの塩基性タンパク質画分を分離・精製した。本タンパク質画分を、LFに対して1.6%(w/w)添加混合したところ、培養後の大腸菌 K-12のCFUは、LF単独と比較して有意に低下した（$p<0.001$）。同様に、それ以外の菌についても、本画分の併用により、LFおよびLF酵素分解物のMICの低下が確認された。MALDI-TOF/MSによる質量分析の結果、本画分の構成タンパク質として、ウシRNase5、RNase4、Angiogenin-2あるいはその前駆体タンパク質のアミノ酸配列が同定された。さらに、単離した各タンパク質について評価した結果、LFとの併用による抗菌活性の増強効果が認められた。そのため、本画分をMilk-derived RNase around 15 kD (MR15)と命名した。

Milk-derived RNase,, Lactoferrin, antimicrobial activity

講演番号：2J16a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ J校舎16会場

イネ由来抗菌タンパク質の同定とヒト病原菌に対する抗菌活性の評価

Identification of antimicrobial protein from *Oryza sativa* and evaluation of its activity against human pathogenic bacteria

○落合 秋人[1,2]、原田 計[1]、柴田 一駿[2]、三ツ井 敏明[1,3]、田中 孝明[1,2]、谷口 正之[1,2]（[1]新潟大院・自然科学系、[2]新潟大・工、[3]新潟大・農）

○Akihito Ochiai[1,2], Kazuki Harada[1], Kazuma Shibata[2], Toshiaki Mitsui[1,3], Takaaki Tanaka[1,2], Masayuki Taniguchi[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Dept. Mat. Sci. Technol., Niigata Univ., [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Niigata Univ.)

【目的】歯周病(歯肉炎と歯周炎)は、歯周組織が炎症を起こす代表的な歯科疾患の一種であり、その予防法と治療法の開発が切望されている。一方で、生理活性を示す米中のタンパク質やペプチドに関する報告は少ない。本研究では、歯周病菌に対して抗菌活性を示す米タンパク質成分の探索と同定を行い、歯周病菌を主とする様々なヒト病原菌に対する抗菌活性（抗菌スペクトル）を評価した。

【方法】抗菌タンパク質の探索と同定を以下のように行った。イネ(*Oryza sativa*)精白米に10倍量の純水を加えて懸濁し、撹拌することによって米タンパク質抽出液を調製した。抽出液からの抗菌タンパク質の精製は、各種イオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィーなどを用いて行った。抗菌活性は、生菌に由来するATPの発光強度を化学発光法により測定することで評価し、被験菌として歯周病菌*Porphyromonas gingivalis* JCM 8525を用いた。抗菌タンパク質の同定は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI TOF/MS）を用いた。また、抗菌スペクトルの評価には、4株の*P. gingivalis*を含む9株のグラム陰性菌、3株のグラム陽性菌、および1株の真菌を使用した。

【結果】米タンパク質抽出画分は、約80 μg/mlのタンパク質濃度で10^5 cells/mLの*P. gingivalis*の増殖を完全に阻害した。この抗菌活性成分を、6段階のステップによりSDS-PAGEにおいて単一バンドになるまで精製を行った。MALDI TOF/MSを用いたPMF解析とMS/MS Ion Searchによる解析から、分子量47,769 Da（アミノ酸残基数428）を有するタンパク質であると同定した。この精製タンパク質の*P. gingivalis*に対する最小生育阻止濃度(MIC)は約100 pMであり、強い抗菌活性を示した。RiceXProデータベースによりmRNAの発現を検証したところ、本タンパク質はイネ種子胚において高い発現を示すことが推測された。また、抗菌スペクトルを評価した結果、他の3株の*P. gingivalis*に対するMICは200 pM – 10 nM程度であり、強い抗菌活性を示した。一方、他のヒト病原菌に対する抗菌活性は、現在検討中である。

antimicrobial protein, rice, *Porphyromonas gingivalis*

講演番号：2J16a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ J校舎16会場

ラクトパーオキシダーゼシステムを含有する凍結組成物の口腔内病原菌に対する抗菌活性および保存安定性

Antimicrobial activity of frozen liquid composition containing lactoperoxidase system against oral pathogens and its stability during storage.

○中野 学、新 光一郎、山内恒治、樋田知宏、岩附慧二、小川康一[1]、弘中祥司[2]（森永乳業食基研、[1]クリニコ、[2]昭和大・歯）

○Manabu Nakano, Kouichirou Shin, Koji Yamauchi, Tomohiro Toida, Keiji Iwatsuki, Koichi Ogawa[1], Shouji Hironaka[2] (Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [1]Clinico Co., Ltd., [2]Showa University School of Dentistry)

【目的】ラクトパーオキシダーゼ（LPO）は、乳汁、唾液、気道粘液などの外分泌液に含有される酵素であり、過酸化水素及びチオシアン酸イオンやヨウ化物イオンの共存下において、細菌、真菌、ウイルスなどに対して幅広い殺菌活性のある次亜チオシアン酸や次亜ヨウ素酸の生成を触媒する。我々は、ヨウ化物イオン源として昆布抽出物との組み合わせによるLPO抗菌系（LPOシステム）について、一昨年の本大会で報告している。一方、ヒトの口腔内には、齲蝕、歯周病、口臭などの口腔疾患・症状の原因となる細菌に加え、特に高齢者や要介護者に肺炎を引き起こす日和見菌が生息しており、それらの口腔内細菌を抑制するためにも口腔衛生は重要である。今回、口腔衛生品の一形態として、LPOシステムを含有する凍結組成物の抗菌活性とその安定性を検討した。

【方法】ウシLPO、グルコースオキシダーゼ、グルコース、昆布抽出物からなるLPOシステムを含有する粉末組成物を精製水に溶解し、液体組成物を調製した。この液体組成物を調製後直ちに冷凍し、凍結組成物を得た。供試菌株として、日和見菌であるメチシリン耐性*Staphylococcus aureus*（MRSA）及び*Candida albicans*、歯周病菌である*Fusobacterium nucleatum*を使用した。抗菌活性は、上記液体組成物又は凍結組成物の融解液に、供試菌株を含む菌液を約6.0 $\log_{10}$ CFU/mlとなるように添加、混合し、室温で5分間放置後、リン酸緩衝生理食塩水で段階的に希釈し、寒天培地を用いて生菌数を測定した。

【結果】液体組成物は、MRSA及び*C. albicans*を5分間のうちに検出限界以下にまで殺菌し、*F. nucleatum*に対しても殺菌活性を示した。この液体組成物は、グルコース濃度0.01～0.05%、弱酸性～中性付近の条件で殺菌活性を示し、増粘多糖類であるアルギン酸ナトリウムを添加しても同様の殺菌活性を示した。液体組成物は調整後4時間で抗菌活性がほぼ無くなったが、凍結組成物では調製直後の液体組成物と同等の活性を示した。さらに、凍結組成物は、3ヵ月間の冷凍保存後にもMRSAを5分間のうちに検出限界以下にまで殺菌した。以上の結果から、本凍結組成物は口腔内細菌に対する強い抗菌活性があり、保存性も良好であることが明らかとなり、口腔衛生品としての応用の可能性が示唆された。

Lactoperoxidase, glucose oxidase, antimicrobial activity

講演番号：2J16a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ J校舎16会場

カゼイン由来ペプチドのACEおよびDPP-4阻害活性検討

Analysis of ACE and DPP-4 inhibitory peptides derived from casein

○越智 大介、桜井 琢磨、山田 明男、樋田 知宏、岩附 慧二（森永乳業食基研）
○Daisuke Ochi, Takuma Sakurai, Akio Yamada, Tomohiro Toida, Keiji Iwatsuki (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【目的】乳由来の加水分解物の中には、ACE阻害活性を持つペプチドや、DPP-4阻害活性を持つペプチドが存在する事が知られている。これらのペプチドの摂取により、生活習慣病の予防・改善が期待される事からその利用について近年注目されている。そこで我々は、分解度の異なる数種のカゼイン加水分解物サンプルについて、ACEとDPP-4に対する阻害活性をそれぞれ調べ、その機能性を検討した。また、サンプルに含まれるペプチドを分画してACEおよびDPP-4阻害活性との関係を調べ、阻害活性に寄与する機能性ペプチドを探索した。
【方法】DPP-4阻害活性測定は、酵素にRecombinant Human DPPIV/CD26、基質にH-Gly-Pro-AMC (Biomol GmbH) を用いた。ACE阻害活性測定は、酵素にAngiotensin Converting Enzyme, from rabbit lung (SIGMA)、基質にAbz-FRK(Dnp)-Pを用いた。両酵素系とも以下の手順で実施した。96穴マイクロプレートの各ウェルに、水または各濃度の試験物質の水溶液を添加し、Tris-HCl (0.25M, pH 8.0) を20 µl添加して全量を80 µlに調製した。撹拌の後プレートを37℃のインキュベーターで約10分程度温め、DPP-4溶液10 µl と、基質溶液10 µlを添加し（全液量100 µl)、撹拌して反応を開始した。酵素の代わりに水を添加したウェルをコントロールとした。酵素反応の測定はマイクロプレートリーダーを用い、庫内温度を37℃に保った条件下で測定した（５分間隔、ex360nm/em460nm)。蛍光強度の経時的な増加が直線的な期間（反応開始から30分以内）の蛍光強度の値から阻害活性を算出した。さらに、阻害活性が高かったサンプルについて、逆相クロマトグラフィーで移動相にトリフルオロ酢酸を用いて分画し、各溶出フラクションの両酵素に対する阻害活性を同様に測定した。その結果で活性が高かったフラクションについては、移動相に蟻酸を用いて再度分画し、各フラクションの活性測定を行った後、LC/MSにより含有しているペプチドの同定を行った。
【結果】カゼイン加水分解物サンプルについて、ACEとDPP-4の両方に強い阻害活性を示すものがあり、そのIC$_{50}$値は、ACEが80 µg/ml、DPP-4が235 µg/mlだった。このサンプルを分画した各フラクションの阻害活性パターンは、ACE阻害とDPP-4阻害で異なるものの、そのピークの一部は重複していた。各活性フラクションに含まれるペプチドについて再分画を経て同定した後、さらに合成ペプチドにより阻害活性を確認したところ、フラクションと同様に阻害活性を示すことが分かった。以上から、カゼイン加水分解物には、混合物としてACEおよびDPP-4阻害活性の両方を示すものがあり、両活性についてトリペプチドMet-Lys-Pro (MKP) 等の関与成分の存在も確認されたことから、血圧・血糖値改善への寄与が期待できる可能性が示唆された。

angiotensin converting enzyme, DPP-4, MKP

講演番号:2J16a11
講演日時、会場:3月23日11:10～ J校舎16会場

クマモリシンによる魚鱗の分解とその分解産物のDPP-IV阻害活性

Degradation of fish scale by kumamolisin and DPP-IV inhibitory activity of its hydrolysate.

○尾山廣、井上直樹[1]、小泉聖子[1]、杉原富人[1]、居場嘉教、芳本忠（摂南大・理工、[1]新田ゼラチン・ペプチド開発部）

○Hiroshi Oyama, Naoki Inoue[1], Seiko Koizumi[1], Fumihito Sugihara[1], Yoshinori Iba, Tadashi Yoshimoto (Setsunan Univ., [1]Nitta Gelatin Inc.)

【目的】ジペプチジルペプチダーゼ-IV(DPP-IV)が、インスリン分泌を促進するホルモン、インクレチンを分解することに基づき、DPP-IV阻害剤が２型糖尿病治療薬として開発されてきた。食用素材由来のDPP-IV阻害物質は日常的に摂取しても安全なことから、カゼインペプチド、大豆ペプチド、コラーゲンペプチドなどが注目されている。我々は、高温、酸性条件下で強力なコラーゲン分解活性を持つクマモリシン(KSCP)の用途開発を目的に、KSCPによる魚鱗の分解と、その分解産物のDPP-IV阻害活性を調べた。

【方法】KSCPは、大腸菌で発現させた組換え酵素を用いた。魚鱗(非脱灰魚鱗)または脱灰魚鱗約100 mgを4 mLの50 mM Acetate buffer, pH2.6に懸濁し、KSCP(終濃度0～50μg/ml)を加えて60℃、150 rpm、３時間の条件で反応を行った。酵素分解後の試料溶液に100 mM Tris-base, pH 10.6を4 ml添加し、遠心分離で未分解の魚鱗を除去した。DPP-IV阻害活性は、ヒト由来の酵素を用いて、Gly-Pro-βNAを基質に測定した。一方、分解産物の分子量分布は、酵素分解後の試料溶液を99℃の沸騰水中に10分間放置したものをTSKgel-G2000SWXLのゲルろ過カラムクロマトグラフィー(GPC)で分析した。また、特定ペプチドの濃度はLC-MS/MSで定量した。

【結果】KSCPは、非脱灰及び脱灰魚鱗に作用し、このうち脱灰魚鱗を良く分解した。酵素分解後の上清のDPP-IV阻害活性は、非脱灰より脱灰魚鱗の試料溶液が強く、また、酵素濃度に依存して阻害活性も強くなることから、KSCPの分解によりDPP-IV阻害物質が産生されることが示唆された。次に、試料溶液のタンパク質濃度が0.5%となるように調整したものをゲルろ過用の試料とし、エタノール沈殿処理したものをLC-MS/MS用の試料とした。酵素濃度が高くなると、非脱灰及び脱灰魚鱗の試料溶液の分子量ピークは低分子側に移動したが、アミノ酸、ジ・トリペプチド領域のピークが小さいことから、KSCPは魚鱗コラーゲンを10～30残基のペプチド断片に分解することが示唆された。また、試料溶液に含まれる特定ペプチドの濃度は、非脱灰より脱灰魚鱗の方が全般的に高く、Hyp-GlyやPro-Alaが高濃度であった。

collagen, peptide, diabetes

講演番号:2J16a12
講演日時、会場:3月23日11:21～ J校舎16会場

Brie Cheese 分離菌 GG66A 株由来 Glutamyl aminopeptidase の精製と性質

Purification and characterization of Glutamyl aminopeptidase from bacteria GG66A isolated from Brie Cheese

○伊藤淳雄、前橋健二、山里一英、柏木豊（東農大院・醸造）
○ Sunao Itoh, Kenji Maehashi, Kazuhide Yamasato, Yutaka Kashiwagi (Grad. Sch. Fermentation Sci. Technol., Tokyo Univ. Agriculture)

【目的】醤油、味噌等の旨味を増強するためには耐塩性 Glutamyl aminopeptidase[EC 3.4.11.7]の利用が考えられる。我々は食品試料から、耐塩性 Glutamyl aminopeptidase を生産する細菌の検索を行った。このうち Brie Cheese から分離された細菌 GG66A 株を、合成ジペプチド Glu-Glu を炭素源として培養したところ、培地中のグルタミン酸量が増加することを確認した。このため、本菌株は Glu-Glu を分解し、グルタミン酸を遊離する酵素である Glutamyl aminopeptidase を生産することが示唆された。そこで本研究では GG66A 株が生産する Glutamyl aminopeptidase の精製と性質について検討した。

【方法・結果】GG66A 株は 8%食塩添加の培地で最適な生育を示し、Glu-Glu により培養液中に酵素生産が誘導されるが、L-グルタミン酸を炭素源としても酵素の生産が可能であった。本酵素は培養上清より DEAE-Sepharose FF、Toyopearl PPG-600M 及び Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィーによって電気泳動的に単一に精製され、SDS-PAGE により分子量 71.4 kDa の単量体と推定された。本酵素は食塩無添加では Glu-Glu 分解活性を示さず、3%食塩存在下で最大活性を示した。また、本酵素は Glu-Glu を加水分解するが、合成基質 Glu-pNA、Glu-2NA や Asp-Glu の分解は認められず、Glu-Glu に対する基質特異性が極めて高い酵素であった。

Glutamyl aminopeptidase, Brie Cheese, halophilic bacteria

講演番号：2J16a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ J校舎16会場

顆粒結合性デンプン合成酵素のウェスタンブロッティング検出及び穀物粳性検定における応用
Western blotting detection of granule-bond starch synthase I and its application in examining the nonglutinous cereals

○郎　剛華、鍵屋　ゆかり、橘田　和美（農研機構　食品総合研究所）
○Gang-hua Lang, Yukari Kagiya, Kazumi Kitta (National Food Research Institute)

【目的】Granule-bond starch synthase I (GBSSI), also called waxy protein, is responsible for the production of amylose in grain endosperm and pollen of cereals. This protein has been reported to be recognized by serum IgE of patients who show hypersensitive reaction to rice ingestion. In order to compare the content of GBSSI in grains between rice cultivars, polyclonal antibodies were prepared and a Western blotting analysis method was developed.
【方法】Recombinant GBSSI was prepared using an *E. Coli* expression system. Polyclonal antibodies were raised by immunizing rabbits with the recombinant GBSSI. Salt-soluble and salt-insoluble proteins were extracted from cereal grains and commercial rice flour, and the presence of GBSSI was analyzed with the Western blotting method.
【結果】The antibodies immunoreacted with rice GBSSI and its homologous proteins from other cereals. Although GBSSI had been reported to be included in salt-insoluble protein fraction, in the present study, GBSSI was detected in both the salt-soluble and the salt-insoluble protein fractions of various cereal grains by extracting with Lysing Matrix D. GBSSI was found to be mainly located in the inner fractions of rice grains separated by grain milling. In addition, since GBSSI, the waxy protein, is only presented in nonglutinous cereals, the immune-detection method was suggested to be another approach to discern the glutinous and nonglutinous cultivars of cereals.

Granule-bond starch synthase I, Western blotting, nonglutinous rice

講演番号：2J16a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ J校舎16会場

米糠タンパク質の構造と機能性に対する加熱処理の影響

Effects of heat treatment on the structure and function of rice bran protein

○関璟韜、虎谷康平、高井龍之介、永沼孝子、小川智久、村本光二、毛利哲[1]、藤井智幸[2]、Hyun Chi[3]、Seong-Jun Cho[3]（東北大院・生命、[1]宮城県産技総セ、[2]東北大院農、[3]CJ Foods R&D）

○Jingtao Guan, Kohei Toraya, Ryunosuke Takai, Takako Naganuma, Tomohisa Ogawa, Koji Muramoto, Satoshi Mori[1], Tomoyuki Fujii[2], Hyun Chi[3], Seong-Jun Cho[3] (Tohokudai, [1]Miyagiken, [2]Tohokudai, [3]CJ)

【目的】精米によって副生する糠にはタンパク質が12～15%含まれるが、脂質や繊維質、フィチン酸の含有量も高く、これらがタンパク質の高純度化の妨げとなっている。さらにタンパク質自体の溶解性も大豆タンパク質や乳清タンパク質などに比べて低いため、米糠タンパク質は十分に利用されていない。本研究では、脱脂米糠から調製した米糠タンパク質、およびその構成タンパク質を多様な条件下で加熱処理して高次構造の変化を調べるとともに、溶解性などの機能性への影響を検討した。

【方法】日本産米ヒトメボレの糠をヘキサンで脱脂後、食塩濃度とpHを変える段階的抽出法によって、未分画タンパク質、アルブミン、グロブリン、グルテリン、プロラミンに分画調製した。また、中国産米から製造した米糠タンパク質RiPro80 (CJ)も同じ方法を用いて分画を行った。各タンパク質の溶解性をpH、食塩濃度、温度を変えて測定した。これらの条件で処理したタンパク質の高次構造の変化をフーリエ変換赤外分光スペクトル(FT-IR)、円二色性(CD)、および示差走査熱量計(DSC)を用いて調べた。また、起泡性や乳化性などの機能性に対する加熱処理の影響を検討した。

【結果】段階的抽出でヒトメボレ脱脂米糠100 gからアルブミンとグロブリンが約3 gずつ得られ、グルテリンとプロラミンの収量は1 g以下であった。RiPro80を同じ方法で分画するとアルブミンが約13 g得られ、グロブリンは約1 gであった。未分画タンパク質の溶解性は、pH8以上のアルカリ条件下で増加し、同時に加温することによって溶解性が向上した。一方、食塩を添加しても溶解性は増加しなかった。FT-IRで求めたRiPro80可溶画分不溶画分のα-ヘリックスとβ-シートは、それぞれ27%と26%、13%と40%であった。80℃で30分間加温しても、これらの数値には変化はみられなかった。CDスペクトルにおいても同様な結果が得られ、120℃での加熱後にも立体構造が依然保持されていることが明らかになった。同試料のDSCで求めた吸熱ピーク温度(変性温度)は95.8℃であった。加熱処理していないヒトメボレ米糠未分画タンパク質とRiPro80では、それぞれ90.9℃と93.1℃にピーク温度が観察され、加熱処理によりピーク温度が上昇することが明らかになった。さらに未分画タンパク質をアルカリ条件で加熱処理したり、アセトンやエタノールで抽出することによってもピーク温度の上昇がみられた。

以上の結果から、米糠タンパク質は、幅広い範囲のpH条件での加熱処理に対しても安定な高次構造を有しており、このことが特異な溶解性を示す理由のひとつであると考えられる。

Rice bran , rice protein, solubility

講演番号：2J16a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ J校舎16会場

タンパク質とポリマーに結合したカルボキシル基との相互作用に及ぼすpHの影響
- カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂によるタンパク質の脱アミド化に関連して -

Effect of pH on interaction between protein and carboxyl group bound to polymers
- with relevance to protein deamidation by carboxylated cation-exchange resins -

○中西　良博，清水　詩織，伊地知　南，赤尾　真，熊谷　仁[1]，熊谷　日登美
（日大・生資科・生化，[1]共立女大・家政・食物栄養）
○Yoshihiro Nakanishi, Shiori Shimizu, Minami Ijichi, Makoto Akao, Hitoshi Kumagai[1], Hitomi Kumagai
(Dept. Chem. Life Sci., Nihon Univ., [1]Dept. Food Nutr., Kyoritsu Women's Univ.)

【目的】我々は，カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂を用いてペプチド結合の加水分解を起こさずに食品タンパク質の脱アミド化を行う方法を開発し，本手法を用いて，いくつかの食品タンパク質に新たな機能の付与を行ってきた。しかしながら，本法における脱アミド化反応条件については未だ十分に解明されていない。この脱アミド化最適条件が明らかになれば，本法を他の食品タンパク質に広く用いるために有用である。そこで，本研究では，カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂によるタンパク質脱アミド化最適条件の確立のため，pH の異なる反応溶媒に溶解した種々のタンパク質を陽イオン交換樹脂と混合し，pH が脱アミド化に及ぼす影響について検討した。また，分子間相互作用解析装置（Biacore）を用いて，センサーチップ上のカルボキシル基とタンパク質中のアミド基との相互作用について解析を行った。
【方法】試料として，大豆 7S グロブリン，大豆 11S グロブリンを用い，リン酸緩衝液（pH 3.0～10.0）に溶解後，カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂と混合し 6 時間撹拌した。樹脂を濾別し除去後，得られたタンパク質の脱アミド率を測定した。一方，分子間相互作用によるポリマー上のカルボキシル基とタンパク質中のアミド基との相互作用の検討に関しては，試料として，大豆 7S グロブリン，大豆 11S グロブリン，牛血清アルブミン，リゾチーム，ヘモグロビン，トリプシノーゲン，β-ラクトグロブリンを用いた。これらをリン酸緩衝液（pH 3.0～10.0）に溶解したものをアナライトとして流し，タンパク質中のアミド基がセンサーチップ上のカルボキシル基と相互作用した際の結合強度を比較した。
【結果】大豆7S グロブリンはpH 6.0で，大豆11S グロブリンはpH 7.4で最も脱アミド化された。また，センサーチップ上のカルボキシル基とタンパク質のアミド基との相互作用の検討では，大豆11S グロブリン，牛血清アルブミン，トリプシノーゲン，β-ラクトグロブリンは，いずれのpHにおいても結合強度は弱かった。一方，大豆7S グロブリンとヘモグロビンはpH 6.0において，また，リゾチームはpH 6.0以上で高い結合強度を示した。

deamidation, protein, carboxyl group

講演番号:2J16p02
講演日時、会場:3月23日14:00～ J校舎16会場

タイトル 味覚修飾タンパク質ネオクリンのシステインバリアント作製とその機能解析

Title Construction and functional characterization of cysteine variant of neoculin, a taste-modifying protein.

○金田 康平、中島 健一朗、小泉 太一、朝倉 富子、阿部 啓子、三坂 巧（東大院農生科・応生化）

○Kohei Kaneda, Ken-ichiro Nakajima, Taichi Koizumi, Tomiko Asakura, Keiko Abe, Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【目的】ネオクリンはマレーシア原産の植物であるクルクリゴの果実に含まれるタンパク質である。このタンパク質はそれ自身弱い甘味を持つうえに、一度口に含んだ後、酸を味わうと強い甘味を呈する味覚修飾活性を持つ。ネオクリンは酸性サブユニット(NAS)と塩基性サブユニット(NBS)がジスルフィド結合で架橋されたヘテロダイマーで、大腸菌発現系を用いて活性を有するネオクリンならびにその変異体タンパク質を得ることができる。これまでにNBSの11番目に位置するヒスチジン残基への変異導入が、甘味活性に大きな影響を与えることが明らかにされている。その残基をアラニンに置換した変異体NAS+NBS(H11A)はpHに関わらず強い甘味を呈した一方、チロシンに置換した変異体NAS+NBS(H11Y)は味覚修飾活性のpH依存性が酸性寄りにシフトし、それ自身の甘味は失われた。ネオクリンにシステイン残基を導入した変異体は、側鎖のチオール基を介して様々な修飾を導入することが可能になる。この変異体に対して蛍光物質や巨大分子などの修飾を試みることによって、ネオクリンの甘味活性および味覚修飾活性に関する構造的な知見を得ることを目的に研究を実施した。

【方法・結果】大腸菌発現系では各サブユニット(NAS,NBS)を別々に生産し、これらをリフォールディングする事によってネオクリンのヘテロダイマーを形成する。NBSの11番目に位置するヒスチジンをシステインに置換した変異体NAS＋NBS(H11C)に関して同様の手法で二量体を作製することに成功した。ヒト甘味受容体発現細胞を用いた評価系においてNAS+NBS(H11C)は同じ残基をアラニンに変えた変異体NAS+NBS(H11A)と同様、pHに関わらず強い甘味を呈することが明らかになった。

本法ではリフォールディング時に酸化型・還元型グルタチオンを用いているので、導入されたシステイン残基にグルタチオンがジスルフィド結合を介して結合していることが予想された。そこで抗グルタチオン抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、精製変異体タンパク質におけるグルタチオンの存在が確認された。今後システイン残基に修飾基を導入する必要があるので、ネオクリンサブユニット間のジスルフィド結合を維持したまま、グルタチオンをシステイン残基から解離させる条件を検討する予定である。

本研究は生研センター異分野融合研究事業の一環として行われたものである。

neoculin,taste-modifying,cysteine

講演番号：2J16p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ J校舎16会場

味覚修飾タンパク質ネオクリンにおけるpH依存的構造変化のNMRによる検出

NMR analysis of a pH-dependent structural changes in taste-modifying protein neoculin

○小泉太一、寺田透[1]、中島健一朗、小島正樹[2]、金田康平、朝倉富子、阿部啓子、三坂巧（東大院農生科・応生化、[1]東大院農生科・アグリバイオ、[2]東京薬科大・生命科学部）

○Taichi Koizumi, Tohru Terada[1], Ken-ichiro Nakajima, Masaki Kojima[2], Kohei Kaneda, Tomiko Asakura, Keiko Abe, Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]Tokyo Univ. Pharm. Life. Sci.)

【目的】ネオクリンはマレーシア産の食用果実クルクリゴより発見された甘味タンパク質で、それ自身が甘味を呈するだけでなく、酸味を甘味に変換する味覚修飾活性を持つ。これはpH低下によりタンパク質の甘味が増強するためであるが、その構造学的メカニズムは十分に解明されていない。これまでに我々の研究室では、中性pHでのX線結晶構造解析とそれをもとにした分子動力学的シミュレーションを行い、ネオクリン分子は酸性pHで立体構造が変化するという仮説を提唱した。本研究では、NMRを用いてpH依存的なネオクリン分子の立体構造変化を解明することを目指した。

【方法】ネオクリンは113残基の酸性サブユニットと114残基の塩基性サブユニットが結合したヘテロ2量体である。このため、一方のサブユニットのみを安定同位体標識したネオクリンを、大腸菌を用いて発現・精製し、NMRを測定した。pH3において主鎖の化学シフトを帰属した後、pH3～7までの各pHにおいて^{1}H-^{15}N相関スペクトルを測定し、pH依存的な化学シフト変化を解析した。また我々の研究室において、味覚修飾活性を失い酸が存在しなくても強い甘味を呈する変異体が作製されている。この変異体についても同様のNMR測定を行い、その結果を野生型と比較した。

【結果】野生型ネオクリンについてpH3～7の範囲で^{1}H-^{15}N相関スペクトルの化学シフト変化を解析することにより、pH変化によって化学シフトが徐々に変化するアミノ酸残基を明らかにした。これよりネオクリン分子のpH依存的な構造変化を網羅的に捉えることができた。またpH非依存的に強い甘味を呈する変異体についても、pH3～7の範囲で^{1}H-^{15}N相関スペクトルの化学シフト変化を解析した。変異体では、pH変化によって化学シフトの変化するアミノ酸残基のうち特に2残基において、野生型に比べて化学シフト変化量が減少した。したがってこれらの残基がネオクリンの味覚修飾活性に関与していることが強く示唆された。

本研究は生研センター異分野融合研究事業の一環として行われたものである。

sweet, taste-modifying protein, NMR

講演番号：2J16p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ J校舎16会場

ヒト甘味受容体と甘味タンパク質の間における直接相互作用のキネティクス解析

Kinetics analysis of direct interaction between human sweet taste receptor and sweet protein using surface plasmon resonance

○尹　滔文、三坂　巧（東大院農生科・応生化）
○Touman WAN, Takumi MISAKA（Dept.Appl. Biol. Chem., the Univ. Tokyo）

【目的】ヒト甘味受容体（hT1R2/hT1R3）は構造の異なる多様な甘味物質を受容する。受容体機能解析によりいくつかの甘味物質の相互作用部位が同定されており、特に甘味タンパク質については受容体の細胞外領域が活性化に必要であることが示されている。一方甘味タンパク質は種類によって味の持続性が異なる。持続性の長さは、甘味受容体と甘味タンパク質との相互作用の時間に一部由来すると考えられる。本研究は、ヒト甘味受容体と甘味タンパク質との直接的な相互作用を検出することを試みた。更にその相互作用のキネティクス解析を行い、官能試験で得られた持続性のデータと比較を行った。
【方法】表面プラズモン共鳴法（SPR法）とは、センサーチップ上に固定化した物質と、溶液中の他の物質との直接相互作用を、チップ表面のリアルタイムの重量変化として検出する方法である。具体的には、甘味タンパク質をセンサーチップ上へ固定化し、hT1R細胞外領域のリコンビナントタンパク質溶液を用いて相互作用を測定した。得られたセンサーグラムから結合速度定数k_a・解離速度定数k_d・解離定数K_Dなどの速度パラメーターを求めた。
【結果】hT1Rサブユニットタンパク質の濃度を変化させると、検出される質量増加がその濃度依存的に変化したことから、甘味受容体サブユニットと甘味タンパク質との相互作用が認められたと判断した。また、この現象はhT1R2・hT1R3の両方のサブユニットでも認められたので、甘味タンパク質の受容は、それぞれのサブユニットとの直接的な相互作用が関与する可能性が示唆された。更に、キネティクス解析の結果、官能試験で持続時間が長いとされる味覚修飾タンパク質ネオクリンと受容体との解離速度定数は、他の甘味タンパク質よりも小さかったことから、受容体との相互作用時間がより長いと示唆された。

本研究は生研センター異分野融合研究事業の一環として行われたものである。

taste, sweet protein, surface plasmon resonance

講演番号:2J16p05
講演日時、会場:3月23日14:33～ J校舎16会場

点変異甘味受容体が甘味タンパク質ソーマチンとの相互作用に与える影響

Effects of point mutation at human sweet receptors on the interactions with a sweet-tasting protein, thaumatin

○田口 若奈[1], 太田 圭介[2], 佐野 文音[3], 桝田 哲哉[1,4], 北畠 直文[5], 谷 史人[1,4]([1]京大院・農・食品生物,[2]京大ア資セ,[3]京大・農・食品生物,[4]京大院・地球環境,[5]ノートルダム清心女大)

○Wakana Taguchi[1], Keisuke Ohta[2], Ayane Sano[3], Tetsuya Masuda[1,4], Naofumi Kitabatake[5], Fumito Tani[1,4] ([1]GSA Kyoto Univ., [2]CAAS Kyoto Univ., [3]FA Kyoto Univ., [4]GSGES Kyoto Univ., [5]Notre Dame Seishin Univ.)

【目的】　甘味タンパク質であるソーマチンは、西アフリカ原産植物の果実の仮種皮に存在している等電点が塩基性であるタンパク質である。ソーマチンのヒトの甘味閾値は50 nMであり非常に強い甘味を呈する一方で、マウスはソーマチンの甘味を感知できない。甘味受容体はGタンパク質共役型受容体であるT1R2とT1R3のヘテロ二量体であり、それぞれ大きな細胞外N末端領域(NTD)、膜貫通領域(TMD)、それらをつなぐシステインリッチドメイン(CRD)からなっている。我々は、これまでヒト型、マウス型T1R s を用いて、ヒト - マウスキメラ受容体を作成し、ソーマチンの応答にはヒト型T1R3が必須であり、さらにその中でもヒト型T1R3内のCRD領域がソーマチンとの応答に不可欠であることを明らかにしている(1)。本研究では、この応答に必須であるCRD内のアミノ酸残基の同定を目的とした。

【方法】

ヒト型T1R3(hT1R3)変異体の作製　ヒトとマウスのCRD領域のアミノ酸配列の比較を行ったところ、双方で65塩基中16アミノ酸残基が異なっていた。そこで、この16 アミノ酸残基に着目し、部位特異的変異により点変異体(ヒト→マウス)を作製した。

HEK293細胞を用いた T1R2-T1R3の発現　キメラGタンパク質（$G_{\alpha 16_{gust44}}$）を安定発現しているHEK293細胞に、 ヒトT1R2とヒトT1R3もしくは（ヒト→マウス）T1R3点変異体を、リポフェクタミン2000を用いて一過的に発現させ、甘味物質(スクラロース、アスパルテーム、サッカリン、ソーマチン)との応答を観察した。受容体の応答は、細胞内へのカルシウム動員による蛍光強度変化(励起波長490 nm, 蛍光波長514 nm)⊿F/Fを指標に行った。

⊿F/F =(Fmax-F_0)/ F_0(F_0:リガンド添加前の蛍光値、Fmax:リガンド添加後の最大蛍光値)

【結果】　ヒト型T1R3のCRD領域の540番目のフェニルアラニン残基をプロリンへ置換したF540P変異体では、ソーマチンに対する応答は変化が観察されなかった。しかしながら、537番目のアラニン残基をスレオニン残基へ置換したA537T変異体では、ソーマチンに対する応答は観察されなかった。現在、他のCRD領域のヒト→マウス点変異体について検討を行っている。

Ohta *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2011) **406**, 435-438.

Thaumatin, sweet receptors, sweet-tasting protein

講演番号：2J16p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ J校舎16会場

高分解能X線結晶構造解析による甘味タンパク質ソーマチンの甘味発現機構の解明

Studies on the sweetness determinants in thaumatin by x-ray crystallographic analysis at atomic resolution

○桝田 哲哉[1,2]、太田 圭介[3]、三上 文三[4]、北畠 直文[5]、谷 史人[1,2]（[1]京大院・農・食品生物、[2]京大院・地球環、[3]京大ア資セ、[4]京大院・農・応用生命、[5]ノートルダム清心女大）

○Tetsuya Masuda[1,2], Keisuke Ohta[3], Bunzo Mikami[4], Naofumi Kitabatake[5], Fumito Tani[1,2] ([1]GSA Kyoto Univ., [2]GSGES Kyoto Univ., [3]CAAS Kyoto Univ., [4]GSA Kyoto Univ., [5]Notre Dame Seishin Univ.)

【目的】タンパク質の塩基性度の違いがタンパク質の呈味性に影響を与えることをこれまで報告してきた（１）。甘味タンパク質ソーマチンも塩基性タンパク質であり、官能検査およびヒト甘味受容体発現細胞を用いた実験の結果からソーマチンのクレフト面に存在する複数の塩基性アミノ酸残基が甘味発現に寄与することを明らかにしている（２，３）。しかしながら、ソーマチンの酸性アミノ酸残基が甘味発現に寄与するか否かについての知見はほとんどない。そこで本研究では、ソーマチンのクレフト部位に存在する酸性アミノ酸残基の部位特異変異体を作製し甘味発現に与える影響を検討した。また甘味に影響を与えた変異体の高分解能X線結晶構造解析を試み、ソーマチンの甘味発現機構に係わる構造的要因の詳細を明らかにすることを目的とした。

【方法】ソーマチン変異体は*Pichia pastoris* にて作製し、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにて精製した。精製後、甘味閾値に影響を与えた変異体について、ロッシェル塩を用いた蒸気拡散法にて結晶を作成した。予備実験において高分解能構造解析に適した結晶を選別し、結晶を凍結した。データ収集は大型放射光施設 SPring-8 にて行い、R-AXIS Vを用い回折データを取得した。1.1 Åのリコンビナントソーマチンの構造（PDB code 3AL7, (4)）を用いて分子置換を行い、初期モデルを構築した。Cootにてモデル構造の修正を行い、精密化はSHELXLにて行った。

【結果】酸性アミノ酸残基変異体の多くは甘味発現に寄与しなかったが、特定の酸性アミノ酸残基に変異を導入すると甘味閾値が減少、すなわち甘味が強くなった変異体の取得に成功した。甘味に影響を与えた変異体について結晶化を進め、SPring-8にて分解能 0.9 から1.2 Å前後のデータを取得することに成功した。現在構造の精密化を進め、甘味が増強したメカニズムを検討している。

（１） 北畠ら 日本農芸化学会2003大会講演要旨集 p71

（２） Ohta *et al.*, *FEBS J.*, (2008) **275**, 3644-3652.

（３） Ohta *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2011) **413**, 41-45.

（４） Masuda *et al.*, *Acta Crystallogr. Sect. F.*, (2011) **67**, 652-658.

Sweetness, thaumatin, atomic resolution

講演番号：2J16p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ J校舎16会場

甘味タンパク質ソーマチンの苦味抑制機構の検討

Studies on the suppression of bitterness by sweet-tasting protein, thaumatin

○塚原 礼恵[1]、桝田 哲哉[1,2]、北畠 直文[3]、谷 史人[1,2]（[1]京大院・農・食品生物、[2]京大院・地球環、[3]ノートルダム清心女大）

○Ayae Tsukahara[1], Tetsuya Masuda[1,2], Naofumi Kitabatake[3], Fumito Tani[1,2]（[1]GSA Kyoto Univ., [2]GSGES Kyoto Univ., [3]Notre Dame Seishin Univ.）

【目的】甘味タンパク質ソーマチンはショ糖に比べモル比で10万倍と非常に強い甘味を呈するタンパク質であり、その甘味閾値はヒトにおいて50 nMである。また、ソーマチンは強い甘味を呈する一方で、苦味をマスキングする作用や風味を増強する作用などの多面的な性質を有することが報告されているが、その作用機構については明らかにされていない。我々も、これまでに、苦味受容体T2R16安定発現細胞を用いた実験により、salicinをはじめarbutin、phenyl-β-D-glucopyranosideなどのT2R16リガンドに対して、リゾチームやα-ラクトアルブミンでは苦味の抑制効果は見られず、ソーマチンにのみ特異的に抑制効果が見られたこと、ソーマチン変異体を用いた実験により、ソーマチンのT2R16リガンドに対する苦味抑制効果には甘味発現に重要であるR82とは異なる部位が関与することを報告してきた（１）。今回は、T2R16に対する苦味抑制に係わるソーマチン分子上の部位探索ならびに、苦味受容体T2R38安定発現細胞を新たに作製し、T2R38リガンドに対するソーマチン特異的な苦味抑制効果について検討を行った。

【方法】陽イオン交換クロマトグラフィーにて精製した植物由来ソーマチンⅠを用いた。ソーマチン変異体は、酵母*Pichia pastoris*を発現系として培地中に分泌発現させ、培養上清を透析後、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した。純度は、SDS-PAGEとnative-PAGEにより確認した。苦味受容体T2R16およびT2R38はヒトゲノムDNAから取得した。苦味受容体T2R38については、取得したnontaster-typeのハプロタイプを示すAVI型に、A49P, V262A, I296Vの部位特異的変異を導入し、taster-typeのハプロタイプを示すPAV型を作製した。このPAV型T2R38遺伝子をキメラGタンパク質($G_{\alpha 16gust44}$)を発現しているHEK293細胞にリポフェクション法を用いて導入した。抗生物質G418耐性のクローンを選別し苦味受容体安定発現細胞株を作製した。苦味物質に対する応答は、細胞内カルシウム動員による蛍光強度変化(励起波長490 nm, 蛍光波長514 nm)⊿F/Fを指標とした。(⊿F/F＝(F_{max}-F_0)/F_0)

【結果】作製した苦味受容体T2R16およびT2R38の安定発現細胞は、それぞれの苦味物質に対して濃度依存的に応答した。この苦味物質に対する応答は、ソーマチン存在下において顕著に抑制された。また、ソーマチンは、T2R16リガンドよりも、T2R38リガンドに対してより大きい苦味抑制効果を示した。

（１）　塚原ら、日本農芸化学会関西・中部支部合同大会(2011)講演要旨集 p112

Thaumatin, bitter taste, masking

講演番号：2J16p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ J校舎16会場

コク味受容体の発見～カルシウム感知受容体を介するコク味受容機構の解明

Involvement of the calcium-sensing receptor in human *kokumi* taste perception

○北島誠司、大洲竹晃、網野裕右、長崎浩明、山中智彦、竹下亘、畑中敏宏、丸山豊、宮村直宏、江藤譲（味の素(株)）

○Seiji Kitajima, Takeaki Ohsu, Yusuke Amino, Hiroaki Nagasaki, Tomohiko Yamanaka, Sen Takeshita, Toshihiro Hatanaka, Yutaka, Maruyama, Naohiro Miyamura, Yuzuru Eto (Ajinomoto Co., Inc.)

【目的】カルシウム感知受容体(Calcium Sensing Receptor；CaSR)を介してコク味が認知されること、即ち、CaSRがコク味受容体であることを見出したので報告する(1)。我々は、 基本味（甘味、うま味、苦味、塩味、酸味）を中心に呈味を増強する物質を「コク味物質」と命名し、ニンニク抽出液より精製したコク味物質がグルタチオン(GSH；γGlu-Cys-Gly）であることを同定、その食品としての有用性を報告してきたが(2.3)、コク味の分子機構(コク味受容体)は不明であった。

【方法】CaSR活性とコク味活性の関連を以下のように検証した。CaSRアゴニスト（CaSR活性化合物）は、ヒトCaSR発現ベクターを遺伝子導入した卵母細胞とHEK293細胞を用いて測定し、コク味活性は、コク味物質を低濃度の基本味溶液(グルタミン酸ナトリウムなど)と混合し、基本味増強作用をヒト官能評価法で測定した。

【結果】CaSRの機能解析研究を展開した結果、GSHがCaSR活性を有することを突き止めた。GSHがコク味物質であることから、様々な既知CaSRアゴニスト(プロタミン;白子由来の塩基性タンパク質、ポリリジン、ヒスチジン、シナカルセト；合成化合物、カルシウム)を官能評価したところ、全てのCaSRアゴニストは例外なくコク味活性を示し、CaSR阻害剤(NPS-2143)の共存下で有意に減弱することが確認されたことかあら、CaSRがコク味受容体であると結論した。カルシウムも、高濃度で苦味を呈するが、低濃度では無味で、コク味活性(基本味増強)を示した。CaSRは元来、生体内カルシウム調節に関わると考えられており、ヒトで示された第二の生理機能といえる。近年、基本味に関わる分子生物学研究が進展し、甘味、うま味、苦味の受容体が解明された。今後、基本味(単独で味覚)とコク味(単独で無味、基本味を増強)の作用機構の相違を解明するとともに、コク味物質の有用性を開拓したい。

1) Ohsu, T. et.,al. (2010) J Biol Chem 285(2), 1016-1022
2) Ueda, Y. et.,al. (1990) Agric Biol Chem 54(1), 163-169
3) Ueda, Y. et.,al. (1997) Biosci Biotechnol Biochem 61(12), 1977-1980

glutathione, kokumi-taste, Calcium-sensing receptor

講演番号：2J16p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ J校舎16会場

コク味を有する新規γグルタミルペプチドの創出

Discovery of the new *kokumi* imparting gamma-glutamylpeptides

○田原 優樹、大洲 竹晃、金子 恵、中沢 正和、宮村 直宏、網野 裕右、江藤 譲（味の素㈱）
○Yuki Tahara、Takeaki Ohsu、Megumi Kaneko、Masakazu Nakazawa、Naohiro Miyamura、Yusuke Amino、Yuzuru Eto (Ajinomoto Co., Inc)

【目的】カルシウム感知受容体(CaSR)がコク味受容であることが明らかになったので、CaSR活性を指標にした新規コク味物質の探索が可能となった。ペプチドライブラリーのスクリーニングとγグルタミルジペプチドの構造展開を行った結果、GSHよりもCaSR活性、コク味力価の強いペプチドを見出したので報告する。
【方法】ジペプチド、トリペプチドなどの化合物を、CaSR発現ベクターをトランスフェクションしたHEK293細胞を用い、Ca2+蛍光指示薬で蛍光強度を測定し評価した。構造展開で得られたペプチドの安全性を確認し、食品系でのコク味物質としての機能を、官能評価により検証した。
【結果】ジペプチドライブラリーのスクリーニングを行ったところ、γGlu-Cys、γGlu-Valなどのγグルタミルジペプチドの一部にのみ比較的強いCaSR活性化能が認められた。安定性を考慮してγGlu-Valをリード化合物に選定し、種々の構造変換を行いトリペプチドのγGlu-Val-Gly（γEVG）に最も強いCaSR活性化能を見出した。更に非蛋白質構成アミノ酸も含めて構造展開を行い、γGlu-Abu-Gly、γGlu-tLeuなどにも強いCaSR活性化能を認めたことから、CaSRを強く活性化するペプチドは、①C末端にγ-グルタミル構造を有するトリペプチドであり、②２番目に疎水性で炭素鎖３程度の側鎖を持つアミノ酸があり、③N-末端のアミノ酸がGlyであるなどの特徴を持つことが判明した。γEVGの官能評価を行ったところ、コク味物質としての機能を有すること、既知のコク味物質であるGSHと比して、10倍以上のコク味力価を有することが明らかとなった。位置選択的γグルタミル化法によるγグルタミルペプチドの実用的な製造方法も検討したので併せて報告する。

glutathione, kokumi taste, gamma-glutamyl peptide

講演番号：2J16p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ J校舎16会場

コク味物質による味覚の開拓～官能評価法による新規γグルタミルペプチドの有用性確認

Study on the effect of a new *kokumi* peptide by sensory evaluation

○宮木 貴志、大洲 竹晃、長崎 浩明、網野 裕右、宮村 直宏、江藤 譲（味の素㈱）
○Takashi Miyaki、Takeaki Ohsu、Hiroaki Nagasaki、Yusuke Amino、Naohiro Miyamura、Yuzuru Eto（Ajinomoto Co., Inc）

【目的】コク味物質としてのグルタチオン（GSH）の実用化を進めてきたが、一方で、コク味受容体（CaSR）が解明したことから、CaSR活性を指標にしたスクリーニングを行い、GSHと比してCaSR活性が約10倍高いγGlu-Val-Gly（γEVG）を得た。本研究ではGSHを対象物質として、官能評価法によりγEVGの有用性を検証することを目的とした。
【方法】塩味、甘味、うま味水溶液にγEVG を100ppm添加し、厚み（口に含んで約5秒後の味の強さ）を指標にして、基本味溶液でのコク味物質の機能を官能評価法で検証した。続いて塩味・うま味水溶液で、100ppmのγEVGと同等の厚みの強さを有するGSHの主観的等価濃度を決定した。最後に市販のチキンコンソメにγEVGを20ppm添加し、食品系でのコク味物質としての機能を、官能評価により検証した。
【結果】100ppmのγEVG添加により、塩味、甘味、うま味水溶液全てにおいて統計的に有意な厚みの増強が見られた。100ppmのγEVGに対するGSHの主観的等価濃度は1280ppmであり、γEVGはGSHの約12.8倍のコク味力価を有した。市販のチキンコンソメでγEVG（20ppm）の機能を検証した結果、厚みの増強に加え、持続性（口に含んで20秒後の味の強さ）、ひろがり（舌だけでなく口腔内全体で感じる味の強さ）が統計的に有意に強まった。
　上記結果より、γEVGはコク味物質としての機能を有すること、既知のコク味物質であるGSHと比して、10倍以上のコク味力価を有することが明らかとなった。

kokumi, taste receptor, gamma-glutamyl peptide

講演番号:2J16p11
講演日時、会場:3月23日15:49～ J校舎16会場

苦味抑制作用を有するリボフラビン結合タンパク質フラグメントの微生物生産

Microbial production of riboflavin-binding protein fragment having a bitterness-suppressing potency

○柳田哲[1]、朴徽涓[1]、篠田直人[2]、鵜高重三[3]、柏木豊[1,2]、前橋健二[1,2]（[1]東農大院・醸造、[2]東農大応生・醸造、[3]名古屋大学）

○Satoru Yanagida[1], Whi-yeon Park[1], Naoto Shinoda[2], Shigezo Udaka[3], Yutaka Kashiwagi[1,2], Kenji Maehashi[1,2] ([1]Grad. Sch. Fermentation Sci. Technol., Tokyo Univ. Agriculture, [2]Dept. Fermentation Sci. Tokyo Univ. Agriculture., [3]Nagoya Univ.)

【目的】ニワトリ卵白に含まれるリボフラビン結合タンパク質（RBP）は分子量35kDaの糖タンパク質であり、キニーネ、カフェイン、PROPなど様々な苦味物質に対して苦味抑制作用を示す。これまでの研究でRBPのV8プロテアーゼ消化物には苦味抑制作用を保持したフラグメントの存在が推定されている。そこでRBPの苦味抑制作用に重要な領域を特定することを目的として、RBPフラグメントの微生物生産を試みた。

【方法及び結果】組換えRBP(rRBP)及びrRBPフラグメント(Fa:1-164、Fb: 40-164、及びFc: 40-219)の生産のためには目的領域の遺伝子をPCRにて増幅した後pNC-HisTに組み込み、*Brevibacillus choshinensis*を宿主とする系によりHis-tag融合タンパク質として発現を行った。3種類のrRBP断片のうちN末端側を保持したrRBP-Faは0.5g/Lの高発現がみられたため、発現タンパク質を培養上清からDEAE-Sepharose及びNi-IDA resinアフィニティーカラムにより精製した。0.125mMキニーネの苦味強度に対する影響を官能試験により調べた結果、rRBPは卵白RBP(nRBP)と比べると弱いながらも苦味抑制作用を示し、rRBP断片1-164はrRBPとほぼ同様の苦味抑制作用を示した。この結果から、RBPのC末端領域（55残基）は苦味抑制作用に関与していないことが示唆された。

bitterness, *Brevibacillus choshinensis*, riboflavin-binding protein

講演番号：2J16p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ J校舎16会場

Bacillus sp. Y18アミノペプチダーゼによる脱苦味処理はACE及びレニン阻害活性を保持する

Debittering treatment with *Bacillus* sp. Y18 aminopeptidase retains ACE and renin inhibitory activities

○韮澤 悟、程 永強[1]、李 里特[1]、後藤 猛[2]、高橋 砂織[3]（国際農研、[1]中国農大・食品科学、[2]秋田大学・工学資源、[3]秋田県総食研セ）

○Satoru Nirasawa, Cheng Yongqiang[1], Li Lite[1], Takeshi Gotoh[2], Saori Takahashi[3]（JIRCAS, [1]China Agric. Univ., [2]Akita Univ., [3] ARIF）

【目的】大豆タンパク質やカゼインなどのタンパク質加水分解物は栄養補助食品や低アレルゲン化食品の製造に用いられる重要な食品素材である。また、これらには血圧低下作用を有するACE阻害ペプチドが含まれており、機能性食品素材としても用いられる。しかしながら、これらの加水分解物は強い苦味を呈することから、直ちに食品に利用することは出来ない。そこで、これらの苦味を低減するアミノペプチダーゼを取得することを目的とした。

【方法】アミノペプチダーゼ生産菌の検索にはL-leucine-p-nitroanilideを基質として用いた。塩基配列､アミノ酸配列の相同性検索にはBLASTを用いた｡酵素遺伝子の取得は*Bacillus* sp. Y18より精製したゲノムを鋳型としたPCR法により行った。苦味強度測定はヒト官能テスト法により行った。レニン[1,2]及びACE[3]活性測定は高橋らの方法で行った。

【結果】中国雲南省土壌よりアミノペプチダーゼ生産菌*Bacillus* sp. Y18を単離した。つぎに、菌体培養上清より各種クロマトグラフィーを用いて分子量約 50kDa のアミノペプチダーゼ（apBY18）を精製するとともに、エドマン分解法により20番目までのアミノ酸配列を決定した。つづいて、各種PCRにより得られたDNA断片の塩基配列を決定し、これよりapBY18の全アミノ酸配列を推定した。その結果、apBY18 前駆体は 464 アミノ酸残基からなること、シグナルペプチド、プロペプチドが存在することが明らかになった。また、アミノ酸配列の相同性を解析したところ、各種細菌由来アミノペプチダーゼと相同性があることが明らかとなった（*Bacillus* sp. 2_A_57_CT2: 63%; *Bacillus* sp. NRRL B-14911: 63%; *Bacillus megaterium* QM B1551: 59%; *Ornithinibacillus* sp. TW: 59%)。つぎに、大腸菌によりapBY18の発現を行ったところ、活性型酵素が得られた。この組換え酵素を用いて、各種酵素特性を解析した。その結果、至適温度は50℃、至適pHは8.5であり、EDTAにより阻害を受けることが明らかとなった。また、合成基質に対する活性はLeu＞Met＞Arg＞Ala＞Lysであった。さらに、大豆粉のペプシン分解物、カゼインのトリプシン分解物の苦味を低減するとともに、それらの ACE 及びレニン阻害活性は保持した。このことから、apBY18 は加水分解物に含まれる苦味ペプチドに作用してその苦味を低減するが、ACE及びレニン阻害ペプチドには作用しないことが示唆された。

1) Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007)
2) *Ibid.*, **72**, 3232-3236 (2008)
3) Takahashi *et al.*, *Biomed. Res.* (2011) *in press*

Debittering, Angiotensin converting enzyme (ACE), Renin

講演番号：2J16p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ J校舎16会場

米乳酸発酵液の高血圧自然発症ラットにおける血圧降下作用とそのペプチド成分

Antihypertensive effect of a lacto-fermented rice product on spontaneously hypertensive rats

○市村年昭、岩井大悟[1]、高橋俊成[1]、吉田和利[2]、丸山進（産総研、[1]菊正宗酒造、[2]兵庫県工技セ）
○Toshiaki Ichimura, Daigo Iwai[1], Toshinari Takahashi[1], Kazutoshi Yoshida[2], Susumu Maruyama (AIST, [1]Kiku-Masamune Co.,Ltd., [2]HITec)

【目的】酒造工程の生酛（きもと）から分離された乳酸菌*Lactobacillus sakei* LK-117株に免疫調節作用やアトピー性皮膚炎発症抑制作用があることが報告されている。この乳酸菌を用い、高アミロース米ホシニシキを原料とした新規乳酸発酵液[1)]の機能性の検討を行ってきた。その一環として高血圧自然発症ラット（SHR）に対する血圧降下作用を検討するとともに、含有されるACE阻害ペプチドの分離同定を行った。また比較的含量が高いペプチドについて、SHRに対する血圧降下作用を検討した。

【方法】ホシニシキを80℃で酵素液化し、*Aspergillus oryzae*由来プロテアーゼの共存下、*Lactobacillus sakei* LK-117株により2日間発酵させた。この乳酸発酵液の遠心上清画分とこれをペプチド濃度比で約3倍に濃縮した試料液とを、それぞれSHRに対し胃ゾンデを用い強制経口投与し、その後の収縮期血圧の時間変化をtail-cuff法により測定した。また、長期投与試験は、2群に分けたSHRの一方に、米乳酸発酵液の凍結乾燥粉末を3.3%混合し成形した餌を自由摂食させ収縮期血圧の変動を測定することにより行った。両群のSHRについて12週齢以降、血圧の測定を続け、15週齢の測定終了後に1群の餌を試料混合餌に置き換え、以後9週間にわたり血圧を測定した。一方、米乳酸発酵液中のACE阻害ペプチドをゲルろ過、イオン交換、HPLC等を用いて分離精製し、アミノ酸配列を決定した。さらにそれらの内でACE阻害活性が強く、かつ比較的含有量が多いペプチドについて、その血圧降下作用を検討した。

【結果】米乳酸発酵液上清画分とその濃縮液をSHRに単回経口投与した結果、ともに投与後3時間より血圧が低下する傾向を示し、その効果は7時間後が最大であった。長期投与試験では試料投与群が17週齢以降、対照群より有意に低い血圧値を示し、以後24週齢まで同様の傾向が認められた。測定した全期間にわたって、両群の体重および餌の消費量に有意差は認められなかった。米乳酸発酵液中のペプチドを解析した結果、強い血圧降下作用が知られているVYが比較的多く含まれていることが明らかになった。この他、VVY、LVY、IFなどの比較的強いACE阻害活性を示すペプチドも見いだされた。これらについてもそれぞれ単回経口投与試験を行った結果、有意な血圧降下作用が認められた。

1)平成22年度醸造学会大会講演要旨集p15

lacto-fermented rice, anti-hypertension, spontaneously hypertensive rat

講演番号：2J16p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ J校舎16会場

タイトル　分子サイズの変化によるα-ラクトアルブミンの腸細胞の増殖制御

Title Regulation of cell growth for intestinal IEC-6 cells through molecular size alteration of alpha-lactalbumin

○希吉爾、CAIRANG　ZHUOMA、稲垣　瑞穂[1]、岩本　悟志[1]　矢部　富雄[1]、金丸　義敬[1]（岐阜大院連農・生資科、[1]岐阜大応生・食品生命

○XIJIER, CAIRANGZHUOMA, Mizuho Inagaki[1], Satoshi Iwamoto[1], Tomio　Yabe[1], and Yoshihiro Kanamaru[1] (Gifu univ. Agri.Sci. [1] Gifu univ.Applied Biol.Sci.)

【背景及び目的】我々はウシのα-ラクトアルブミン（α-LA）を 2,2,2-トリフルオロエタノール（TFE）で処理すると細胞毒性を示すことを報告した。本研究では、馬乳、牛乳、人乳から調製したα-LA を TFE 処理し、細胞増殖への影響を比較検討することを目的とした。

【実験方法】タンパク質の物理化学的分析には Sup75 カラムを用いたゲル濾過カラムクラマトグラフィ、SDS-PAGE、CD スペクトル、粒子径の測定には動的法散乱法（DLS）分析を行った。細胞増殖評価には WTS-1 法を用いた。

【結果及び考察】馬、牛、人のネイティブなα-LA はどちらも細胞の増殖にほとんど影響を与えないが、TFE 処理したα-LA は細胞毒性効果を示した。さらに TFE 処理した三種類のα-LA の細胞毒性の程度が異なった。すなわち、馬乳のものは低濃度でも非常に強い活性を示し、人乳のものは最も穏やかだった。ゲル濾過カラムクラマトグラフィ及び SDS-PAGE の分析では、オリゴマ-成分の存在は明確ではなかった。さらに、CD スペクトル分析からも TFE 処理したことでα-LA の立体構造にほとんど変化は見られなかった。一方、動的光散乱法（DSL）を用いた粒子径の測定の結果、TFE 処理したと天然状態の α-LA の間、粒子径が劇的に異なったことが示された。TFE 処理したのと天然状態の α-LA の粒子径はそれぞれ約 70 nm と 2 nm であった。さらに、天然状態の粒子径に経時変化は認められなかったが、TFE 処理した α-LA の粒子径は 24 時間の間、経時的に少しずつ大きくなる傾向を示した。

α-LA 度変性を経験すると、見かけ上の立体構造は元の状態に戻るが、不安定な集合体を形成することを通して細胞に毒性効果を示すようになるらしい。この結果は、タンパク質の生理的活性は必ずしもメジャーの構造変化と一致するとは限らないことを示した。

Keyword1: alpha-lactalbumin, Keyword2: toxicity, Keyword3: molecular size

講演番号：2J16p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ J校舎16会場

タイトル：レクチンによる食品機能成分の吸収調節のメカニズム
Title：Regulation mechanism of lectins on intestinal absorption of functional food factors
○仲田 創、山本進太郎、永沼孝子、小川智久、村本光二（東北大院・生命科学）
○ Hajime Nakata, Shintaro Yamamoto, Takako Naganuma, Tomohisa Ogawa, Koji Muramoto（Tohoku dai）

【目的】
レクチンは糖鎖を認識し特異的に結合するタンパク質であり、食素材になる多くの動植物に存在している。演者らはこれまで、レクチンが腸管からの食品機能成分の吸収調節作用を持つことを明らかにしてきた。しかし、レクチンが食品機能成分の吸収量を増加させるメカニズムについては、詳しい事はわかっていない。そこで本研究では、そのメカニズムを、レクチンと食品機能成分との相互作用の観点から解析することを目的とした。
【方法】
大豆（SBA）、小麦胚芽（WGA）、ナタマメ（CGA）、米ぬか（RBA）、麹菌（AOL）の 5 種のレクチンを用い、18～21 日間培養したヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞単層膜を腸管モデルとして実験を行った。各レクチン（200 μg/ml）と、腸管輸送経路が既知である 3 種の蛍光試薬（フルオレセイン（FL）：モノカルボン酸輸送経路、ルシファーイエロー（LY）：細胞間輸送経路、ローダミン（RH）：P 糖タンパク質介在輸送経路）を腸管モデルの管腔側に添加し、37℃で 2 時間インキュベート後、基底膜側の蛍光試薬の量を逆相分配系 HPLC によって分析した。
蛍光試薬 FITC で標識したレクチン(200 μg/ml) を腸管モデルの管腔側に加えて 37℃でインキュベートし、基底膜側への透過量を競合的 ELISA によって経時的に定量した。また、各レクチンと蛍光試薬の相互作用をフロンタルアフィニティクロマトグラフィー（FAC）を用いて調べた。
【結果】
FL は SBA・WGA・RBA によって、LY は WGA によって、RH は SBA・WGA・RBA・AOL によって、基底膜側への透過量がそれぞれ増加した。また、いずれのレクチンでも基底膜側へのレクチンの透過がみられた。レクチン固定化カラムを用いた FAC によって、FL と RH は SBA・WGA と相互作用することが明らかになった。その相互作用はレクチンの特異糖で必ずしも阻害を受けないことから、レクチンが持つ腸管上皮および食品機能成分との結合性が、腸管吸収を増加させるメカニズムの一つだと考えられる。
intestinal transport, lectin, Caco-2 cells

講演番号：2J16p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ J校舎16会場

乳脂肪球皮膜タンパク質MFG-E8は乳脂肪含量の制御に関与する

A milk fat globule membrane protein, MFG-E8, contributes to regulation of milk fat content

○安枝武彦[1]、中谷肇[1]、大島健司[1]、灘野大太[1]、長田重一[2]、松田幹[1]
（[1]名大・院生命農、[2]京大・院医）
○Takehiko Yasueda[1], Hajime Nakatani[1], Kenzi Oshima[1], Daita Nadano[1], Shigekazu Nagata[2], Tsukasa Matsuda[1]
([1] Dept. Appl. Mol. Biosci. Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya University, [2] Dept. Med. Chem., Grad. Sch. Med., Kyoto University.)

【目的】MFG-E8 は乳脂肪球皮膜タンパク質であり、膜の構成成分であるホスファチジルセリンに対し結合能を持つ。離乳後の乳腺退縮時に、乳腺胞の上皮近傍への MFG-E8 の偏在が観察される(1)。MFG-E8 はアポトーシス細胞の被貪食マーカーとしても知られており、MFG-E8 欠損マウスでは乳腺退縮時にアポトーシス細胞が貪食されず蓄積し、さらに乳脂肪球も乳腺管腔内に残存する (2)。本研究では、乳脂肪球皮膜に存在する MFG-E8 の役割を解明することを目的とする。
【方法】泌乳期および強制離乳後の C57BL/6J マウスから搾乳したミルクのタンパク質含量と組成、乳脂肪含量（中性脂質含量)、乳脂肪球皮膜のリン脂質組成を解析した。搾乳したミルクをマウス乳腺上皮細胞株 HC-11 の培地に添加して培養した後、細胞を固定し Nile-red で乳脂肪球を染色した。乳脂肪球を抗 MFG-E8 抗体あるいは Annexin V を用いて蛍光免疫染色した。強制離乳後のマウス乳腺から組織切片を作製し、乳腺管腔内に残存する乳脂肪球を Nile-red で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
【結果と考察】泌乳期および強制離乳後におけるミルクのタンパク質含量と組成、乳脂肪球皮膜のリン脂質組成に大きな変化は見られなかったが、MFG-E8 欠損マウスの乳脂肪含量は、野生型マウスに比べ約 25%有意に高かった。搾乳したミルクをマウス乳腺上皮細胞培養系に添加すると、乳脂肪球の細胞表面への結合や内部への取り込みが観察された。また、泌乳期と比べて離乳後では、乳脂肪球表面に結合した MFG-E8 が増加し、一方で、Annexin V の結合性が低下した。さらに、泌乳期のミルクを 37℃、～48 時間静置すると、経時的に乳脂肪球表面の MFG-E8 が増加した。また、37℃で静置したミルクをマウス乳腺上皮細胞培養系に添加すると、静置時間に依存して乳脂肪球の細胞への結合と取り込みが増加した。MFG-E8 欠損マウスのミルクでは乳脂肪球の乳腺上皮細胞への結合や取り込みはほとんど観察されず、さらに、乳腺胞の上皮細胞近傍に分布する乳脂肪球も減少した。これらの結果から、ミルクが乳腺胞内に分泌された後、時間の経過とともに乳脂肪球表面に MFG-E8 が結合して乳脂肪球の乳腺上皮細胞への結合と取り込みが誘導されること、さらに、このような再吸収を介して MFG-E8 が乳脂肪含量を制御することが示唆された。

(1)Nakatani H, et al., Biochem J. 2006; 395, 21-30
(2)Hanayama R, Nagata S, PNAS. 2005; 102, 16886-16891

milk fat globule(Mfg), Mfg-e8, mammary gland

講演番号:2J16p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ J校舎16会場

濃縮乳清活性タンパクはJNK-ATF4経路を介して骨形成を促進する

Concentrated bovine milk whey active protein facilitates osteogenesis through activation of the JNK-ATF4 pathway

○内藤 健太郎、Jack Ralph W.[1]((株)ディーエイチシー、[1]Seperex Nutritionals (Hong Kong) Ltd)
○Kentaro Naito, Ralph W. Jack[1] (DHC Corporation, [1]Seperex Nutritionals (Hong Kong) Ltd)

【目的】濃縮乳清活性タンパク質(Concentrated Bovine milk whey active Protein; CBP)は低分子ホエイタンパク質のフラクション(1-30 kDa)を濃縮させたものであり、*in vivo*や臨床試験において骨を強化する生理機能があることが示されている。しかしながら、その根底にある作用機序に関してはほとんど示されていない。本研究において、我々はCBPが正常ヒト骨芽細胞において骨細胞への分化を促進させること、そしてc-jun NH_2-terminal kinase (JNK)が活性化するactivating transcription factor 4 (ATF4)経路を介していることを特定したので、その報告を行う。

【方法】正常ヒト骨芽細胞（13才；健常、男）はCambrex社より購入したものを用い、培地として継代培養時には10%血清入りのα-MEM、細胞分化時にはその培地に5 mM β-glycerophosphate、50 μM ascorbic acidとなるよう加えたものを用いた。アルカリホスファターゼ活性の測定には細胞破砕液を8 mM 4-ニトロフェニルりん酸二ナトリウムと反応させ、0.1 N NaOHで反応停止後にプレートリーダーにて405 nmの吸光度を測定することで行った。石灰化の測定にはvon Kossa染色、または色素Alizarin redを用いた染色で行い、定量的な測定の際には細胞に吸着したAlizarin redを再溶出させてプレートリーダーにて562 nmの吸光度を測定することで行った。ATF4のmRNA発現の測定は、細胞のTotal RNAをQiagen社製のTotal RNA抽出キットを用いて単離・精製後、Takara社製のキットを用いて1本鎖cDNAを合成を行い、ATF4または18S遺伝子のアプライド社製のTaqMan® Gene Expression Assaysを用いてReal-Time PCRで相対的に定量を行うことで評価した。JNKおよびextracellular signal-regulated kinase (ERK)のリン酸化の検出は、種々の特異的抗体を用いて免疫ブロッティング法により検出することで行った。

【結果】我々は正常ヒト骨芽細胞にCBPを添加することでアルカリホスファターゼ、及び石灰化が有意に誘導されることを観察した。さらに、CBP処理した骨芽細胞において、ATF4のmRNA発現が未処理のものと比べて強く誘導され、細胞分化の終期ステージへの進行が促進されていることが示唆された。我々はCBPがJNKおよびERKのリン酸化を活性化させていることを明らかとした。さらに、それらの特異的な阻害剤であるSP600125およびPD98059を用いて経路解析を行った結果、ERKでなく、JNKの活性化がCBPの誘発する石灰化およびATF4発現に必須であることを明らかとした。

【結語】我々の結果はJNK媒介のATF4経路がCBP誘発の骨形成の作用機序として重要な役割を果たすことを示すものである。

Whey; osteoblast; bone

講演番号：2J16p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ J校舎16会場

大豆からの２Sアルブミンの単離と特性

Isolation and characterization of 2S albumin from soybean

○佐野 まどか、佐藤 瑠依[1]、湯川 真衣[1]、永沼 孝子[1]、小川 智久[1]、村本 光二[1]（東北大農、[1]東北大院・生命科）

○Madoka Sano, Rui Sato, Mai Yukawa, Takako Naganuma, Tomohisa Ogawa, Koji Muramoto (Tohoku dai)

【目的】大豆には主要タンパク質の他にも様々な生理活性を持つタンパク質が含まれており、食品機能性を持った食品としてのさらなる活用が期待できる。その中でもプロテアーゼインヒビターやレクチンなどの抗腫瘍活性をもつものが知られている。43アミノ酸残基からなるルナシンと呼ばれるポリペプチドにも抗腫瘍活性が報告されているが、その研究には大腸菌や酵母で発現させるか、化学合成したものが使用されており、大豆から単離したものの報告は見られない。ルナシンは、長（L）鎖と短（S）鎖からなる２SアルブミンのS鎖に相当するが、その生成の機構は不明である。本研究では、大豆からルナシンと２Sアルブミンのより簡便で高収量の単離法を確立すること、及び前駆体である２Sアルブミンからルナシンが派生するしくみを明らかにすることを目的とした。

【方法】脱脂大豆粉(品種：ミヤギシロメ)を水抽出し、等電点沈殿で分画した後、イオン交換クロマトグラフィーと逆相高速液体クロマトグラフィーに供し、分離した各タンパク質をN末端アミノ酸配列分析にて同定した。また、抗２Sアルブミンウサギ抗体を用いたELISA法により２Sアルブミンのスクリーニング法を設定した。この方法を用いることにより、脱脂大豆粉からのアルコール抽出・アセトン沈殿による２Sアルブミンとルナシンの分画法を検討して精製効率の向上を試みた。２Sアルブミン及びそれを還元して調製したルナシンの活性を、５種類のガン細胞を用いたWST-1アッセイにより測定し、他の抗腫瘍活性成分の結果と比較した。

【結果】等電点沈殿法による分画では、２Sアルブミンはβ-コングリシニン画分に含まれていることがわかった。アルコール抽出する場合、20%エタノールまたは15%イソプロパノールで最も効率的に２Sアルブミンを抽出できた。ルナシンを脱脂大豆粉から単離することはできなかったが、S-S結合の還元により２Sアルブミンからルナシンを調製できた。ガン細胞に対する毒性試験の結果、２Sアルブミンとルナシンはマウス繊維芽細胞NIH/3T3、ヒト乳ガン細胞MCF-7に対して活性を示し、その活性はルナシンより２Sアルブミンの方が強いことが判明した。このことからRGD細胞接着モチーフ、及び9残基連続したアスパラギン酸から成るルナシンの活性部位の配列は２Sアルブミンでも分子表面に露出して存在しており、活性を発現し得る状態にあると考えられる。

Soybean, Lunasin, 2S albumin

講演番号:2J16p19
講演日時、会場:3月23日17:37～ J校舎16会場

エミュー卵白TENPの精製及び性質

Purification and characterization of TENP from emu egg white

○上田恵[1]、股野麻未[2]、武内純子[3]、内野昌孝[4]、渡部俊弘[3]、柏木豊[1,2]、前橋健二[1,2]（[1]東農大院・醸造、[2]東農大応生・醸造、[3]東農大・生物産業・食香、[4]東農大応生・化学）

○Megumi Ueda[1], Mami Matano[2], Junko Takeuchi[3], Masataka Uchino[4], Toshihiro Watanabe[3], Yutaka Kashiwagi[1,2], Kenji Maehashi[1,2] ([1]Grad. Sch. Fermentation Sci. Technol., [2]Dept. Fermentation Sci., [3]Dept. Food & Cosmetic Sci., [4]Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agriculture.)

【目的】TENP (transiently expressed in neural precursors) はニワトリ胚の網膜や脳において一次的に発現し神経前駆細胞の分化において何らかの役割を果たしていると考えられているものの詳しい機能は明らかにされていないタンパク質である。我々はエミュー卵白にはTENPが主要タンパク質の一つとして含まれることを見出したため、TENPの諸性質を明らかにすることを目的としてエミューTENPの一次構造解析、卵白からの精製及び性質検討を行った。

【方法及び結果】TENP遺伝子はエミュー卵管から調製したcDNAよりPCRにより増幅され、全長をコードするcDNAがクローニングされた。得られた塩基配列から、エミューTENPはアミノ酸残基452(19アミノ酸のシグナルペプチドを含む)、ニワトリTENPとの相同性は58%であることが明らかとなり、抗菌タンパク質BPI(bactericidal/permeability-increasing protein)ファミリーに属すると推定された。RT-PCR解析からは、エミューTENP遺伝子の卵管特異的発現が示唆された。エミュー卵白からDEAE-Sepharoseカラムクロマトグラフィー及び硫安沈殿分画により分子量52kDaのTENPタンパク質が精製されたが、BPI様の抗菌活性は認められなかった。

Tenp, emu, egg white

講演番号:2J16p20
講演日時、会場:3月23日17:48～ J校舎16会場

緑豆由来の不凍タンパク質の分離とその諸性質

Isolation of antifreeze protein from *Vigna radiata* and its characterization.

○中地　学、片倉 啓雄、荒井直樹[1]、河原 秀久（関西大・化生工、[1]㈱カネカ）

○Manabu Nakachi, Yoshio Ktakura, Naoki Arai[1], Hidehisa Kawahara (Kansai Univ. Dept.of Life Sci and Biotech, [1]KANEKA)

【目的】変温性動物の幾種かは、低温下で棲息する際、不凍タンパク質(AFP)を生産する。これまでに、市販されているマメ科植物種子のAFPの存在を検索し、小豆など数種に存在することを明らかにした。しかしながら、完全に精製した豆AFPの性質は不明のままである。そこで、本研究では、植物種子のうち緑豆からAFPを分離・精製し、その精製品の諸性質を解明することを目的としている。

【方法】市販されている豆は、20 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)に浸け、一定期間低温室に置いた。ミキサーによって破砕した後、遠心分離して、得られた上澄み液(エキス)をアセトン沈殿あるいはpH処理した後、コールドフィンガー法によって分離した。AFPの活性測定は、主に氷再結晶化抑制活性(RI活性)を測定した。

【結果】小豆系の豆の仲間である緑豆から調製したエキスにもRI活性を確認できた。この活性は、弱アルカリ処理によってより安定になった。次に、コールドフィンガー法によってAFPのみを分離した。得られた氷画分のタンパク質を電気泳動で分析したところ、ほぼ単一であることが判明し、SDS-PAGE、およびゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分子量を決定し、現在、諸性質について解析中である。

anti freeze protein, *Vigna radiata*, seed

講演番号：2J17a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ J校舎17会場

F_2-selective 2D NMR法による食品の非破壊的な代謝物分析法

Non-destructive metabolic analysis of foods using F_2-selective 2D NMR spectroscopy

○甲田 政則、降旗 一夫、魏 菲菲、宮川 拓也、田之倉 優（東大院・農生科）
○Masanori Koda, Kazuo Furihata, Feifei Wei, Takuya Miyakawa, Masaru Tanokura (The University of Tokyo)

【目的】食品中の低分子化合物を網羅的に解析するメタボロミクスは食品の品質管理、真正評価等の分野において幅広く応用されている。NMRは簡単な前処理で食品中の幅広い成分を測定可能な特徴を持っているが、食品に含まれる糖類、脂質、エタノール等の圧倒的な主成分により微量成分の検出が阻害されるため、多くの場合、前処理として主成分の除去が必要となる。本研究では選択励起の手法を用いる事で主成分を除去せずに微量成分を測定する手法とそのメタボロミクスへの応用を検討した。
【方法】微量成分を検出するために、新たにF_2-selective 2D NMR法（F2軸に沿って選択励起を行う2次元NMR法）を開発し[1)]、各品種のマンゴージュースに適用して微量成分検出の有効性を検証した。また、F_2-selective 2D NMR法を用い、日本酒、米酢の低磁場側（6-10 ppm）のNMRスペクトルを非破壊的に測定した。さらに、日本酒、紹興酒、マッコリの3種類のライスワインのF2-selective TOCSYスペクトルを測定し、2次元スペクトルを用いた主成分分析を行った。
【結果】F_2-selective 2D NMR法を用いる事で主成分を除去する事無くマンゴージュースの微量成分の2D NMRスペクトルが得られ、様々な微量成分を帰属する事が出来た。日本酒、米酢等のF_2-selective TOCSYスペクトルからは低級ペプチドに由来すると考えられる非常な複雑な2次元NMRスペクトルが得られた。この複雑な2次元スペクトルは日本酒、紹興酒、マッコリの3種類のライスワインでそれぞれに特徴的なパターンを示し、主成分分析を用いる事でこれらの識別モデルを構築する事が出来た。また米酢においては銘柄ごとに異なるパターンを示した。このF_2-selective TOCSYによる新しい「指紋」は食品の品質管理、真正評価における有用なツールとなると考えられる。

1）Koda et. al., *Magn. Reson. Chem.* **2011,** *49,* 710–716

NMR, non-destructive analysis, metabolomics

講演番号：2J17a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ J校舎17会場

野生種トウガラシの完熟果実におけるカロテノイドプロファイルの比較解析

Comparative analysis of carotenoid profile in the mature fruits of wild pepper

○伊藤　隆、鈴木　宗典[1]、永田　典子[2]、坂　智広、村中　俊哉[1]（横浜市大木原生研、[1]阪大院工学、[2]日本女子大理学）

○Takashi Ito, Munenori Suzuki[1], Noriko Nagata, Tomohiro Ban, Toshiya Muranaka, (Yokohama City Univ., [1]Osaka Univ., [2]Japan Women's Univ.)

トウガラシ属植物は中南米原産のナス科の多年草である。その果実は香辛料としての利用のほかに野菜や食品添加色素としても広く利用されている。このため、生産者や市場で望まれる非脱粒性、果実の大型化、味や果実色彩といった形質により選抜された栽培品種が数多く作出されてきた。特に果実色彩は商業的に重要な形質の一つであり、研究が広く行われている。これまでに、トウガラシ属植物果実中に多様性なカロテノイドの含有及び、果実の赤色化決定因子がトウガラシ属植物特異的カロテノイドであるcapsanthin合成酵素（Capsantihn-Capsorubin Synthase: CCS）である事が明らかにされた。CCSの発現の有無から赤色の果実色彩へのカプサンチンの関連が示唆されている。しかし、トウガラシ属植物果実には多様な色素が検出されており、これらの色素が果実色彩に複雑に影響していると考えられる。これらの研究は栽培種を試料としている為に形質選抜が既におこなわれている。そこで、本研究では多様な形質を有する野生種におけるカロテノイドプロファイルを比較解析し、果実色彩と化合物群との相関を数理統計的手法で明らかにすることを目指した。

木原生物研究所では、中南米から採種した野生種トウガラシ属植物795系統を保有し、常時200系統以上を栽培している。本研究所の所有系統から完熟果実90試料を採取し、マンセル表色系を用いた定量的色彩評価およびHPLCによるカロテノイドプロファイリングを行った。色彩評価の結果、試料は31色に分類された。HPLC及びLC-MS分析の結果、カロテノイド及びカロテノイド様物質合計55化合物が検出された。カロテノイド組成に基づくクラスター解析により、試料は3つのクラスターに分類され、各クラスターの試料が呈する色彩に類似性がみられた。カロテノイドプロファイルの色彩への影響を検討するために、マンセル表色系の3属性についての詳細な統計解析を行った。この結果、マンセル色相はカロテノイド組成に、マンセル明度はカロテノイド蓄積量に、そしてマンセル彩度はクロロフィルの存在によって大きく影響されることが明らかとなった。

以上のように本研究では野生種完熟果実90試料におけるカロテノイドプロフィリング及び色彩の定量評価を行い、統計解析によって、カロテノイドプロファイルの色彩への影響を明らかにした。

carotenoid, *Capsicum*, Munsell color

講演番号:2J17a03
講演日時、会場:3月23日09:22～ J校舎17会場

科特異的プライマーを用いた食品原材料判別法の開発

Identification of food material in processed food with PCR

Ulziichimeg Jambaldorj、河村沙也加、○内野昌孝、入澤友啓[1]、野口治子、高野克己（東農大・応生、[1]理研・JCM）

Ulziichimeg Jambaldorj, Sayaka Kawamura, Masataka Uchino, Tomohiro Irisawa[1], Haruko Noguchi, Katsumi Takano (Tounoudai,[1]Riken)

【目的】加工食品の原材料を判別する技術は複数あるものの、その検出には利用原料が比較的少ない原料で構成されるものやサンプル量がある程度必要なもの、対象物が予測されたものなど、検出には制限要因が含まれる。我々は加工食品中の未知の食原材料を微量で正確に推定する技術を開発した。すなわち、イネ科共通プライマーによりイネ科植物の特定遺伝子を増幅後、PCR-DGGEを行ったところ、多くのイネ科植物が移動度の異なるバンドを形成し、各バンドを切り出しDNAシークエンスして得られた塩基配列結果のBLAST検索により該当原材料の推定が可能であった。しかし、検討を行った結果、この方法では科以下のみの検出が可能であった。そのため、加工食品中の未知原材料を推定するにはいずれの科の原材料が含まれているかの推定が必要である。そこで本研究ではPCR-DGGEによる推定法を完成させるため、加工食品に含まれる食品原材料を科レベルで推定する方法の確立を目的とした。
【方法】対象科として加工食品によく利用されるイネ科、バラ科、ナス科、マメ科を選択した。DDBJより各科に属し、食品原材料として利用される植物のmatK遺伝子のDNA塩基配列を入手、BioEditを用いてアライメントを行った。その後、GAP、GC含量、配列の偏りなどを考慮し、同科で共通で近縁科では異なる領域を中心に20mer前後のプライマーを構築した。一方、各科に属する食用植物より常法に従いDNAを抽出、精製した。なお、精製DNAの精製度および量は吸光度より求めた。また、精製DNAのPCR増幅性をrbcL遺伝子の増幅性で確認した。次に、このDNAを用い、先に構築したプライマーの有用性を確認した。この際、複数構築したプライマーの組み合わせの変更やアニーリング温度、サイクル数を変更し、最適化を行った。
【結果】各試料より抽出・精製したDNAは量、精製度共に十分な値であった。また、全てのDNAでrbcL遺伝子のPCR増幅性を確認したため、以後の試験に供した。次いでイネ科、バラ科、ナス科、マメ科それぞれに属する食用植物数種類と他の科より代表的な食用植物から調整したDNAを利用して科特異的プライマーの有効性を確認したところ、組み合わせによっては同一科内でバンドの有無や濃淡、予想分子領域以外でのバンドの出現など不適切な結果がいくつか見られたものの、適切なプライマーの組み合わせ、アニーリング温度、サイクル数の調整により目的の全ての科に特異的なバンド生成の条件が構築できた。
　以上、加工食品中のイネ科、バラ科、ナス科、マメ科食原材料の推定法が確立されたことから、PCR-DGGE法との組み合わせにより未知食品原材料の推定を進めることが可能となった。

Identification, Food Material, PCR

講演番号：2J17a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ J校舎17会場

タイトル　自動LED計数装置による大豆加工食品中の大腸菌群数の迅速計測

Title　Rapid enumeration of coliforms in processed soy products with LED-based automated cell-counting system

○片瀬満、坪井成緒、津村和伸（不二製油、食品安全分析センター）

○Mitsuru KATASE, Shigeo TSUBOI, Kazunobu TSUMURA (Analytical Center for Food Safety, Fuji Oil Co., Ltd.)

【目的】豆乳や分離大豆タンパク質などの大豆加工食品中の大腸菌群を迅速計測することを目的に、自動ＬＥＤ計測装置を用いた方法を検討し、プレート培養法と比較した。

【方法】細菌数の計測は「バイオプローラ」(光洋産業社製)を用いた。大腸菌群は*E. coli* NCTC9001, *K. pneumoniae* NBRC14940, *E. aerogenes* NCTC10006を使用した。専用フィルター（孔径0.4μm）上に保持させた細菌を6-CFDA（濃度；150μg/ml）で染色する蛍光染色法にて検出した。

【結果】豆乳や分離大豆タンパク質溶液などのコロイド状食品では、フィルター染色法を行った場合、フィルターの目詰まりや染色阻害などの理由でそのままでは適用できない。大豆タンパク質を等電点沈殿により除去し、清澄な溶液とすることでフィルター染色法が可能となった。得られた清澄溶液（大豆ホエー）中に標準菌を接種し、バイオプローラ法とプレート培養法で細菌数を計測したところ、両者で良好な相関が見られた。またバイオプローラ法での検出は10^2乃至10^3cfu/ml以上で可能であった。豆乳に10cfu/mlの大腸菌群を接種し、選択増菌培養（4乃至6時間）を実施した後、本法で計測することで大腸菌群の増殖を観察することが出来た。

以上の結果より、本法は豆乳や分離大豆タンパク質中の大腸菌群の迅速計測に有用であると考えられた。

coliforms, processed soy products, rapid enumeration

講演番号：2J17a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ J校舎17会場

食品中の着色度を代用特性とするアクリルアミド含有量の測定
-ポテトチップスを例として－

Acrylamide contents in processed foods measured by the browning as the substitute methods

○石原 克之[1]、米澤 弥矢子[1]、中田 民枝[1]、久保 美沙子[1]、古賀 秀徳[1]、堤内要[2]、本庄勉[3]、漆山哲生[4]、浮穴学宗[4]（[1]カルビー㈱、[2]中部大学、[3]㈱森永生科学研究所、[4]農林水産省）

○Katsuyuki Ishihara[1], Miyako Yonezawa[1], Tamie Nakada[1], Misako Kubo[1], Hidenori Koga[1], Kaname Tsutsumiuchi[2], Tsutomu Honjoh[3], Tetsuo Urushiyama[4], Takanori Ukena[4] ([1]Calbee, Inc., [2]Chubu University, [3]Morinaga Institute of Biological Science, Inc., [4]Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)

【目的】2002年に還元糖とアスパラギンを含む食品を高温加熱することにより食品にアクリルアミド(AA)が生成されることが明らかとなって以降、2009年には、Codex委員会により食品中のAAの低減に関する実施規範が策定され、加工食品中のAAの低減が求められている。しかし、AAの測定には高額な分析機器と高度な分析技術が必要であり、事業者がAA低減に取り組みにくいのが現状である。また、これまでの研究により、ポテトチップス中のAA濃度と表面の着色度(L*a*b*表色系のa*値)との間に相関が認められたが、AA含有濃度の代用特性値としてはまだ低い精度しか期待できない。そこで新たな食品中AAの簡易・迅速な分析方法を開発することを目的とした。
【方法】ガラス繊維濾紙に0.2Mアスパラギン溶液、各濃度（0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10M）のフルクトース溶液を添加し、180℃のパーム油で1分間フライして調製したものを濾紙モデルサンプルとした。またポテトチップスサンプルは、カルビー(株)の4つの工場で生産したそれぞれ6サンプル、合計24サンプルを用いた。これらのサンプルをヘキサンで脱脂後、各溶媒（エタノール水溶液、ミリQ水、酢酸エチル、アセトン）で抽出し、濾液を吸光、発光、蛍光測定を行い、臭素誘導体化GC/MS法により測定したAA含有濃度の値との比較を行った。
【結果】濾紙モデルサンプルでの検討の結果、a*値とAA濃度の相関R2=0.959に対して、吸光測定（90%EtOH抽出、波長：270nm）でR2=0.998、蛍光測定（90%EtOH抽出、Ex：400nm、Em：640nm）でR2=0.992と高い正の相関が得られた。しかし発光測定ではR2が小さく相関が得られなかった。
ポテトチップスサンプルでの検討の結果、a*値とAA濃度の相関R2=0.891に対して、吸光測定（75%EtOH抽出、波長：378nm）でR2=0.844と低くなった。しかし蛍光測定（50%EtOH抽出、Ex：450nm、Em：510nm）ではR2=0.978と高い相関が得られた。そこで、4つの工場それぞれに適した測定条件で解析した結果、a*値とAA濃度の相関R2は0.940、0.737、0.828、0.921であったのに対して、吸光測定では1.000、0.995、0.990、1.000、蛍光測定では1.000、0.997、0.998、0.996とどちらも極めて高い相関が得られた。このことより、ポテトチップスにおいては、抽出液を蛍光測定した値がAA濃度の値と相関が高く、代用特性としての適用性、汎用性が高いこと、工場ごとに抽出液の測定条件を設定した場合には蛍光測定に加えて吸光測定でもAA濃度の代用特性値として使用できる可能性が示唆された。

acrylamide, Maillard reaction, potato chips

講演番号：2J17a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ J校舎17会場

タイトル　各種食用油の加熱劣化時における揮発性成分の比較
Title　Comparison of flavor compounds from heat-damaged edible oils
○佐野 貴士、武波 慎也、今義　潤、白砂　尋士、田島　郁一（㈱Jーオイル油脂研）
○Takashi Sano, Shinya Takenami, Jun Imagi, Hiroshi Shiramasa, Ikukazu Tashima
(J-Oil Mills R&D)

【目的】油脂は加熱劣化により特徴的なにおいが発生し、経時的にその強度が強くなることが知られている。これまではこのようなにおいを官能的な評価により把握してきたが、本研究ではより客観性の高いGC/MSを用い、得られた揮発性成分の変化から、加熱により劣化した油脂から発生するにおいの特徴を把握する事を目的とした。
【方法】今回は国内で主にフライ用油脂として流通している、大豆油・菜種油・パーム分別油の3種の油脂を試料として用いた。油脂は180℃で加温することで劣化させ、経時的に官能評価ならびに発生する揮発性成分の分析を実施した。官能評価は8語を選定し、専門パネルを用いて6段階でスコア化した。揮発性成分はダイナミックヘッドスペース法（ゲステル社製）を用いて捕集し、GC/MS（アジレント社製）を用い分析した。
【結果】得られた揮発性成分のうち有臭成分をSniffingにより絞り込み、官能評価で得られたスコアとの比較を行なった結果、有臭成分のエリア面積の合計値が＜全体のにおい強度＞スコアと高い相関性を示すことが確認された。有臭成分の各エリア面積値および官能評価スコアを用い主成分分析を行った結果、＜全体のにおい強度＞や＜刺激臭＞、＜酸敗臭＞は主にリノール酸由来と考えられるアルデヒドやアルコールに起因する可能性が高く、大豆油や菜種油は経時的にそれら量が増加していることが確認された。パーム分別油は大豆油や菜種油と比較して加熱劣化時に発生するにおい特徴や有臭成分が異なり、そのにおい特徴がオレイン酸由来と考えられるアルデヒドに起因する可能性が示された。これらの結果より、油脂の加熱劣化時に発生するにおいは、その構成する脂肪酸に起因しており、特に不快なにおいとされる＜刺激臭＞や＜酸敗臭＞はリノール酸由来の分解物に起因している可能性が示された。

Keyword: oil, flavor, GC/MS

講演番号：2J17a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ J校舎17会場

乾熱処理小麦粉中グルテン区分のRVAプロフィール変化への影響

Influence of gluten fraction in dry-heated wheat flour on the change of RVA-profile

○小澤 美貴、中村 智英子　瀬口 正晴[1]（神女短・食栄、[1]神女大・家政）
○Miki Ozawa, Chieko Nakamura Seguchi Masaharu[1] (Kobe Women's Junior College, [1]Kobe Women's Univ)

【目的】120℃2時間乾熱処理した小麦粉と未乾熱処理小麦粉のA Rapid visco analyzer(以下RVA)プロフィールを比較すると、糊化開始温度の低下と最高粘度の上昇が認められた。本研究ではその原因を検討するため、乾熱処理により小麦粉成分（水溶性区分、グルテン区分、テーリングス区分、プライムスターチ区分）に生じるどのような変化が糊化特性変化の原因となるのかを検討した。

【方法】実験には、タンパク質含量の異なる4種類の小麦粉（Alps、Kagami、Akakappu、Red knight）を使用した。各小麦粉は酢酸分画を行い、水溶性区分、グルテン区分、プライムスターチ、テーリングス混合区分に分画した。各区分を120℃２時間乾熱処理し、未処理区分と合成粉を作りRVA測定した。

【結果】小麦粉の酢酸分画を行い、乾熱処理区分、未乾熱処理区分による合成粉のRVA予備試験の結果、今回グルテン区分への乾熱処理の影響に注目した。ここでは、グルテン区分、プライムスターチとテーリングス混合区分の2区分に分け、グルテン区分のみ乾熱処理を行い、他区分とブレンドして合成粉とし、RVA測定を行なった。その結果、未乾熱処理グルテン区分を加えたものと、乾熱処理したグルテン区分を加えたものを比較すると、糊化開始温度の低下と最高粘度の上昇が認められた。
これは、乾熱処理小麦粉の示す結果と類似の傾向であった。これは、4種類すべての小麦粉において、同様の結果が得られた。グルテン区分の乾熱処理による変化が、小麦粉デンプンの糊化特性に大きな影響を与えるものと推察された。

Dry-heated wheat flour, RVA, gluten fraction

講演番号:2J17a08
講演日時、会場:3月23日10:27～ J校舎17会場

ショ糖脂肪酸エステルを用いた乾熱処理小麦デンプン粒表面疎水化の定量について

Determination method of the hydrophobicity of dry-heated wheat starch granules by sucrose fatty acid ester

○田原　彩、平野　晃[1]、松井　悠子[1]、瀬口　正晴（神女大院・家政、[1]森永製菓）
○Aya Tabara, Akira Hirano[1], Yuko Matsui[1] and Masaharu Seguchi (Kobe Woman's University, [1] MORINAGA & CO., LTD.)

【目的】小麦デンプン粒を乾熱処理すると高いオイル吸着性を示す。本研究ではショ糖脂肪酸エステルを用いた乾熱処理小麦デンプン粒表面の疎水性の定量法を示す。
【方法】小麦デンプン粒をオーブン中で120℃、10、20、40、60、120分間、乾熱処理した。ショ糖脂肪酸エステル（SFAE）はHLB13を使用し、濃度が0.3%の水溶液とした。デンプン粒10g、SFAE溶液45mＬを5分間混合撹拌後、モーリッシュ反応が検出されなくなるまで水洗浄した。その後ソックスレーを用いてデンプン粒からSFAEをエチルエーテル抽出し、薄層クロマト（TLC）による標品との比較、フェノール硫酸法による抽出物中のショ糖の定量を行なった。さらに乾熱処理時間、温度、デンプン粒の種類を変えた定量実験を行なった。
【結果】乾熱処理小麦デンプン粒と SFAE 溶液混合後、エチルエーテル抽出物の TLC 実験結果から、抽出物は SFAE であることが確認された。この抽出物をフェノール硫酸法により定量したところ、乾熱処理時間が長くなるに伴ってデンプン粒への SFAE 吸着量の増加が認められた。また、SFAE の吸着は小麦以外の乾熱処理デンプン粒でも確認された。

Dry-heated wheat starch granule, Hydrophobicity, Sucrose fatty acid ester

講演番号：2J17a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ J校舎17会場

澱粉およびタンパク質変異に関わる新形質米の品質評価

Quality evaluation of New-characteristic rice cultivars with several variations for endosperm starches and proteins.

町田 恵佑、本間佑介、中村澄子、三浦清之[1]、笹原英樹[1]、重宗明子[1]、長岡一朗[1]、○大坪研一（新潟大・農、[1]農研機構・中央農研）

Keisuke Machida, Yusuke Honma, Sumiko Nakamura, Kiyoyuki Miura[1], Hideki Sasahara[1], Akiko Shigemune[1], Ichiro Nagaoka[1], ○Ken’ichi Ohtsubo(Niigata University, [1]NARO)

【目的】米の消費拡大のため(独)農研機構中央農業総合研究センターでは各種の多様な品質の新形質米を育成している。本研究では、これらの米飯用または加工用としての基本品質特性の物理的、化学的、生物学的評価を行い、適正用途を推定するための基礎資料とすることを目的とした。
【方法】試料米として、平成21年に北陸センターで栽培された春陽、夢十色、越のかおり、笑みの絆、北陸228号、収8223、収8140、北陸粉243号、ミルキークイーン、コシヒカリを用いた。アミロース(ヨード比色法)、糊化特性（RVA)、米飯物性（テンシプレッサー)、難消化性デンプン(メガザイムキット法)、デンプン分解酵素や細胞壁分解酵素等の各種酵素活性（メガザイムキット法）を測定した。成分および特性について、精米歩留まりが90%、80%、70%の各試料米について分析し、粒の外層から内層における諸成分・特性の変動についても検討した。
【結果】アミロース含量は粒の内層ほど高くなり、低アミロース米の最高粘度が高く、また内層ほど、高くなる傾向となった。老化性の指標となるコンシステンシーでは、高アミロース米で高く、低アミロース米で低かった。米飯物性では、表層、全体とも、粒の内層の方が軟らかくなった。酵素活性では、α―アミラーゼ活性およびキシラナーゼ活性が粒の外層で高く、内層では低くなった。一方、α―グルコシダーゼ活性では、外層よりも内層で高い活性を示した。夢十色および越のかおりは高アミロース米であり、米飯が硬くて粘りが弱い。特に越のかおりは、同じ高アミロース米である夢十色よりも老化しやすく、難消化性デンプンが多かった。一方、低アミロース米であるミルキークイーンおよび収8223は老化しにくく、米飯物性が軟らかくて粘りが強い傾向を示した。笑みの絆および北陸228号はコシヒカリよりアミロースが高く、アミラーゼ活性は弱かった。前者の米飯物性は、表層ではコシヒカリよりわずかに硬くて粘りが弱いが、高圧縮による粒全体の物性ではコシヒカリと同程度であった。北陸228号の米飯物性は、表層ではコシヒカリよりわずかに硬い以外はほぼ同等であり、粒全体の物性ではコシヒカリより硬くて粘りが弱かった。糊化特性では、BDはコシヒカリと同等だが、最終粘度が高かった。北陸粉243号は、アミロースエクステンダーの超硬質米であり、難消化性デンプンが多かった。超硬質米としては米飯物性が良好で、表層の硬さはコシヒカリと同等であり、粘りはコシヒカリよりは弱いが夢十色よりは強かった。粒全体の物性では、コシヒカリよりは硬いものの夢十色や越のかおりより軟らかく、粘りもコシヒカリよりは弱いが夢十色よりは強かった。アミラーゼ活性が強く、90%～70%の層による物性の変化がきわめて小さかった。北陸粉243号は米飯用途も可能と考えられる。

Rice, Physicochemical measurements, Quality

講演番号：2J17a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ J校舎17会場

澱粉糊化とジェランガムゲル化の順序の異なる共存ゲルの破壊構造の比較

Comparison with fractured structure of mixed gels by different sequence of starch and gellan gum gelatinization

○藤原 祥愉、森口 奈津美[1]、小林 佳祐[1]、青山 博明、猶塚 雄太[1]、中村 卓（明治大農・農化、[1]明治大院農・農化）

○Fujiwara Nagayoshi, Moriguchi Natsumi[1], Kobayashi Keisuke[1], Aoyama Hiroaki, Naotsuka Yuta[1], Nakamura Takashi (Meiji Univ., [1]Meiji Univ. Grad)

【目的】食品は多成分からなり、なかでも蛋白質や多糖類のような高分子が構造を形成し食感を発現している。それら成分の構造変化が起こる温度帯が異なるため、製造工程における加熱冷却履歴の違いにより異なる食感が発現する。これまでに加熱により糊化する澱粉とCa^{2+}存在下で冷却により熱不可逆性のゲルを形成するジェランガムを用いて、加熱冷却履歴・澱粉種・澱粉濃度の違いにより、異なる構造と物性が発現することを明らかにした[1)]。そこで今回はこれら物性の違いが発現した要因についてゲルの破壊構造の観察から明らかにすることを目的とした。

【方法】澱粉はコメ、タピオカ、バレイショの3種を用いた。最終濃度がジェランガム(0.3%)澱粉(10%)になるように調整した。ジェランガムを95℃で溶解、55℃に冷却後澱粉を添加、懸濁させた。0.04%になるようCaを添加後、A:直ちに氷水中で冷却(未糊化,ゲル化)、B:95℃で10分加熱した後氷水中で冷却(糊化→ゲル化)、C: 10分氷水中で冷却後95℃で10分加熱し再び冷却(ゲル化→糊化)。以上のように加熱冷却履歴の異なる3パターンのゲルを作製した。クリープメーターで99%圧縮した破壊ゲルを化学固定し、走査型電子顕微鏡で微細構造観察を行なった。

【結果及び考察】Cパターン(ゲル化→糊化)の応力-歪曲線においてコメではジェランガム単独よりも高い立ち上がり応力を、タピオカでは低い立ち上がり応力を示すことを報告した[1)]。破壊ゲルの構造観察からコメではジェランガムと澱粉の両方が亀裂面で観察され、両成分がネットワークを形成していることが明らかとなった。一方タピオカでは澱粉のみが亀裂面で観察され、澱粉がネットワークを形成している事が明らかとなった。以上の事から応力-歪曲線においてジェランガムと澱粉の両方がネットワークを形成するゲルでは高い立ち上がり応力を、澱粉がネットワークを形成し、ジェランガムネットワーク構造を破壊したゲルでは低い立ち上がり応力を示すと考えられる。

　またBパターンの応力-歪曲線において、高歪で破断したタピオカは破壊構造観察で亀裂面に澱粉の長い伸びが観察され、タピオカよりも低歪で破断したバレイショ、コメは亀裂面で澱粉の短い伸びが観察された。澱粉糊液の曳糸性は澱粉の種類によって異なっており、タピオカ澱粉は非常に高い曳糸性を示すことが知られている。これらのことから澱粉自身の持つ伸び(曳糸性)は応力-歪曲線の破断歪率に影響を与えると考えられる。

（１）日本食品科学工学会　2011年度大会要旨集P.71

starch, texture, fractured structure

講演番号:2J17a11
講演日時、会場:3月23日11:10～ J校舎17会場

両連続相構造を持つタンパク質・多糖類共存ゲルにおける構造破壊過程の可視化

Visualization of fracture process on microstructure of protein/polysaccharide mixed gels with bicontinuous phase structure

○青山 博明、森口 奈津美[1]、中村 卓、(明治大農・農化、[1]明治大院農・農化)
○Hiroaki Aoyama, Natsumi Moriguchi[1], Takashi Nakamura,(Meiji Univ.,[1]Meiji Univ.Grad)

【目的】ゲル状食品において、食感はおいしさを決める要因として大きな割合を占めている。その食感は食品構造が咀嚼により破壊される過程で発現する。その食品構造の主な形成成分として、高分子化合物であるタンパク質、多糖類が挙げられる。両成分を混合すると、単独成分では起きない相分離構造を形成することが知られている。前回大会において、分散相/連続相が異なる相分離構造を持つ卵白タンパク質・寒天の共存ゲルにおいて、亀裂の発生はタンパク質相と多糖類相の界面から生じるが、亀裂伝播の様子が異なることを明らかにした[1)]。また、両連続相構造(BC)を持つ共存ゲルでは、分散相構造を持つゲルと比較して大変形試験の破断後の応力低下が小さいことを明らかにした[2)]。そこで本研究では、この両連続相構造のゲルの物性を構造破壊過程から解析することを目的とした。さらに、相分離の界面から亀裂が生じることに注目し、界面相互作用の有無が構造破壊に与える影響について検討した。
【方法】両連続相構造を持つ卵白タンパク質・寒天共存ゲル(EABC)と大豆タンパク質・脱アシル型ジェランガム共存ゲル(SGBC)の作製方法は、各大会要旨集の方法に基づいた[2) 3)]。これらのゲルについて大変形試験を行ない、歪率を段階的に変えてゲルを圧縮破壊した。それら圧縮されたゲル全体をそのまま化学固定し、巨視的レベルでは目視で破壊過程を観察した。微視的レベルでは共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)と走査型電子顕微鏡(SEM)にて、ゲルの亀裂部分を観察した。
【結果及び考察】界面相互作用の無いEABCは、大変形試験において破断点以降の応力があまり低下しない応力-歪曲線を示した。巨視的亀裂観察の結果より、EABCは前回大会で報告した分散相/連続相共存ゲルとは亀裂伝播の様子が異なり、細かい亀裂が多数入り崩壊していくことが明らかとなった。SEMの微視的亀裂観察の結果より、EABCでは両成分の界面から亀裂が発生するが、連続相の部分が亀裂伝播を防いでいることが明らかとなった。このような細かい亀裂が多数発生するが、亀裂のつながりを阻害することによって応力低下を防いだと考えられる。一方、界面相互作用の有るSGBCでは、各単独成分の足し合わせ以上の立ち上がり応力を示し、より高応力、低歪率で破断点を生じた。巨視的亀裂観察の結果より、SGBCは大きな亀裂が発生、伝播し崩壊していく様子が観察された。SEMの微視的亀裂観察では、SGBCはジェランガムのネットワークが引っ張られ、界面において一部の相互侵入していない界面から優先的に亀裂が発生していることが明らかとなった。このようにネットワークが引っ張られ、一部の界面から亀裂が発生し大きな亀裂へと成長することによって立ち上がり応力の増加、低歪率で破断点を示したと考えられる。
1)日本農芸化学会2011年度大会要旨集p.229　2)第56回日本食品科学工学会大会要旨集p.121
3)第54回日本食品科学工学会大会要旨集p.150

fracture,microstructure,gel

講演番号:2J17a12
講演日時、会場:3月23日11:21～ J校舎17会場

ゼラチン/マルトデキストリン共存ゲルの構造と物性への配合とデキストロース当量の影響

Effect of gelatin/maltodextrin ratio and dextrose equivalent on microstructure and physical properties of mixed gels

○齋藤 健太、中村 卓（明治大院農・農化）
○Kenta Saito, Takashi Nakamura (Meiji Univ Grad School)

【目的】

食感は食品構造の違いにより生じる。その構造形成成分にはタンパク質と多糖類がある。これらを混合すると一般的に相分離構造を形成することが知られている。本研究ではタンパク質として冷却によりゲル化するゼラチンを、多糖類として澱粉の分解物でゲル化能のないマルトデキストリンを用いた。マルトデキストリンの濃度とデキストロース当量（DE）を変化させることで分散相サイズの異なるゲル構造（マクロ・セミマクロ・ミクロ）を形成することを明らかにした。さらに、これらの分散相サイズと割合の違いが異なる破断物性に関係していることを報告した[(1)]。そこで本研究では、全固形分濃度を固定し、配合とDEを変化させることで、ゼラチン/マルトデキストリン共存ゲルの構造と物性の相関を明らかにすることを目的とした。

【方法】

ゼラチン/マルトデキストリンの合計固形分濃度を30%、グリセリン濃度を4%に固定し、ゼラチン濃度とマルトデキストリン濃度は10-20%の間で変化させた。マルトデキストリンのDEは4・11・18を用いた。またコントロールとして水あめ（DE：63）を用いた。それぞれ調製した共存溶液を60℃で10分間加熱し、氷水で10分間冷却後、5℃で一晩冷蔵してゲルを作製した。これらのゲルについてクリープメータで破断強度試験を行った。さらに共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いてゲルの構造を観察した。

【結果】

CLSM・SEM観察の結果より、配合とDEを変化させることで、分散相サイズの異なる4種類のゲル(均質・マクロ・セミマクロ・ミクロ）の形成とゼラチン-リッチ連続相の転相を起こすことを明らかにした。DEが低くなる程、マルトデキストリン-リッチ分散相の直径が大きくなる傾向を示した。しかし、マルトデキストリン濃度が高く、転相を起こさない配合で、1μm未満の小さな分散相をもつミクロ相分離ゲルを形成した。破断強度試験の結果、分散相を形成しない均質ゲルと比較して、分散相が存在する相分離ゲルの方が、低歪率での立ち上がり応力が低くなった。10μm以上の大きな分散相をもつマクロ相分離ゲルの場合、破断後の応力が急激に減少した。1～10μmの分散相をもつセミマクロ相分離ゲルの場合、破断後の応力の減少が小さく、その後波打った波形を示した。ミクロ相分離ゲルの場合、破断後の応力の減少がさらに小さく、その後波打った波形を示した。均質ゲルでは高応力で破断する物性を示した。以上の結果から4種類の構造が異なるゲルの構造と物性の関係について考察する。

(1) 第58回食品科学工学会大会要旨集 p. 71

gelatin , maltodextrin , phase-separation

講演番号：2J17a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ J校舎17会場

卵白・寒天共存系における連続相の異なるゲルへの油脂添加の影響

Effects of oil addition on egg white protein/agar co-gels with different continuous phase.

○森口　奈津美、中村　卓（明治大院農・農化）
○Natsumi Moriguchi, Takashi Nakamura (Meiji Univ. Grad School)

【目的】
多くの食品は、複数成分から成る。この中でも、主にタンパク質や多糖類は、豆腐やプリンといったゲル状食品における構造形成成分である。これらを共存させると、タンパク質相と多糖類相に分離し分散相・連続相の相分離構造を形成する。そのため、分散相の性質が発揮されず、互いの性質を打ち消すことが多い。これまでに、卵白と寒天を共存させると3種類の相分離構造が形成されることを報告した[1)]。すなわち、①卵白分散相/寒天連続相、いずれもが連続相となる②両連続相構造、③寒天分散相/卵白連続相をとることを明らかにした。また、卵白、寒天の両成分と相互作用するカードランを添加したところ、新規な物性を示すことを明らかにした[2)]。これは、卵白・寒天の界面でカードランが仲介したことで、構造破壊の発端である界面構造が変化したためと考えられる。そこで、界面構造に注目し、乳化能の有(卵白)無(寒天)の視点から、油脂を卵白・寒天共存ゲルに添加した。以上のことから、本研究の目的を連続相の異なる3種類の相分離構造への油脂添加の影響を明らかにすることとした。
【方法】
最終濃度を卵白溶液では8.78/8.13/7.48%、寒天溶液では0.97/1.12/1.27%となるように調整し、それぞれを混合した。そこに、最終濃度5%となるように油脂を添加し、真空乳化機で乳化した溶液を作製した。この溶液を95℃で10分間加熱後、氷水中にて10分間冷却、6℃で一晩冷蔵しゲルを作製した。このゲルをクリープメータにて、破断試験を行なった。さらに、各成分の分布観察として共焦点レーザー走査顕微鏡を、微細構造観察として走査型電子顕微鏡を用いて構造観察を行なった。
【結果】
異なる3種類の連続相構造に油脂を添加したところ、①寒天連続相濃度では物性の変化が見られなかった。しかし、②両連続相濃度では破断点が低応力・低歪側へシフト、③卵白連続相濃度では低歪率において応力が低下した物性を示した。また、相分離構造の観察では卵白のネットワークに油滴が存在している様子が観察された。このため、卵白が連続体となる濃度帯では物性が変化したと考えられる。一方で、寒天連続相濃度では、寒天・卵白の界面に油脂が存在している様子が観察された。従って、構造破壊の発端である界面構造が変わらず、物性の変化が見られなかったと考えられる。以上から、異なる連続相構造に油添加すると、卵白の存在状態が変わり、物性が変化することが明らかとなった。卵白、寒天、油の界面構造を、微細構造観察より考察する。
1) 日本農芸化学会 2011年度大会講演要旨集 p.230
2) 日本食品科学工学会 第57回大会講演要旨集 p.86

phase separation, bicontinuous, emulsification

講演番号：2J17a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ J校舎17会場

タイトル　ポリグリセリン脂肪酸エステル/水/食用油系のX線散乱測定

Title　X-ray scattering measurement for polyglycerine fatty acid ester/water/vegetable oil system

○合谷祥一、池田新矢，片山円佳（香川大・農）

○Shoichi Gohtani, Shinya Ikeda, Madoka Katayama (Kagawa Univ.)

【目的】　我々はこれまでポリグリセリン脂肪酸エステル/水/食用油系を対象として，系の化学組成を操作することにより大きな機械的エネルギーを付与せずに乳化系が生成するいわゆる界面化学的乳化現象の機構について検討してきた．その結果，本系の界面化学的乳化の初期において液晶構造の形成がナノサイズのエマルションの生成に重要であることが明らかとなった．今回はポリグリセリン脂肪酸エステル/水/食用油系の小角および広角X線散乱測定をおこない，脂肪酸鎖の長さ，グリセリンの数，水及び油との混合割合等の条件と形成される液晶構造との相関を明らかにすることを目的とした。

【方法】　デカグリセリンモノカプリン酸エステル（MCDG)、デカグリセリンモノミリスチン酸エステル（MMDG)、デカグリセリンモノラウリン酸エステル（MLDG)、ヘキサグリセリンモノラウリン酸エステル（MLHG）それぞれと水の割合を変えて混合し、加熱溶解した後撹拌、25℃で一日静置した。また、油が全体の 5%を占める状態でも同様に調製した。小角および広角Ｘ線散乱測定はリガク製 Nano-Viewer（40kV，30mA）を用い，25±1℃で行った．小角 X 線散乱測定及び広角Ｘ線散乱測定から，Brag の式を用い，それぞれ，ポリグリセリン基同士の間隔（長面間隔）及び脂肪酸鎖同士の間隔（短面間隔）を求めた。

【結果】　液晶が形成されたのはMMDG及びMLHG系であり、MCDG及びMLDG系では液晶が形成されずスポンジ相を形成し，脂肪酸鎖の長さとグリセリン数のバランスが液晶形成に重要であると考えられた。水の割合が高くなるにつれ長面間隔は大きくなった。これは面と面の間に水分子が入り込むことが原因であると考えられた。長面間隔の大きさは全体として脂肪酸鎖の長さに比例して大きくなった。

長面間隔が大きい系ほど、全体として短面間隔が小さくなる傾向が見られた。このことから、面と面の間に水分子が多く存在する場合、脂肪酸鎖同士は間隔が狭くなるということが考えられた。油が全体の5%を占める系では、短面間隔はどれも大きくなる傾向があり、脂肪酸鎖が長いポリグリセリン脂肪酸エステルほど短面間隔は大きくなった。これは脂肪酸鎖が長いほど油脂と親和性が高いため、油脂が脂肪酸鎖の間に入り込みやすいためだと考えられた。

形成された液晶の全てにラメラ構造が含まれていたが，試料によっては同時にヘキサゴナル及びキュービック構造の形成も示唆された。

x-ray scattering, polyglycerine fatty acid ester, emulsion

講演番号：2J17a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ J校舎17会場

加工デンプン添加がプロセスチーズの物性・構造に与える影響

Effect of modified starch addition on physical properties and microstructures of process cheese.

○芳 一尚、山住 弘、小杉 達也、磯貝 朋之、武藤 高明、佐藤 早華[1]、中村 卓[1]
（雪印メグミルク株式会社・ミルクサイエンス研究所、[1]明治大農・農化）
○ Kazunao Fusa, Hiroshi Yamazumi, Tatsuya Kosugi, Tomoyuki Isogai, Takaaki Mutoh, Hayaka Satoh[1], Takashi Nakamura[1] (Megmilk Snowbrand Co.,Ltd., [1]Meiji Univ.)

【目的】世界的に乳原料、乳製品が不足し、国際市場価格も高騰している昨今、原料チーズの使用量を減らしつつも、通常のプロセスチーズと遜色の無い風味、物性、機能性等を備えた代替製品の開発への期待は大きい。そこで本研究では、代替製品調製のための原材料として加工デンプンに注目し、プロセスチーズに各種加工デンプンを添加した時の物性・構造への影響について検討した。
【方法】１１種類の化学処理加工デンプンについて、加工デンプンの添加率が最終製品中５％となるようにモデルプロセスチーズ（以下、モデルチーズ）に添加した。モデルチーズはステファン型乳化機を用いて調製し、乳化仕上り時のみかけ粘度を測定した。また、冷却したモデルチーズの圧縮特性をテクスチャーアナライザーにより、微細構造を共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)および走査型電子顕微鏡(SEM)により評価した。更に風味発現性については、モデルチーズの水相側、油相側にそれぞれフレーバー物質を添加し、官能評価により評価した。
【結果】１１種類の加工デンプンの添加試験を実施した結果、酸化デンプンのみが乳化仕上り時に大きな粘度上昇を引き起こすことなく、加工デンプン無添加品と同等の硬さを示した。一方、他の加工デンプンについては、乳化仕上り時の粘度が加工デンプン無添加品に比べ大きくなり、通常のプロセスチーズとは異なる物性となった。また、官能評価の結果、酸化デンプン添加系ではフレーバーリリースが良い傾向も認められた。微細構造観察の結果、酸化デンプンを添加したプロセスチーズは、チーズ組織中に特徴的なデンプンの小さな島構造（相分離構造）を形成しており、他のデンプン添加プロセスチーズとはやや異なる構造を形成することにより、物性発現やフレーバーリリースの違いに影響を及ぼしていると推察した。

process cheese, modified starch, microstructure

講演番号：2J17p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ J校舎17会場

ハイアミロース小麦粉の加工特性と美味しさについて

Processed-properties and taste of high-amylose wheat flours

○前田　智子、田中　香織[1]、森田　尚文[2]（兵教大院、[1]兵教大、[2]（株）FUDAI）
○Tomoko Maeda, Kaori Tanaka[1] , Naofumi Morita (Grad. School of Educ., Hyogo Univ. of Teach. Educ., [1]Hyogo Univ., of Teach. Educ., [2]FUDAI Co., Ltd.)

【目的】小麦粉で作られる加工食品は多種多様であり、幅広い年齢層に親しまれている。なかでもパンや菓子類は、ファーストフードの普及、安価、手軽さなどの理由から、現代人の生活様式にも合い、朝食の主食に代わり、または、おやつとしても気軽に食べられている。しかし、一方で急激な食生活の移り変わりと共に、生活習慣病や肥満などの傾向にある現代人も増えつつある。このような状況を軽減可能と期待される新しい食品素材のひとつに、ハイアミロース小麦がある。ハイアミロース小麦は、食物繊維や難消化性澱粉を多く含み、様々な生理作用を促し、肥満予防、血糖値上昇を緩和する等の効果があると報告されている。本研究では、ハイアミロース小麦粉を用いて製パンおよび製菓を行い、その最終製品の美味しさと機能性について検討した。また、ハイアミロース小麦を部位別に製粉し、部位別小麦粉の特徴を、最終製品の外観、味、食感等の違いから比較し、各部位のハイアミロース小麦粉の性質と機能性についても検討した。
【方法】市販小麦粉をコントロールとし、ハイアミロース小麦を外層部、中間部、中心部から部位別に小麦粉を製粉調製し、一般の調理書に準じて食パンとドーナツを調製した。各部位のハイアミロース小麦粉は、市販小麦粉の 10-50%迄代替して使用した。食パンについては、その色彩、テクスチャー、保存性および味覚について、測色計、クリープメーター、味覚センサー、官能評価により調べた。ドーナツについては、ハイアミロースの揚げ菓子への利用を調べるため、吸油性を測定すると共に、最終製品の物性と美味しさについて、クリープメーターと官能評価により調べた。食パン、ドーナツいずれにおいても、それらの品質をコントロールと比較し、嗜好性、機能性の面から、ハイアミロースの利用効果について、部位別に総合的な評価・検討を行った。
【結果】ハイアミロース小麦粉を用いたパンは、コントロールパンと比べて、外観、味、食感ともに異なっていた。市販小麦粉の10%をハイアミロース中間部で代替したパンは、凝集性が高く、高い保存性があり、官能評価では、「気泡の大きさ」「舌ざわり」「硬さ」「フワフワ感」「味」「甘さ」「香り」「総合評価」で、最も良好とされた。味覚センサーでは、コントロールよりも苦味・雑味がなく、旨味・コクがあると認識された。従って、部位別ハイアミロース小麦粉は中間部が最も好まれ、次に中心部、外層部と大差なくコントロールと続いた。一方、揚げ菓子への利用については、部位に関わらず20%代替でハイアミロースを含むドーナツは、コントロールよりも低吸油性を示し、代替量増加に比例して低吸油性は向上した。また、その性質は特に外層部で顕著であった。しかし、ドーナツとしての美味しさを考慮すると、ハイアミロース外層部よりも、中間部と中心部を含むハイアミロース内層部を含むドーナツは、低吸油性でかつ味テクスチャーともに良好であり、コントロールドーナツと同程度の品質を保持していた。以上の結果より、ハイアミロース小麦粉は小麦粉製品の品質に新たな付加価値を与える有効な新規素材と考えられた。

high-amylose, wheat flour, bread

講演番号：2J17p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ J校舎17会場

各種米粉の製パンおよび製菓特性について

Baking and confectionary properties of various rice flours

前田　智子、○森田　尚文[1]（兵教大院、[1]（株）FUDAI）
Tomoko Maeda, ○Naofumi Morita[1] (Grad. School of Educ., Hyogo Univ. of Teach. Educ., [1]FUDAI Co., Ltd.)

【目的】食生活の変化と加工や業務用需要の高まりと共に、国内生産が十分に対応できず我が国の食料自給率は低下しつつある。一方で、国内で唯一自給可能な米の消費量は一貫して減少傾向にあり、国内米飯用需要は、一人当たりの米消費量の減少と人口減少の相乗効果により今後も減少する可能性が大きい。近年「米穀の新用途への利用の促進に関する法律」が施行され、主食用米以外、即ち米粉用米の有効利用が望まれつつある。小麦粉と比較し、米粉製品にはもっちり感、低吸油、優れたアミノ酸スコア等の特徴があり、小麦粉への代用により食料自給率向上にも繋がる。そこで本研究では、各種米粉の製パン・製菓特性を調べ、米粉の有効利用について検討した。
【方法】精白米と古代米由来の米粉を用いて蒸しパンやスポンジケーキを調製した。品質改善のため各種澱粉も併用し、その配合比について詳細に検討した。蒸しパン生地の形態は SEM で観察し、パンやケーキの品質は、外観や内相の状態、膨らみを調べ、テクスチャーや保存性、味についてはクリープメーターによる最大荷重や凝集性と味覚センサーや官能評価により測定した。
【結果】各種米粉による蒸しパン生地の SEM 観察では、精白米粉と古代米（紫黒米）粉とでは異なる形態を示した。単独では粘性を示さなかったリン酸架橋澱粉、ヒロキシプロピル化リン酸架橋澱粉を併用した紫黒米粉ベースの生地では、同じ加水量であるにも関わらず、精白米粉ベースの生地と比較し、全体にべったりとしていた。この紫黒米粉ベースの蒸しパン生地のミキシングおよび醗酵直後の湿った粘性生地形態は、製パン工程中でのガス保持力を高め、良好な醗酵特性にも繋がるものと推察された。紫黒米粉ベースの蒸しパンの官能評価では、口ざわり、舌ざわり、ソフト感などで高スコアが得られ、その傾向は特にリン酸架橋澱粉併用で顕著であった。更に食味やテクスチャーにおいても高スコアを示し、精白米粉ベースの蒸しパンに有意に劣らない品質を示した。一方、ケーキについても、精白米粉は各種澱粉と併用することで、物性、味覚ともに良好な米粉ケーキを調製できた。特に、精白米粉にヒドロキシプロピル化リン酸架橋澱粉とタピオカ澱粉を併用させたスポンジケーキは、膨らみも大きく柔らかいものとなり、官能評価でも高スコアが得られた。この製品を水抽出し、味覚センサーで分析した結果、特にうま味が高く、雑味が低下する傾向を示し、この結果は、官能評価での味や総合評価における高スコアに繋がるものと考えられた。以上の結果より、米粉を製パンや製菓に利用する場合、単独よりも各種加工澱粉等を併用することで、より良好な品質の米粉製品の調製が可能であることがわかった。更に、その併用は、精白米ではない紫黒米由来の米粉においても有効であった。従って、各種澱粉併用は、精白米のみならず玄米による米粉にも有効であり、これらの組み合わせにより、米粉の幅広い実際利用の可能性が期待された。

rice flour, bread, cake

講演番号：2J17p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ J校舎17会場

グミキャンディの物性への甘味糖の種類の影響

Effect of sweet sugars on physical properties of gummy candies

○山下　朋子、奥本　泰一[1]、村山　浩昌[1]、関口　直樹[1]、加来　俊治[1]、中村　卓（明治大院農・農化、[1]カンロ（株））

○Tomoko Yamashita, Hirokazu Okumoto[1], Hiroaki Murayama[1], Naoki Sekiguchi[1], Syunji Kaku[1], Takashi Nakamura (Meiji Univ.Grad School, [1]Kanro Co.,Ltd.)

【目的】グミキャンディは糖濃度が高くゼラチンがネットワーク構造を形成していることから、噛み応えのある食感が特徴のお菓子である。ゼラチングミキャンディでは、主成分である甘味糖が食感に影響を与える。近年、甘味糖の多種化や消費者の嗜好の多様化により、市販されている製品の多くはさまざまな種類の甘味糖が併用されている。これらの併用によりグミキャンディの食感は変化するが、その要因は明らかとなっていない。そこで、本研究ではゼラチングミキャンディの甘味糖の種類を変えることによる物性への影響を調べた。

【方法】ゼラチン５％に対し、甘味糖の種類を変えてグミキャンディを作製した。甘味糖は水飴のみをコントロールとし、水飴の４割を他の甘味糖に置換した。他の甘味糖は、単糖類（グルコース・フルクトース）、二糖類（スクロース・マルトース・トレハロース）、単糖アルコール類（ソルビトール・エリスリトール・キシリトール）、二糖アルコール類（パラチニット・マルチトール）の計１０種類を用いた。これらグミキャンディに対して物性測定では破断試験を行い、構造観察では走査型電子顕微鏡（SEM）を用いた。糖溶液は、グミキャンディと同様に水飴のみと水飴の４割を他の甘味糖に置換した溶液（Bx. 70、75、77、80、82）を得た。糖溶液の物性測定では動的粘弾性測定を行った。糖の自由水の測定では^{1}H-ＮＭＲによりスピン-スピン緩和時間（T_2）を測定した。

【結果】グミキャンディの破断試験では、甘味糖の種類の違いによりグミキャンディの物性に違いがみられた。その中で水飴・フルクトース・スクロース・パラチニットにおいて物性に特徴がみられた。しかし、甘味糖の種類の違いによってグミキャンディの構造に違いはなく、どのグミキャンディも均質な構造であった。このことからグミキャンディの物性には甘味糖の物性が影響していることが示唆された。糖溶液の動的粘弾性測定では、甘味糖の種類の違いにより損失弾性率（G”）が異なった。G”が高い甘味糖ほどグミキャンディの物性における低歪率での応力も高くなり、糖溶液のG”とグミキャンディの応力の大きさの順番が一致した。また、糖溶液のＮＭＲ測定により得られたT_2緩和時間では、T_2緩和時間が短いほど糖溶液のG”は高くなる傾向がみられた。このT_2緩和時間は、糖の水酸基の赤道方向を向いているエカトリアル結合（e-ＯＨ基）の数とも相関がみられ、e-ＯＨ基の数が多いほどT_2緩和時間は短くなった。このことから、甘味糖の種類の違いによって同じ固形分濃度でも自由水の量が異なり、その自由水の量が少ないほどグミキャンディの物性は硬くなると考えられる。

Gummy candies, Viscoelasticity, Spin-spin relaxation time

講演番号：2J17p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ J校舎17会場

糖-リン酸2成分水溶液の組成比によるガラス転移温度の異常上昇

Irregular increase of glass transition temperature in sugar-phosphate mixture solution

○中島　美沙子、渡辺　学、川井　清司[1]、鈴木　徹（海洋大・海洋科、[1]広大院・生物圏科学）
○Misako Nakajima, Manabu Watanabe, Kiyoshi Kawai[1], Toru Suzuki (Kaiyodai,[1]Hirodai)

【目的】糖類に電解質を添加した水溶液において、その凍結濃縮層のガラス転移温度Tg’は、一般に電解質の濃度と共に単調に上昇あるいは降下をみせる。これは、よく知られるCauchman 式、あるいはGordon-Taylor式によって表される。しかし、リン酸を含む電解質水溶液の場合、その組成比－Tg’曲線は、ある組成比で最大値を取るような上に凸なカーブを示すことがある。こういった特異な現象を示す原因を理解することは、ガラス転移温度により最適な操作条件が変わる酵素の凍結乾燥等で重要となる。本研究では糖とリン酸の種類を変え、上記現象を調べ、分子種による相違を明らかにした上で、不凍水含量との相関を検討し相互作用の影響について考察した。
【方法】試料は糖（グルコース：Glu,スクロース：Suc,マルトース：Mal,）とピロリン酸カリウムの混合水溶液、または糖（ソルビトール：Sorb,フルクトース：Fruc,マルトース：Mal）とトリポリリン酸ナトリウムの混合水溶液を用いた。それぞれの組み合わせ試料ごとに組成比を変化させ、凍結濃縮層のガラス転移温度および氷の融解エンタルピーをDSCにより求めた。DSCは島津DSC50を用い冷却、昇温速度それぞれ2℃/min で-80℃から27℃の範囲を走査した。
【結果】Glu,Suc,Malにピロリン酸カリウムを添加した試料はいずれもモル分率0.8付近で最も高いTg’値を示した。同様に、Malにトリポリリン酸ナトリウムを添加した試料もモル分率0.8付近で、最も高いTg’値を示した。Fruc,Sorbiにトリポリリン酸ナトリウムを添加したものはいずれもモル分率0.1～0.8間で最も高いTg’値を示した。また、トリポリリン酸ナトリウムとマルトース混合物について、不凍水量はモル分率0.8付近で最小となる傾向を示した。これより組成比により分子同士の会合が最大となることがあり、それが水和量に影響を与えると共に、ガラス転移温度の上昇をもたらすと推察される。

Glass transition temperature, Phosphate, Sugar

講演番号：2J17p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ J校舎17会場

アレンガとサゴ澱粉のレオロジー及び熱的性質

Rheological and Thermal Properties of Arenga and Sago Starches

○Dede Adawiyah[1, 2], 佐々木 朋子[1], 神山　かおる[1] ([1]農研機構・食総研、[2]ボゴール農業大学)
○Dede Adawiyah[1, 2], Tomoko Sasaki[1], Kaoru Kohyama[1] ([1]NFRI-NARO, [2]BAU)

【Objectives】Palm is one of important sources of starch in Indonesia. Starches prepared from the pith of several genera of palm such as *Metroxylon* (spesies *Metroxylon Sago*) and *Arenga* (spesies *Arenga pinnata*) are commercially available. Characterization of sago starch from *Metroxylon sago* has been extensively studied, while informations about arenga starch were very limited. The objectives of this research were to study the rheological and thermal properties of arenga starch, and compare arenga and sago starches.
【Methods】Arenga and sago starches were obtained from the starch industries in West Java, Indonesia. Amylose contents were analyzed by a Megazyme kit for amylose/amylopectin assay (K-AMYL, Megazyme International Ltd., Ireland). Rheological measurements were carried out in modes of viscometric flow test, and oscillatory stress- and frequency-sweep tests by a stress controlled rheometer (AR-G2, TA Instruments, New Castle, USA). Differential scanning calorimetry (DSC) was done to analyze the thermal properties by an SSC5200H system with a DSC120 module (Seiko Instrument, Tokyo).
【Results】Rheological characteristics and thermal or gelatinization properties of arenga and sago starches were significantly different even though their amylose contents were similar (36-37%). Arenga and sago starches at low concentrations (2 and 3%w/v) showed shear thinning behavior (flow behavior indexes were 0.57 - 0.64). Sago starch paste was considerable more viscous than arenga starch. Based on dependency of viscoelastic parameters (storage modulus G', loss modulus G" and tan δ) in frequency sweep tests, minimum concentration for gel forming of sago starch was 1.8%w/v while that of arenga starch was 2.4%w/v. On the contrary, at high concentrations (10 and 20%w/v), magnitude of G' of arenga starch gel was 2.4 times greater than sago starch. Gelatinization characteristics from DSC revealed that peak temperatures of both starches was similar (about 67°C), but arenga starch exhibited slightly smaller gelatinization enthalphy and narrower range of gelatinization endotherm than sago starch.

Viscosity, viscoelastic, gelatinization

所属　Bogor Agricultural University, Indonesia

講演番号：2J17p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ J校舎17会場

凍結含浸法による形状保持軟化素材の力学物性

Texture of softened foodstuffs processed by freeze-thaw infusion of macerating enzyme

○中津沙弥香、神山かおる[1]、渡邊弥生、柴田賢哉、坂本宏司（広島総研・食品工技セ、[1]農研機構・食総研）

○Sayaka Nakatsu、 Kaoru Kohyama[1]、 Yayoi Watanabe、 Kenya Shibata、 Koji Sakamoto (HiTRI-FTRC、[1]NFRI-NARO)

【目的】凍結含浸法は、食品素材内部へ物質を急速含浸する加工技術である。本法によりペクチナーゼやプロテアーゼを含浸することで、素材の形状を保持したまま、中心部までほぼ均一に軟化させることができる。本法による新しい介護食の開発を目的として、これまでに様々な食品素材の調製条件を明らかにしてきた。その指標には主に硬さを用いてきたが、介護食としての適性を評価し、改良していくためには、さらに詳細な力学特性の解析が必要である。本研究では、代表的な５種類の軟化素材を用いて、機器測定により得られる様々な物性値から力学特性を考察した。さらに、素材の繊維質感を簡易に評価する方法を検討した。

【方法】試料には、凍結含浸法により軟化処理したタケノコ、ゴボウ、レンコン、タラおよびシイタケを用いた。機器測定には山電製CREEP METER(RE-33005)を用いた。直径3mmの円筒型プランジャーにより、10㎜/s の等速運動で、試料の厚さ95％歪率まで2回圧縮する2バイトテクスチャー試験を行った。付属のソフトウエアを用いて、荷重、もろさ、付着性、凝集性、第1バイトおよび第2バイトの仕事量を算出した。繊維質感は、約5gの秤量試料をメッシュ上で潰し、残存する固形物を繊維性残渣量として測定した。

【結果】機器測定の結果、軟化素材によって異なる力学特性を示し、いずれの物性値にも有意差が認められた。タケノコ、ゴボウ、レンコンには破断点が認められ、そのときの歪率が大きい値を示すほど、もろさ、最大荷重が大きくなった。また､最大荷重が同等であっても､波形によって第１バイトの仕事量は異なった。これらのことから､硬さの評価には､荷重の他､仕事量も必要であることが示唆された。タラ、シイタケには破断点が認められず、歪率に比例して荷重値が増加した。これら２素材の第１バイトの波形は類似しているが、付着性には大きな違いが認められ、タラは５素材の中でもっとも大きく、シイタケはもっとも小さい値となった。タケノコ、シイタケの凝集性は、有意に他の素材よりも大きかった。これらの物性値は、硬さ以外の食べ易さを評価するための指標になり得ると考えられた。繊維性残渣量については、タケノコでは検出されなかった。他の４素材については､繊維性残渣の含水率に違いが認められ、シイタケ、ゴボウでは、レンコン、タラより水分を含み易い性状であった。これら機器測定と繊維性残渣量から得られる力学特性の結果は、凍結含浸法による形状保持軟化素材の物性による分類を可能とし、介護食としての適性を評価するための指標になり得ることが示唆された。

freeze-thaw infusion (FI)、 softening、 mechanical properties

講演番号：2J17p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ J校舎17会場

凍結含浸法により調製した食品の咀嚼筋筋電図

Electromyographic Study of Softened Foods Processed by Freeze-thaw Infusion of Macerating Enzyme

○神山　かおる、中津　沙弥香[1]、渡邊　弥生[1]、柴田　賢哉[1]、坂本　宏司[1]（農研機構・食総研、[1]広島総研・食品工技セ）

○ Kaoru Kohyama, Sayaka Nakatsu[1], Yayoi Watanabe[1], Kenya Shibata[1], Koji Sakamoto[1] (NFRI-NARO, [1]HiTRI-FTRC)

【目的】前報において、凍結含浸技術により食品素材の形状を壊さずに軟化させた食品素材[1)]の、硬さ、付着性等の力学特性、及び繊維性残渣量を測定し、素材の特色を示した。これらの機器測定値は、摂食前の状態を分析したものであるため、口腔内でのまとまり易さや飲み込み易さ等のように、摂食開始後に口腔内で変化した食品のテクスチャーによって決定される性質と、直接対応づけることは困難と考えられる。そこで、健常成人による咀嚼筋筋電位測定[2)]を行い、摂食中のテクスチャーを反映する測定値を得て、機器分析結果との関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】試料は前報と同じ、タケノコ、ゴボウ、レンコン、タラ、シイタケの凍結含浸法により調製した食品5種とした。ヒト咀嚼試験は、食品総合研究所の倫理委員会の承認後、被験者から同意を得て行った。被験者は30～40代の健康な成人6名（男性2名、女性4名）で、閉口する際に活動する左右の咬筋、及び開口する際や嚥下開始時に食塊を口腔から咽頭へ移送する際に活動する舌骨上筋群に表面電極を装着し、筋電位を測定した[2)]。被験者には、試料5gをランダムな順番で供し、できるだけ自然な咀嚼・嚥下を行わせ、嚥下を行う際にボタンを押し合図させた。

【結果】咀嚼時間はシイタケが最も短く、レンコンが最も長かった。摂食終了までの咬筋の総活動量は、タケノコが最低、レンコンが最高であり、必ずしも時間と筋活動量が同じ大小関係にはなかった。また咀嚼周期の平均値は、シイタケが最短、タラが最長であった。素材による有意差は、以上の3パラメータで認められたが、舌骨上筋群で求めた筋電位パラメータには有意差が検出されなかった。このことから、素材のテクスチャー特性は、咬筋活動に及ぼす影響がより大きいと考えられた。繊維性残渣量は、総咀嚼時間や咬筋の総活動時間との間に有意な正の相関が認められたため、素材の食べ易さの指標になることが示唆された。付着性は、咬筋の咀嚼1回当たりの平均活動時間、舌骨上筋群の1回当たりの平均筋活動量、平均周期との間に、有意な正の相関関係が認められた。付着性の強い食品は、周期的な運動時間の間隔を延長させ、開口の仕事量を増加させる傾向があったため、嚥下を難しくさせている可能性があると考えられた。硬さの他に、繊維性残渣量と付着性が、筋電位パラメータに影響を与えており、食べ易さを解析するには重要な因子であることが示唆された。

【文献】1）坂本宏司ら，*食科工*，**51**，395-400（2004）.
2）Kohyama, K. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 358-365 (2007).

texture, electromyography, freeze-thaw infusion (FI)

講演番号：2J17p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ J校舎17会場

大豆タンパク質凍結変性の速度論的解析

Kinetic analysis of freeze-denaturation of soyprotein

○西野　裕貴、宮脇　長人(石川県大・生資環)
○Hiroki Nishino, Osato Miyawaki　(Ishikawa Prefectural Univ.)

【目的】凍結においては、水の凍結と同時に塩や酸の濃縮による pH 変化、分子内疎水性相互作用変化、SS-SH 交換反応等の諸変化を伴う。タンパク質の凍結変性は、凍結の際の氷結晶生成による凍結濃縮による濃縮部分が反応場となり、タンパク質変性が開始・進行する。本研究では、大豆タンパク質(SPI : Soyprotein isolate)溶液を凍結後、SPI の凍結変性速度を解析する。また、SPI 溶液にスクロースを添加し、その影響についても検討した。

【理論】タンパク質変性を凍結によって体積が(1/α)に減少した反応場でのα倍に濃縮されたタンパク質(C_N)の n 次反応とすると、次の反応速度式を得ることができる。

$$-(\alpha C_N/dt)=(1/\alpha)\,k\,(\alpha C_N)^n = k\,\alpha^{n-1}C_N^{\,n} \quad \cdots(1)$$

ここで k は反速速度定数である。この式は、n>1 で凍結濃縮により反応は加速、n<1 で減速、n＝1 で変化しないことを意味している。

【方法】単離大豆タンパク質(SPI : ニューフジプロ,不二製油)を 8w%となるように蒸留水で調整した。その溶液をホモジナイズ(15000rpm, 5 分, 室温)した。この懸濁液を遠心分離(10000rpm,15 分,4℃)し、不溶性固形分を除去後、上清をとり 0.032w%となるように希釈し、それぞれの溶液にスクロースを 0%, 0.1%, 1%となるように添加した。これを多数のプラスチック製のフタ付き試験管に 10ml ずつ分注し、-10℃, -18℃, -40℃の各温度で保存した。一定間隔ごとに試験管を取り出して、室温で解凍し、分光光度計 600nm で変性 SPI 濁度を測定した。さらに、遠心分離(12000rpm,15 分,4℃)で変性タンパク質を除去し、吸光度 280nm で未変性タンパク濃度を測定した。

【結果】SPI凍結保存中の沈殿物濃度変化および上清中のタンパク質濃度から変性SPI濃度の増加と未変性SPIの減少が確認され、その現象は時間が経過するにつれて進行した。このことから、SPIタンパク質の凍結変性は時間依存的であることが確認された。SPI変性は未凍結状態では全く起こらないことから、凍結変性は式(1)に示すように凍結に伴うタンパク質の凍結濃縮が反応の引き金となっていることがわかった。一定の濃度条件下でのSPIの凍結変性速度は、保存温度が高くなるにつれて変性速度が増大し、凍結変性速度の温度依存性が確認された。一定の温度条件下では、スクロース濃度が高くなるにつれてSPIの凍結変性速度が減少した。スクロースの添加は、スクロースに対する水和水を増加させたため、凍結濃縮の際の式(1)における濃縮倍率αを減少させる効果があり、このことによりスクロースはSPIの凍結変性速度を抑制している。さらにこのことは式(1)においてn＞1であることも示している。

freeze-denaturation , soyprotein,

講演番号：2J17p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ J校舎17会場

κ-カラギーナンのゾル・ゲル転移における低分子共存溶質の影響

Effect of low-molecular cosolute on sol-gel transition of κ-carrageenan

○松平 景子、宮脇 長人（石川県大院・生資環）
○Keiko Matsuhira, Osato Miyawaki (Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】カラギーナンは直鎖含硫黄多糖類の一種で、紅藻類から得られる。チョコレートミルク、飲料、ジャム、ゼリー、ソース、ケチャップなどの安定剤、分散剤、乳化剤、ゲル化剤などに用いられる。カラギーナン水溶液において、その物理的性質は、カラギーナンの硫酸基による静電的相互作用および、分子間水素結合などにより強く影響される。本研究では、κ-カラギーナン水溶液における高分子間相互作用の解析のため、ゾル・ゲル転移点近傍における熱的性質および力学的性質に及ぼす共存低分子溶質の添加効果を解析した。

【方法】0、0.5、1.0、1.5mol/kg 濃度のスクロース、リボースなどの糖類、および尿素などの低分子溶液中における 0.5% κ-カラギーナンのゾル・ゲル転移挙動を高感度示差走査熱量計(Micro DSCⅢ, Setarum)により解析した。また、振動粘度計（FMV80A-Ex, 山一電機）により低分子溶液濃度や温度を変化させκ-カラギーナン溶液の粘度変化を測定し、低分子溶質の共有によるκ-カラギーナン分子間相互作用への影響を検討した。また、低分子溶質のみの溶液粘度変化は毛管粘度計により測定した。

【結果】κ-カラギーナンのゾル・ゲル転移挙動はKClの添加により大きく影響され、KCl濃度が高くなるとゾル・ゲル転移温度は上昇した。これはKClの添加がκ-カラギーナン分子間静電的相互作用に影響を及ぼすためである。そこで、以下これを40mMKCl添加の一定条件とした。また、κ-カラギーナン濃度については、これを0.5%とした。この条件では還元粘度が極限粘度とそれほど違っておらず、高分子間相互作用のあまり強くない希薄条件であると考えられる。κ-カラギーナンは、スクロースを加えるとゾル・ゲル転移温度が上昇し、ゲルが安定化した。また、リボースを加えた場合では、ゾル・ゲル転移温度はほぼ一定であった。一方、尿素を加えた場合は、ゾル・ゲル転移温度は下降し、ゲル状態が不安定化することが分かった。

次に、ゾル・ゲル転移点近傍におけるκ-カラギーナン分子間相互作用を解析するために、粘度の濃度依存性を解析した。ゾル状態である62℃からスタートして、温度を下降させながら粘度変化を測定すると、ゾル・ゲル転移点に近づくにつれて粘度は大きく増大し、この傾向はスクロース＞リボース＞尿素の順であった。そこで、温度を添加物のないκ-カラギーナンのみのゾル化温度55℃に近い56℃に固定して、各種添加物の濃度を変化させて粘度を測定した結果、いずれの場合においても溶液粘度ηは、溶質濃度の増加とともに増加した。しかしながら、この粘度変化から、低分子溶質のみの溶液粘度η_0変化を補正するため、比粘度[$\eta_{sp}=(\eta-\eta_0)/\eta_0$]を求めて比較した結果、比粘度の変化はやはり、スクロース＞リボース＞尿素の順であったが、その差はそれほど大きくはなく、これは高分子濃度が希薄条件であるため、高分子間相互作用がそれほど強くないことの反映であると思われた。

κ-Carrageenan, Sol-gel transition

講演番号：2J17p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ J校舎17会場

高分子水溶液の Newtonian domain での見かけの粘度と極限粘度の解析

Analysis of apparent viscosity at Newtonian domain and intrinsic viscosity of aqueous macromolecular solutions

○佐藤　之紀，宮脇　長人[1]（県立広島大・生命環，[1]石川県大・生資環）
○ Yukinori Sato, Osato Miyawaki[1] (Prefectural University of Hiroshima, [1]Ishikawa Prefectural University)

【目的】高分子水溶液の粘度を Newtonian domain での見かけの粘度（$\eta^a{}_H$）と規定して，$\eta^a{}_H$ に関する溶液物性パラメータを提示し，無限希釈状態での分子量を反映する極限粘度［η］と比較して，高分子間相互作用のパターン化を試みた。
【方法】ポリエチレングリコール（PEG35000），デキストラン T40（Dex），ペクチン（Pec），アルギン酸ナトリウム（Alg），キサンタンガム（Xan）の 0.01-0.03 %水溶液を調製し，キャノンフェンスケ粘度計で測定した 25℃でのそれらの高分子水溶液の動粘度と密度（g/ml）から η を求め，濃度（g/ml）と η_{sp}/C （ただし，C は濃度(%)）の関係から［η］を推定した。また，回転粘度計を用いて測定した 0.5%高分子水溶液のずり速度に関係なく一定値を示す Newtonian domain での高分子水溶液の粘度（$\eta^a{}_H$）をもとに，高分子水溶液の比粘度（η_{sp}）を高分子濃度（%）C で除した溶液物性パラメータ $\eta^a{}_{red}$ や 5～40℃の温度変化にともなう $\eta^a{}_H$ の変化から活性化エネルギー（E_a）を求めた。一方，高分子水溶液にスクロースを加えて A_w に伴う η_{sp} の変化（$-d\eta_{sp}/dA_w$）を求め，スクロースの水和にともなう Solvent-ordering の進行に起因する高分子間相互作用の変化を追跡した。
【結果】［η］は，分子量に対応していることが知られており，ここで示した 5 種類の高分子においても，平均分子量のオーダーをほぼ反映していた。$\eta^a{}_{red}$ も，高分子の分子量のオーダーや［η］の大小の順位とほぼ一致し，PEG35000, Dex<Pec, Alg<Xan であった。$\eta^a{}_{red}$ と［η］は同じオーダーである場合が多かったが，Xan の場合のみ，$\eta^a{}_{red}$≫［η］であった。これは，Xan の系では，分子内での entanglement 効果が高いことを反映していると考えられた。
　一方，2%高分子水溶液（Xan の場合のみ 0.5%）にスクロースを共存させて $-d\eta_{sp}/dA_w$ を調べたところ，PEG35000, Dex のグループはほぼ 0，Pec, Alg のグループは正の値，Xan には負の値を示した。これらの他にも高分子水溶液の E_a などを指標として高分子間相互作用をパターン化すると，大きく 3 つのグループに分類することが可能であった。グループ A は，PEG35000 や Dex が属し，$\eta^a{}_{red}$ および［η］が 1 桁で 0 に近く，E_a はほぼ水（17.5 kJ/mol）に近く，糖を添加しても分子間相互作用は弱いグループである。グループ B は，Pec や Alg であり，2 桁の $\eta^a{}_{red}$ および［η］を示し，E_a が大きいグループで，糖添加による分子間相互作用の変化を受けるタイプである。グループ C は，Xan の系に代表されるように，$\eta^a{}_{red}$ と［η］が高い値を示すのみならず，$\eta^a{}_{red}$≫［η］で，E_a がほぼ 0 であり，添加されたスクロースや温度変化によって溶液物性がほとんど変化しない高分子であった。

viscosity, intrinsic viscosity, macromolecule

講演番号：2J17p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ J校舎17会場

タイトル　アイスクリームの製品特性に対する高圧処理の効果

Title　Influence of high hydrostatic pressure on ice cream

○角掛 久美子、上西 信、井上 恵介、谷口 真奈美、岩井 大、竹塚 真義、市橋 信夫、井倉 則之[1]、下田 満哉[1]（森永乳業・食総研、[1]九州大院・農）

○Kumiko Tsunokake, Makoto Kaminishi, Keisuke Inoue, Manami Taniguchi, Hajime Iwai, Masayoshi Taketsuka, Nobuo Ichihashi, Noriyuki Igura[1], Mitsuya Shimoda[1] (Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci. Kyushu Univ.)

【目的】アイスクリームは一般的に、乳脂肪や無脂乳固形分、糖類、卵黄などの食品素材に加え、食品添加物である乳化安定剤や色素、香料などを組み合わせて設計される。近年の健康志向の高まりもあり、可能な限り食品添加物を排除したアイスクリーム作りが望まれているが、乳化安定剤を使わない場合は、ミックス粘度が低下するなど、製造適性が悪化することが知られる。一方、食品に高圧処理に供することで、香気や色調、栄養素を損失することなく、微生物や酵素の不活性化や、加圧による成分の改質などが生じることが知られる。特に、加熱変性と比較して、加熱臭やメイラード反応による褐変化が生じないことなどの利点がある。そこで、原料に依存しない製造工程によるアイスクリームのおいしさ制御を目的として、高圧処理を施すことで、アイスクリームの理化学特性やおいしさにどのような効果が見られるのかについて調査を行った。
【方法】原料（脱脂濃縮乳、クリーム等の乳製品、水あめ、砂糖、卵黄、香料）を65～75℃にて溶解混合を行った後、HTST（95℃、30秒）を用いて殺菌し、2段式均質機で18-5MPaの条件で脂肪球を均質化させ、速やかに10℃で冷却することで、乳化安定剤を含まないアイスクリームミックス（乳脂肪分8%、無脂乳固形分9%、総脂肪分9%、総固形分38%）を得た。その後、静水圧によるバッチ式高圧処理機を用いて、得られたミックスを加圧処理に供した。なお、処理圧力は0、150、300及び500MPa、処理時間は0、5及び10分とした（加圧時の温度は6～7℃）。処理後のミックスについて、粘度測定、蛋白質凝集の観察および脂肪粒度分布の測定を行った。また、処理後のミックスはバッチ式フリーザーにてフリージングし(OR45%、アイスクリーム充填温度-5.7～-6.0℃)、得られたアイスクリームは官能試験及びメルトダウン試験に供して評価を行った。
【結果】300MPaで5分以上の加圧処理によって、アイスクリームミックス粘度が有意に増大することが確認された。その後、フリージングにより得られたアイスクリームの食感も滑らかとなり、風味において優れていることが明らかとなった。また、安定剤を使用しないことで懸念される保型性の低下についても、高圧処理によりメルトダウンの耐性が上がっており効果が見られた。その結果、アイスクリーム製造適正の向上および、乳化安定剤を使用しないアイスクリームのおいしさ制御の可能性が示唆された。

ice cream, hydrostatic pressure, process condition

講演番号：2J17p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ J校舎17会場

タイトル　アイスクリームの製造条件が製品特性に与える影響
Title　Influence of process parameters on ice cream
〇井上 恵介、石射 陽介、岩井 大、竹塚 真義、市橋 信夫（森永乳業・食総研）
〇Keisuke Inoue, Yosuke Ishii, Hajime Iwai, Masayoshi Taketsuka, Nobuo Ichihashi(Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【目的】アイスクリームの製品特性及びそのおいしさは、原料配合と同様に製造条件にも大きな影響を受けることが知られているが、製造工程とアイスクリームのおいしさに関わる相関関係については報告が少ない。そこで、アイスクリーム製造の主要工程である均質工程とフリージング工程及びその相互作用が、アイスクリームの製品特性に与える影響を明らかにし、これまで経験的に知られていたアイスクリームに関わる諸要素の関わりを調査した。
【方法】種類別アイスクリームのミックス（乳脂肪分 9%、無脂乳固形分 9%、総固形分 38%）を用いた。製造条件は実験計画（Box-Behnken 計画）従い、均質工程における均質圧力、フリージング工程における連続式フリーザーでのアイスクリームの冷却温度とオーバーラン（空気の含量）の合計 3 条件を説明変数として実験計画を立て、アイスクリームを作成した。得られたアイスクリームの脂肪の凝集率と氷結晶径と気泡径、アイスクリームの溶けやすさ（融解性）、専門パネラーによって得られた官能項目を目的変数として重回帰式を作成した。さらに、これらの特性間の相関係数から、製造条件と製品特性、おいしさとの関わりを評価した。
【結果】脂肪凝集率や氷結晶径、融解性に関する重回帰モデルは、いずれも統計学的に有意であり、すべての目的変数でフリーザーの排出温度が最も影響が大きいことが示された。また、脂肪凝集率に関しては、均質圧力が2番目に大きな影響を与える因子であり、均質圧力と脂肪凝集率は比例に関係にあった。氷結晶径は均質圧力が15MPa付近のとき最も小さくなることが示された。官能評価から、バニラ感の強いもの、ミルク感の強いものに分けられ、オーバーランが高いときにとミルク感が、低いときにバニラ感が強くなる傾向が示された。相関係数から、氷結晶の大きさは食感に与える影響が大きく、脂肪の凝集は冷たさを抑制させることなどが示された。この結果は、同一原料配合であっても製造条件によって官能特性が変化することを意味し、製品コンセプトにより適切な製造条件が存在することが明らかとなった。

ice cream, continuous freezer, homogenization pressure

講演番号：2J17p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ J校舎17会場

シクロデキストリンと界面活性剤の併用によるコエンザイムQ10の可溶化

Solubilization of Coenzyme Q10 by Combination with Cyclodextrin and Surfactant

○上梶 友記子[1, 2]、城 文子[2]、中田 大介[2]、寺尾 啓二[2]、吉井 英文[1]（[1] 愛媛大連合農学、[2] シクロケムバイオ）

○Yukiko Uekaji[1, 2], Ayako Jo[2], Daisuke Nakata[2], Keiji Terao[2], Hidefumi Yoshii[1] ([1] The United Graduate School of Agricultural Sciences, Ehime University, [2] CycloChem Bio Co., Ltd.)

【目的】コエンザイムQ10 (CoQ10) は抗酸化活性を有し、エネルギー産生の役割を担う重要な補酵素である。CoQ10は近年、機能性食品素材や化粧品素材としての使用が認められ、幅広く市場に流通している。組織中のCoQ10量は加齢に伴い減少することが知られており、CoQ10を外部から補うことは有効とされているが、バイオアベイラビリティの低さが問題となっている。そのために、油脂コーティングや可溶化剤の添加、シクロデキストリン (CD) による包接化など、様々な応用技術が検討されている。CDはグルコースが環状に連なった構造をしており、空洞内部が疎水性、外部が親水性を示し、包接作用を有する化合物である。我々はγCDを用いた包接化技術によってCoQ10を高分散化し、その経口吸収性が改善することを見出した。しかし、水への溶解性に関する改善は認められていない。そこで本研究では、CoQ10-γCD包接体と界面活性剤の併用によるCoQ10の可溶化について検証した。

【方法】CoQ10-γCD包接粉末 (60 mg ; 12 mgのCoQ10を含む) に、1 wt % 界面活性剤 (グリチルリチン酸塩、タウロコール酸塩、ポリソルベートなど) の水溶液 (3 mL) を加え、30分間超音波照射した。調製したスラリー溶液を0.2 μm PTFEフィルターでろ過し、ろ液中のCoQ10濃度をHPLC (LC-2010、島津製作所) にて定量した。グリチルリチン酸ジカリウム (GZK_2) に関しては、別途CoQ10に対するGZK_2のモル比を0-20まで変化させた溶液を調製し、同様にCoQ10の水への溶解度を測定した。また、レーザ回折式粒度分布測定装置 (SALD-7000、島津製作所) を用いて、得られたCoQ10水溶液中のミセル径を測定した。

【結果】CoQ10-γCD包接粉末とGZK_2を組み合わせた場合、CoQ10ミセルの形成が促進され、CoQ10の水への溶解度が大幅に上昇した。特にCoQ10に対して2.5モル倍以上のGZK_2を添加した系では、CoQ10濃度が1 mg/mL以上の高値を示した。GZK_2以外の界面活性剤では、充分なCoQ10の可溶化促進効果は認められなかった。CoQ10原末やCoQ10とγCDの物理混合粉末では、GZK_2を添加しても溶解度上昇はほとんど認められなかった。これは、CoQ10をγCDで包接化することにより分散状態のCoQ10に、GZK_2を添加したことでミセル形成、可溶化が促進されたと考えられる。実際、CoQ10ミセルは100 nm以下の値を示した。GZK_2は界面活性剤として働くと共に、γCDと安定な包接体を形成することが知られている。このことから、γCDに包接されていたCoQ10がGZK_2と置き換わり、同時にGZK_2のミセルに取り込まれた可能性が示唆された。今後、メカニズムの解明について、詳細に検討していく予定である。

Coenzyme Q10, Cyclodextrin, solubilization

講演番号：2J17p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ J校舎17会場

発芽玄米の使用割合が日本酒の酒質に与える影響

Effect of pre-germinated brown rice/white rice ratio to sake quality

○佐野 智哉、山下 隆[1]（東京工科大院・バイオニクス、[1]東京工科大・応用生物）
○Tomoya Sano, Takashi Yamashita[1] (Tokyokoukadai, [1]Tokyokoukadai)

【目的】日本酒の市場は年々縮小している。市場の縮小に抗するには日本酒の多様化が重要と考えられる。そこで機能性食品として注目されている発芽玄米を使用した日本酒造りを試みた。今回は通常の白米を用いて造ったものと比較して、成分にどのような違いがあるか確認した。
【方法】掛米192 g、麹48 gの総米240 g、酵母はきょうかい901号を使用して仕込みを行なった。掛米にのみ発芽玄米を使用し、その使用割合を変更した場合の成分の違いを確認した。発芽玄米の使用割合は0%、25%、50%、75%、100%とした。発酵温度は初添から留添までは10℃で行い、留添後は1日1℃づつ温度をあげ15℃とし、その後は15℃一定とした。毎日もろみ重量を測定し、1日あたりのもろみ重量減少量（総米100 gあたり）が1.0 g程度まで低下したときに発酵終了として上槽した。そして、得られたサンプルの成分測定を行なった。測定項目は日本酒度、アルコール濃度、アミノ酸度、酸度（及びいくつかの有機酸）、発酵期間中の還元糖濃度である。また、官能評価も行なった。日本酒度は日本酒度計、アルコール濃度は蒸留 - 比重法、酸度、アミノ酸度は滴定法、個別に測定した有機酸についてはF-キット、還元糖濃度はソモギーネルソン法で測定した。官能検査では当研究室内の構成員（非熟練者）が評価を行なった。
【結果】発芽玄米を少しでも使用しているものは初期の発酵進度が速く、発芽玄米の使用割合25%のものが一番速いことが分かった。アルコール濃度は発芽玄米の使用割合25%のものが一番高く、次いで0%、それ以降は発芽玄米の使用割合が高いほどアルコール濃度は低くなった。日本酒度は発芽玄米を使用しているものはプラスに、使用していないものはマイナスになった。発芽玄米の使用割合が高いほど酸度は高くなり、アミノ酸度は低くなる傾向が見られた。個別に測定した有機酸は発芽玄米の使用割合が高いほど高くなる傾向が見られた。発酵期間中の還元糖量は発芽玄米の割合が高いほど低くなっていたが、経時的な増減の仕方は同様であった。

Sake, Pre-germinated brown rice, Brewing

講演番号：2J17p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ J校舎17会場

タイトル　Viiliから分離された乳酸菌により産生された菌体外多糖の糖組成解析

Title　Sugar composition of exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from Viili.

○古座野 智弘、栃原 孝志、守重 美香、竹田 保之（酪農大・食科）

○Tomohiro Kozano, Takashi Tochihara, Mika Morishige, Yasuyuki Takeda (Rakuno Gakuen University)

【目的】北欧で伝統的に生産される発酵乳Viiliには「すりおろした長いも」様の特有な粘性がある。この粘性の発現には、使用される乳酸菌が産生する菌体外多糖(Exopolysaccharide, EPS)が関与している。発酵乳におけるホエー分離の防止やテクスチャーの改良などにEPSが寄与することが報告されていることから、EPSが加工食品に新たな物性を付与する食品素材としての可能性がある。当研究室では2009年本学会大会において、Viiliから分離した粘質物を産生する乳酸菌の同定と培養特性に関する研究報告を行った[1)]。今回は、ホエー培地での本分離菌のEPS産生条件の検討と産生EPSの糖組成解析、ならびに組成の異なる培地に蓄積されるEPS構成糖の解析を行った。

【方法】Viiliから分離した粘質物産生乳酸菌*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KW102株をチーズホエー培地で30℃にて培養した。培養液中に蓄積したEPSを分離精製し、精製EPSとした。精製EPSをトリフルオロ酢酸で加水分解し、ならびにピリジルアミノ化した上でHPLCに供し、構成する糖比を算出した。また、チーズホエー培地より得られたEPSをゲルろ過クロマトグラフィーに供して分子量を算出した。次に、培地糖源の違いによるEPSの構成糖への影響を調べるため、チーズホエーにグルコースあるいはガラクトース、マンノース、ラムノース、ラクトースを1%添加した、これら糖源の異なる5種類の培地でKW102株を培養した。その後、各々の培養液中に蓄積したEPSの構成糖解析を行った。また、蓄積するEPSの構成糖が使用する培地による影響を受けるか解析するため、MRS培地を使用してKW102株を培養し、得られたEPSの構成糖解析も行った。

【結果】チーズホエー培地においてEPS産生条件を検討した結果、培養6時間目が最も多くの糖含量をもつEPSを産生した。また、その際に産生したEPSを分離精製し、糖組成解析したところ、グルコース、ガラクトース、ラムノースがモル比で、おおむね1：1：2で存在することがわかった。また、ホエー培地中に蓄積されたEPSは、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果、分子量で200万以上と推定された。チーズホエーに異なる糖を添加した種々の培地に蓄積するEPSの構成糖は、糖を添加していないチーズホエー培地と比べて、大きな違いは確認されなかった。一方、MRS培地から得られたEPSの構成糖はグルコース、ガラクトース、ラムノースおよびマンノースと確認され、チーズホエー培地から得られたEPSの構成糖とは異なった。

1)栃原ら，日本農芸化学会2009年度大会講演要旨集，p70

Keyword1 Exopolysaccharide, Keyword2 *Lactococcus lactis* , Keyword3 Viili

講演番号:2J17p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ J校舎17会場

アルギニン経口投与による腸内常在菌を介した大腸内プトレッシン濃度上昇の誘導

Oral arginine administration induces intestinal bacteria to produce putrescine in the colon

○村松 幸治[1]、澤木 笑美子[1]、木邊 量子[2]、栗原 新[3]、坂井 友美[3]、鈴木 秀之[3]、根本 直樹[3]、辨野 義己[2]、松本 光晴[1, 2]（[1]協同乳業・技術開発、[2]理研・辨野研、[3]京工繊大院・応用生物）

○Koji Muramatsu, Emiko Sawaki, Ryoko Kibe, Shin Kurihara, Yumi Sakai, Hideyuki Suzuki, Naoki Nemoto, Yoshimi Benno, and Mitsuharu Matsumoto[1, 2]（[1]Kyodo Milk Industry, [2]Benno Lab. RIKEN, [3]Kyoto Institute of Technology）

【目的】演者らは「腸内ポリアミン（PA）濃度を一定レベルに維持できれば慢性炎症を抑制することができ、健康寿命伸長に繋がる」という仮説に従い研究を行っている。これまで、大腸内PA濃度が低い高齢者やアトピー患者にビフィズス菌LKM512を投与し、大腸内PA濃度が上昇することを確認してきたが、個体差が大きく、一部上昇しない個体も存在した。一方、大腸菌を用いた研究で、コハク酸が環境中のプトレッシン吸収を抑える作用を有することから、演者らは、腸内細菌の代謝産物が腸内細菌のPAトランスポーターに作用し、腸内PA濃度に影響を与えている可能性があると考え、腸管内PA濃度に影響を与える物質を探索し、培養系においてアルギニン（Arg）を添加することでプトレッシン（Put）産生が誘導されることを確認した。本研究では、*in vivo*での効果を調べるために、マウス・ラットにArgを投与し、大腸内PA濃度に与える影響を調べた。
【方法】雌性Crj:CD-1(ICR)マウスと雄性Crj:CD(SD)ラット各8匹に、3時間の絶食後、Argを胃ゾンデにて強制経口投与し、マウスは5時間後、ラットは8時間後に回収した糞便と結腸組織中のPA（Put、スペルミジン、スペルミン）量を測定した。また、大腸カニューレ（近位結腸の盲腸に近い部位にカニューレを挿入し、直接大腸にArg投与を可能にした）ラット5匹にArgを投与し、3-6時間の間に回収した糞便中のPA量を測定した。さらに腸内常在菌をカナマイシン処理したマウスにArgを投与した際のPA量を測定した。PAは、糞便をPBSで撹拌・抽出し、TCA処理、FMOC標識後、UPLCにて測定した。
【結果】マウスでは、1 mg/g・weight投与でPut濃度が5.8倍まで増加した。ラットにおいても、Put濃度が0.9 mg/g・weight投与で3.5倍まで増加した。結腸組織中のPA濃度は、Arg投与群により、マウスではPutがラットではすべてのPAが対照群（PBS投与）よりも高く、腸管内PAが腸管組織に移行していることが確認された（n = 4）。大腸カニューレラットを用いた実験の結果、2 mg/rat (= 4.4 μg/g・weight)以上でPut量が有意な（$p < 0.05$）増加が認められた。また、腸内常在菌をカナマイシン処理したマウスにArgを経口投与したところ、Put濃度の増加は認められなかった。これは、Arg投与によるPut量の増加は腸内常在菌の代謝に依存していることを意味している。以上より、腸内常在菌のPut産生を誘導し、大腸内および大腸組織でPut濃度を上昇させ寿命伸長効果が期待できるArg添加食品が提案できると考えられる。また、演者らが知る限り、これは複雑で個体差が大きい腸内菌叢に目的の生理活性物質を安定して産生させることに成功した初めての例である。

Polyamine, Intestinal bacteria, Arginine

講演番号：2J17p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ J校舎17会場

魚肉練り製品を使用した新規水産発酵食品の創生

Novel fish fermented food using KAMABOKO

○福田　翼、中田多恵、古下　学、芝　恒男（水大校・食品科学）
○Tsubasa Fukuda, Tae Nakata, Manabu Furushita, Tsuneo Shiba(Suidaikou)

【目的】水産発酵食品は独特のニオイを有している。*Rhizopus* 属菌はインドネシアの健康食品であるテンペの主要な発酵スターターであり、高い有機酸生成能を有している。有機酸は水産物特有のニオイをマスキングする事が知られており、さらにそれ自体が様々な芳香性を示す。カマボコは、低利用魚の有効利用法の1つとして注目を浴びており、それを発酵基質として利用出来れば水産資源の新たな可能性に繋がる。しかしながら、カマボコはタンパク質を主成分としており有機酸の生成に必要な炭素源が不足している。したがって、炭素源、すなわち、デンプン源の添加が必要である。そこで本研究では、カマボコと培養基質とした*Rhizopus* 属菌によるテンペ様水産発酵食品の創生を目的とし、最適な*Rhizopus* 属菌の選定とカマボコと添加デンプン源の混合比について調査を行った。
【方法】水産発酵食品の発酵基質として約0.5 cm角にカットしたカマボコを利用した。添加デンプン源はコメ（山口県産）とした。*Rhizopus* 属菌はテンペおよび土壌より分離された23菌株を用いた。これらの菌株におけるグルコアミラーゼ生産性およびプロテアーゼ生産性を調査し、スクリーニングを行った。得られた*Rhizopus* 属菌を用い、カマボコとコメの混合比について検討を行った。
【結果】カマボコを発酵基質として利用可能である*Rhizopus* 属菌のスクリーニングを行った。その結果、14菌株において増殖が確認された。しかしながら、増殖が確認されたいずれの菌株においてもアンモニアもしくはカビ臭が確認された。添加デンプン源としてコメを選択し、カマボコ上で増殖可能であった*Rhizopus* 属14菌株におけるグルコアミラーゼ生産性およびプロテアーゼ生産性を調査した。その結果、グルコアミラーゼ生産性は*Rhizopus cohnii* P5菌株が最も高かった。同様に、プロテアーゼ生産性も高い数値を示した事から以後の研究では*R. cohnii* P5菌株を使用した。
　次に、カマボコとコメの混合培養基質における*R. cohnii* P5菌株のグルコアミラーゼ生産性を調査し、コメの添加割合が高くなる程、高い数値を示す事を明らかとした。同様に、プロテアーゼ生産性を検討した結果、カマボコの割合が高い程、高い数値を示す事を明らかとした。この時、コメの添加によりpHが低下する事が確認され、カマボコに対するコメの混合割合が50%以上の場合、甘いバナナ様の香りがした。一方、それよりも混合割合が低い場合、アンモニアおよびカビ臭が確認された。これらの結果より、カマボコとコメの混合比は50%が最適であると判断した。
　上記の結果より、カマボコにコメを添加する事によりカマボコを利用した新たな水産発酵食品が創生されることが示唆された。

fish fermented food, *Rhizopus* strain

講演番号:2J17p19
講演日時、会場:3月23日17:37～ J校舎17会場

原子吸光分析装置と多変量解析を用いた豚肉製品の分類に関する検討

Study on classification of pork products using atomic absorption spectrometer and multivariate analysis.

○合田 元清、小島 洋一郎[1]（苫小牧高専・環境システム工学専攻、[1]理系総合学科）

○Motoki Goda and Yohichiro Kojima (Tomakomai National College of Technology・Environmental Systems Course, [1]Dept.of National and Physical Sciences)

【目的】

我々の食の安全を守るため多種多様な分析法を用いて食品の安全評価がこれまで行われてきた。昨今、TPP(Trans-Pacific Partnership)、産地偽装、食中毒事件の発覚、海外食品の流通量の増加など様々な要因に関連して、食品に対する生産地の特定や含有化学物質の検出などが膨大な数となっている。このため、食品を安価で迅速に評価し安全性を確保することは急務であり、多くの食品に対して分析結果を照合し正確に分類することの重要性は非常に高まっている。このような状況の中、多くの化学分析機器を用いて全ての成分値を測定するのは、莫大な時間とコストが懸念される。そこで本研究では、詳細な分析結果の得られる原子吸光分析装置と多変量解析を用いて豚肉製品を短時間で精度よく分類が可能か否か基礎的な検討を行った。

【方法】

本研究は、豚肉製品82種を対象サンプルとした。多変量解析の一種であるクラスター分析と判別分析を複合させ、「肉の種類」に関して分類を試みた。まず五訂増補食品成分表2010より得た、原子吸光分析で得られる無機成分値を変量として、対象サンプルをクラスター分析により分類した。その後、より詳細に分類するため、一部のクラスターに対して「脂身つき、皮下脂肪なし、赤肉、加工品、副生物」の観点から判別分析を行い、判別率を算出した。なお、クラスター分析はword法でNa、K、Ca、Mg、Feを、判別分析では、Na、K、Ca、Cu、Feを変数として用いた。

【結果】

クラスター分析により、肝臓製品、加工品、副生物(軟骨)は正確に分類できた。一方で、これら以外の対象サンプルに対しては精度があまり良くなく、一部分類することが出来ないものも散見された。そこで、評価しにくいこれら一部の結果に対して判別分析を施したところ、信用に足る精度になることが判明した。この結果により、原子吸光分析装置を用いることで豚肉製品を肉の種類で正確に分類できる可能性を見出すことが出来た。さらには、豚肉製品判別の簡易化、コストダウンに繋がる可能性も同時に探り出せた。今後は、主成分分析や対応分析などの他の統計解析法を用いて、豚肉の部位、豚の種類で正確に分類できる可能性を模索していきたい。

Classification , Atomic absorption spectrometer, Multivariate analysis

講演番号：2B18a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ B校舎18会場

油糧微生物*Mortierella alpina* の分子育種による希少ステロール生産（１）

Production of unusual sterols by molecular breeding of *Mortierella alpina* (1)

○島田 良美[1], 櫻谷 英治[1], 清水 昌[1, 2], 小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命, [2]京都学園大・バイオ環境）

○Yoshimi Shimada[1], Eiji Sakuradani[1], Sakayu Shimizu[2], Jun Ogawa[1]（[1] Chair of Applied Microbiology, Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2] Faculty of Bioenvironmental Science, Kyoto Gakuen University）

【目的】油糧微生物*Mortierella alpina*はアラキドン酸の工業生産に利用されているが、脂肪酸のみでなく天然では希少なデスモステロールも多量蓄積することが明らかになっている。微生物ステロールとしてよく知られているエルゴステロールと異なり、デスモステロールはコレステロールと同様にステロイド骨格内では5位のみに二重結合をもつステロールである。デスモステロールを含む希少ステロールの生産性を向上させるために、我々はステロール生合成系の律速となる3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductaseを本菌よりクローニングして過剰発現し、ステロールの生産性を評価した。

【方法、結果】本菌のcDNAライブラリーからdegenerate primerを用いてPCRクローニングを行い、1188残基のアミノ酸をコードするORFを得た。これを酵母で過剰発現させたところスクアレンの蓄積が認められたため、この遺伝子はHMG-CoA reductaseをコードしていることが確認された。ウラシル要求性株において過剰発現を試みたがステロール生産性に変化が認められなかったため、触媒活性部位（アミノ酸535残基）のみの変異体を作製して同様に過剰発現させたところ、スクアレンの蓄積がホスト株の約3倍、総ステロール生産量が約1.5倍に向上した形質転換株を得ることができた。

desmosterol, *Mortierella*, HMG-CoA reductase

講演番号：2B18a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ B校舎18会場

油糧微生物 *Mortierella alpina* の分子育種による希少ステロール生産（２）

Production of unusual sterols by molecular breeding of *Mortierella alpina* (2)

島田 良美[1], ○櫻谷 英治[1], 安藤晃規[1,2], 清水 昌[1,3], 小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命, [2]京大・生理化学ユニット, [3]京都学園大・バイオ環境）

Yoshimi Shimada[1], ○Eiji Sakuradani[1], Akinori Ando[1,2], Sakayu Shimizu[1,3], Jun Ogawa[1] ([1] Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2] Res. Unit for Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3] Fac. of Bioenviron. Sci., Kyoto Gakuen Univ.)

【目的】油糧微生物 *Mortierella alpina* は天然では希少なデスモステロールを多く蓄積することが明らかになっており、我々は本菌の分子育種によるステロールの発酵生産を目指している。そこで、セルフクローニングにより作製した 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase 過剰発現株のうちステロール生産性の向上したものをホスト株とし、本菌由来の squalene epoxidase (ERG1)と lanosterol 14α-demethylase (ERG11)遺伝子を過剰発現することにより、さらなるステロール生産性向上を試みた。

【方法、結果】degenerate primerを用いてPCRクローニングを行い、478アミノ酸残基のERG1候補および516アミノ酸残基のERG11候補ORFを得た。これらを単独あるいは直列に発現ベクターに組み込み、HMG-CoA reductase過剰発現株をホスト株として、パーティクルガン法によりカルボキシン耐性を指標として形質転換体を得た。ERG1とERG11をそれぞれ単独で発現した場合、ERG1/ERG11を同時発現した場合のいずれも総ステロール生産量が増加していた。

Desmosterol, *Mortierella*, ERG1

講演番号：2B18a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ B校舎18会場

油糧微生物*Mortierella alpina* 1S-4に由来するSterol acyltransferaseホモログ遺伝子のクローニングと機能解析

Cloning and functional analysis of a sterol acyltransferase homologous gene from oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4

○村上 武[1]、島田 良美[1]、櫻谷 英治[1]、清水 昌[1,2]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命,[2]京都学園大・バイオ環境）

○Takeru Murakami[1], Yoshimi Shimada[1], Eiji Sakuradani[1], Sakayu Shimizu[1,2], Jun Ogawa[1], ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.[2]Dep. Biosci. Biotechnol., Fac. Bioenviron. Sci., Kyoto Gakuen Univ.)

【目的】油糧微生物*Mortierella alpina* 1S-4はアラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸の生産菌として利用されている。ステロールの種類は生物種によって異なり、カビや酵母などの微生物では一般にエルゴステロールが代表的なステロールであるが、脂質組成分析により本菌株の代表的なステロールが天然では希少なデスモステロールであることが明らかになっている。デスモステロールはほ乳類の主要なステロールであるコレステロールと同様にステロイド骨格の5位のみに二重結合を持つ。Sterol acyltransferase (SAT) は遊離ステロールとアシルCoAからステロールエステルを合成する反応を触媒する。これまでに酵母*Saccharomyces cerevisiae*において内在性*SAT*の過剰発現や欠損により菌体内ステロールとステロールエステルの存在比が変化することが報告された。そこで本研究では*M. alpina* 1S-4の*SAT*ホモログ遺伝子（*MSAT1*）を本菌株よりクローニングし、*MSAT1*過剰発現株でのステロール生産性を評価した。また*S. cerevisiae*発現系を用いて*MSAT1*の機能解析を試みた。

【方法、結果】PCR cloning法により*M. alpina* 1S-4株のcDNAから*MSAT1*を単離した。本遺伝子は2,274 bpで構成され、758残基のアミノ酸をコードすると推測された。得られた遺伝子断片を*M. alpina*用遺伝子発現ベクターに組み込み、*M. alpina*ウラシル要求性株にアグロバクテリウム法によって導入し、*MSAT1*過剰発現株を取得した。過剰発現株のゲノムをテンプレートにしたPCRにより、*MSAT1*遺伝子のゲノムへの導入を確認した。また総ステロール量を分析したところ過剰発現株はホスト株にくらべ約1.6倍のステロールを生産することが分かった。次に酵母用*MSAT1*発現ベクターを構築し、トリプトファン栄養要求性を指標として*S. cerevisiae* InvSc1株にエレクトロポレーション法にて導入した。得られた形質転換株の脂質組成の分析を行ったところ、形質転換株におけるエルゴステロール蓄積量がコントロール株に比べ増加していた。現在、形質転換株とコントロール株における遊離ステロールとステロールエステルの割合に注目した菌体内脂質組成を分析中である。

Keyword1, *Mortierella alpina* Keyword2, desmosterol Keyword3, sterol acyltransferase

講演番号：2B18a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ B校舎18会場

Lactobacillus delbrueckii subsp. *delbrueckii* TUA4408Lによる発酵豆乳中の粘性物質について

Viscous material in soy milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L

○吉田　早希、江草　信太郎[1]、田中　尚人[2]、佐藤　英一、都築　公子[1]、本多　芳孝[1]、岡田　早苗（東農大応生科・化学、[1]マルサンアイ（株）、[2]東農大・菌株）

○Saki Yoshida, Shintaro Egusa[1], Naoto Tanaka[2], Eiichi Satoh, Kimiko Tsuzuki[1], Yoshitaka Honda[1], Sanae Okada

(Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agr., [1]MARUSAN-AI CO., LTD, [2]NRIC, Tokyo Univ. Agr.)

【目的】伝統発酵食品‘すんき漬け’から分離された乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TUA4408L で豆乳を発酵させると独特な粘性と曳糸性を持つ発酵豆乳ができる。乳酸菌が産生する粘性物質としては菌体外多糖（EPS）がある。EPS は、抗腫瘍や免疫調節等の生理作用、また食品のテクスチャー改善や離水防止作用が注目され、食品への利用が試みられている。TUA4408L 株による発酵豆乳においても EPS が独特な物性に影響を及ぼしていると考えられるが、豆乳に粘性を付与する乳酸菌由来の物質の報告はこれまでにない。そこで本研究では TUA4408L 株が豆乳中に産生する粘性物質の特性を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】供試菌株を豆乳に接種し、40℃で 8 時間培養したものを発酵豆乳とした。まず、TUA4408L 株の発酵豆乳と未接種の豆乳および *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* NRIC 0665^{T} により発酵させた粘性のない発酵豆乳の粘度を測定した。その結果、未接種の豆乳は 3.1 mPa・S、発酵豆乳は 273.0 mPa・S、粘性発酵豆乳は 453.3 mPa・Sであった。したがって、TUA4408L 株は乳酸発酵のみならず発酵豆乳に粘性を付与する物質を産生していることが考えられた。

次に粘性物質として多糖に着目し、TUA4408L 株による発酵豆乳と未接種の豆乳をそれぞれ熱処理した後、エタノール沈殿し、得られた粗多糖画分の多糖量を定量した。その結果豆乳に比べ発酵豆乳中の多糖の増加が確認された。さらに粗多糖画分を豆乳に加えたところ、発酵豆乳と同様の粘性が付与されたため、TUA4408L 株由来の EPS が発酵豆乳の粘性に影響していることが認められた。そこで陰イオン交換カラムクロマトグラフィーとゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて多糖の分画を行った。その結果、分子量10KDa程度の中性多糖と分子量 4×10^{4}～10^{8} KDa および 4×10^{4} KDa 未満の酸性多糖が検出され、TUA4408L 株による発酵豆乳中の粘性物質はこれらの EPS であると考えられた。各多糖画分の構成糖についても併せて報告する。

lactic acid bacteria, soy milk, exopolysaccharide

講演番号：2B18a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ B校舎18会場

Bacillus sp. HK-1 株の生産する抗真菌物質の単離・精製

Isolation of antifungal compounds from *Bacillus* sp. HK-1

谷中　貴則、司馬　肇、細野　邦昭（日本大学　生物資源科学）
Takanori Yanaka　Hajime Shiba　Kuniaki Hosono　(Nihon univ.)

【目的】抗真菌物質を生産する細菌 HK-1 株を分離し、その生産する抗真菌物質の単離・精製を行ったので、構造と抗真菌性ついて報告する。
【方法】HK-1 株の培養上清から塩酸酸性条件下で生じる沈殿物を得た後、メタノールに溶解する画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、C18 逆相カラムクロマトグラフィー等で精製した。精製したサンプルの LC-MS 分析及び塩酸加水分解物についてアミノ酸組成及び質量分析を行った。さらに精製サンプルを用いて *Candida* 属酵母及び *Fusarium* 属糸状菌等に対する抗菌スペクトルを測定した。また、HK-1 株を同定するために 16SrDNA 解析を行った。
【結果】抗真菌物質は分子量 1042 からなる物質で、アミノ酸組成 Asp:Glu:Ser:Pro:Tyr=2:1:1:1:1 なるペプチド部分と分子量 243 の親油性物質より構成されていることから、Iturin 類縁体であると推定した。また、HK-1 株の 16SrDNA 解析より、*Bacillus amyloliquefaciens* に近縁な *Bacillus* sp.と推定した。

antifungal, purification, *Bacillus* sp.

講演番号：2B18a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ B校舎18会場

タイトル　出芽酵母の遺伝子多重破壊株によるトリコテセン感受性の解析

Title Construction and evaluation of highly sensitive yeasts which can be utilize for trichothecene bioassay.

○山根 由美、山内 皓太、関本 陽介、渡井 智裕、峯岸 宏明[1]、宇佐美 論[2]、安藤 直子[2]（東洋大・工、[1]東洋大・バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター、[2]東洋大・理工）

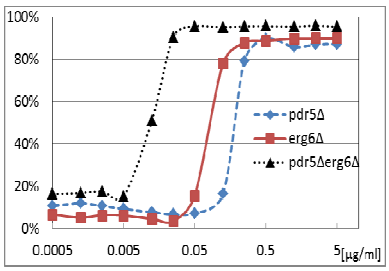
○Yumi Yamane, Kohta Yamauchi, Yosuke Sekimoto, Tomohiro Watai, Hiroaki Minegishi[1], Ron Usami, Naoko Takahashi-Ando (Toyo University)

【目的】赤かび病菌(*Fusarium graminearum*)は、小麦やトウモロコシなど重要穀物を汚染するトリコテセンと呼ばれるかび毒を生産する。これは、穀物の生産に大きな打撃を与えると同時に、汚染穀物を人や家畜が摂取すると中毒症状を引き起こすなどの問題となっている。しかし現在、日本では一部のトリコテセンにしか規制が行われていない。また、トリコテセンの検出はHPLCやGC-MSで行われているが、専門的知識が必要であり、かつ、検出手順も長いため、多数のサンプルを扱うのが困難である。そこで本研究では、出芽酵母の遺伝子破壊体を利用することで、より簡易で安価であり、しかも毒性に相関するトリコテセン検出法の構築を目指した。

【方法】出芽酵母の中でも遺伝子配列が決定しており、遺伝子破壊体コレクションが作成されている*Saccharomyces cerevisiae* BY4742株に注目した。この遺伝子破壊体コレクションをトリコテセンType AであるT-2 toxinによりスクリーニングをしたところ、数種の感受性の高い株が判明した。その内の*pdr5*Δを基として、さらに候補に挙がった遺伝子を相同組換えにより破壊し、二重破壊株を作成した。この際、導入した遺伝子はLeucine、Uracilを生産するLEU2、URA3である。作成した株に対して、T-2 toxin濃度を5～0.0005μg/mlになるように調整し、各濃度においての破壊体の成長阻害率をSDSによる相乗効果と共に調べた。

同様に、BY4742以外の酵母株でも多重遺伝子破壊株を作成することで、より感受性の高いトリコテセン検出株の構築することを目指した。

【結果】スクリーニングの結果、薬剤耐性、エルゴステロール生合成、液胞型ATPaseのサブユニット、RNA polymerase Ⅱ関係などの遺伝子の破壊株が候補に挙がった。これらはトリコテセンに対し最も感受性が高い酵母(*Kluyveromyces marxianus*)よりも感受性が高かった。さらに、単一遺伝子破壊体よりも二重遺伝子破壊体の方が、T-2 toxinに対する感受性が高いことが分かった(右図)。また、どの株でもSDSによる相乗効果が見られた。作成した二重遺伝子破壊株の中で*pdr5*Δ*erg6*Δの感受性が一番高いが、この株を基として三重遺伝子破壊株を作成するのが困難だったため、他の候補遺伝子を先に破壊した後、ERG6遺伝子を破壊することで、現在、三重遺伝子破壊株の作成を行っている。



trichothecene,mycotoxin,drug resistant gene

講演番号：2B18a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ B校舎18会場

タイトル　土壌から単離されたピロロキノリンキノン高生産菌の再分類と生産条件の検討

Title　Re-characterization of the microbe isolated from soil with high productivity of PQQ

○外山博英、樋口あや、橋場倫子、渡邉泰祐（琉球大農・亜熱生資）

○Hirohide Toyama, Aya Higuchi, Noriko Hashiba, Taisuke Watanabe
(Dept. Biosci. Biotechnol., Univ. Ryukyus)

【目的】1980 年代後半に山口大学のグループにより土壌から単離され、*"Methylobacillus glycogenes"* と同定されたメチロトロフ（Y 株）は、ピロロキノリンキノン（PQQ）を多量に生産することが報告されている。既に *pqq* 遺伝子がクローニングされ、生化学的解析が進められているメチロトロフ *Methylobacterium extorquens* AM1 の生産量（5 μM 程度）と比較しても桁違い（文献上最大 300 μM）である。Y 株の *pqq* 遺伝子およびその変異株を利用すれば、AM1 株を利用した実験からは未だ得ることができていない生合成中間物質を得ることができるかもしれない。それ故、Y 株を利用した実験を開始した。

【方法】Y 株の生理・生化学的試験及び 16S リボソーム RNA 遺伝子解析は（株）テクノスルガ・ラボに委託した。*Methylopila capsulata* 及び *Methylopila helvetica* は DSMZ より購入した。PQQ 生産性は、無機培地である Hypho 培地に 1 % (v/v) のメタノールを添加し、5 日間 30℃、200 rpm にて振とう培養した培地上清について調べた。PQQ 量は、アポ型グルコース脱水素酵素を用いた酵素法で定量した。

【結果】Y 株の生理・生化学試験の結果は、*Methylobacillus* 属のものとは一部一致せず、また 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列解析からも *Methylobacillus* 属とは異なるグループに属することが明らかとなった。最も近縁であったのは *Methylopila capsulata* であった。Y 株が上記条件下で約 30 μM の PQQ 生産を示したのに対し、DSMZ から購入した *M. capsulata* と *M. helvetica* は Y 株に匹敵する PQQ 生産量（それぞれ 23 μM と 12 μM）を示した。

Y株を使って、合成培地中の無機成分濃度や、PQQ生合成の前駆物質と考えられるグルタミン酸やチロシンの添加が、PQQ生産量に影響を及ぼすか調べた。リン酸濃度を通常の3倍量（60 mM）にすると約4倍のPQQ生産量となったが、それ以上濃度を上昇させると生産量は減少した。マグネシウムイオン濃度は、単独ではPQQ生産量に大きな影響を及ぼさなかったが、リン酸濃度を60mMとした場合にマグネシウムイオン濃度を上昇させると、さらにPQQ生産量は増大した。一方、チロシンとグルタミン酸を添加した場合には、前者では効果は見られなかったが後者で生産量の増加が観察され、10 mMで最大となり約3倍の生産量を示した。しかし、リン酸とマグネシウムイオン濃度を増加させた状態ではグルタミン酸の添加効果は見られず、逆にPQQ生産量の減少が観察された。こうしたリン酸やグルタミン酸の効果は*M. extorquens* AM1では観察されなかったので、この菌株特有の効果と考えられ、PQQ生合成過程に直接影響を与えているというよりは、増殖や代謝の亢進など間接的な効果ではないかと推察された。

Keyword1 pyrroloquinoline quinone, Keyword2 PQQ, Keyword3 methylotroph

講演番号：2B18a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ B校舎18会場

Penicillium purpurogenum IAM15392 株における type I polyketide synthases(PKS)の機能解析

Functional analysis of type I polyketide synthases(PKS) in *Penicillium purpurogenum* IAM15392

○梅村 彩良[1]、川島　淳士[1]、加藤　順[2]、春見　隆文[1,2]、荻原　淳[1,2]　([1]日大院生資研究科・生資利用、[2]日大生資科・生命化)

○Sara Umemura[1], Atsushi Kawashima[1], Jun Kato[2], Takafumi Kasumi[1,2], Jun Ogihara[1,2] ([1]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ., [2]Dept.Chem.Life.Sci.,Nihon Univ.)

【目的】*Penicillium purpurogenum* IAM15392 株は特定培地条件下で新規 azaphilone 系 *Monasucus* 色素同族体を生成する。本糸状菌による色素生合成系は ^{13}C-labeled acetate を用いた標識実験より *Monascus* 属糸状菌による azaphilone 系 *Monascus* 色素生合成の場合と同様な acetate-malonate からなる polyketide 鎖伸長反応によることが示された。本菌株及び、色素生産変異株を用いたプロテオーム解析の結果、色素生産に type I polyketide synthases(PKS)が関与していると示唆された。*P. purpurogenum* IAM15392 株の *Monasucus* 色素色素生合成を明らかにするために、本菌株の PKS 遺伝子の解析を行う。これまでに type I PKS である *PKSpp1* を含む遺伝子クラスターを単離している。本研究では、*P. purpurogenum* IAM15392 株の *PKSpp1* の機能解析をすることを目的とする。
【方法】*Penicillium citrinum*, *Xylaria* sp. BCC1067, *Aspergillus fumigatus* Af293 の PKS において保存性の高い領域のアミノ酸配列より縮重プライマーを設計し、PCR を行い PKS 遺伝子の部分的な配列情報を得た。さらに、この配列情報を含むクローンをゲノミックファージライブラリーより検索し、*PKSpp1* 遺伝子と名付けた。*PKSpp1* 遺伝子の全長の配列情報を決定した結果、*PKSpp1* 遺伝子は還元型 PKS に特徴的な KR,ER,DH ドメインを持つことが明らかになった。また、この配列情報より推定した KS ドメインのアミノ酸配列を用いて、neighbor-joining 法により系統樹を作成した結果、*Xylaria* sp. BCC 1067 の PKSKA1 とアミノ酸配列が最も近接していることが明らかとなった。これらのことから *PKSpp1* 遺伝子は還元型 PKS であると推定した。*PKSpp1* 遺伝子発現ベクターを構築し、*Aspergillus oryzae* RIB40 株を宿主とした異種発現を行った。
【結果】*PKSpp1*遺伝子周辺領域の塩基配列解析より、*PKSpp1*遺伝子はCytochrome P450、short-chain dehydtogenases、Prolyl oligopeptidasesと遺伝子クラスターを形成していることがわかった。異種発現より得られた形質転換体の特異的生産物を確認した。現在、詳細に解析中である。

Penicillium, PKS

講演番号：2B18a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ B校舎18会場

変異型loxP配列を用いた麹菌における多重遺伝子導入法の確立

Development of multiple gene expression system by means of Cre/loxP-mediated marker recycling with mutated loxP sites in *Aspergillus oryzae*.

○江原 直樹、水谷 治[1]、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農、[1]酒総研）
○Naoki Ebara, Osamu Mizutani[1], Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Tohoku Univ, [1]NRIB)

【目的】麹菌（Aspergillus oryzae）は，優れたタンパク質生産能，分泌能に加え、多様な二次代謝産物生産能も有することから、医薬品などの有用物質生産宿主としての利用が期待されている。このような高度な化合物は多数の生合成ステップを経て合成されており，外来生物由来の二次代謝産物を生産するためには，麹菌内に生合成に関わる一連の酵素群をすべて導入する必要がある。そこで，本研究では，Cre/loxPシステムを利用した選択マーカーリサイクリング技術を応用して，選択マーカーが少ない麹菌で繰返し遺伝子導入が可能なシステムの確立を目指した。
【方法】選択マーカー遺伝子の両端にloxP配列を配置して，麹菌の染色体に挿入した後，Creリコンビナーゼ（Cre）存在下でマーカー領域のみを染色体上から脱落させる。菌体内Cre反応の戦略として、条件誘導的に菌体内でCreを発現させる「菌体内発現法」と、プロトプラスト化した細胞に外部からCreを取り込ませる「直接導入法」1）の2通りの手法を検証した。また、遺伝子導入とマーカー除去を繰り返すと，染色体上にloxP配列が蓄積し，それらの間で除去が起こる恐れがあるため，一度反応を受けると，その後の反応性が大幅に低下する変異型loxP配列を利用した。
【結果】まず、直接導入法の操作を行い、選択培地に旺盛な生育を示す株についてマーカー遺伝子の有無を確認したところ、マーカーの両端に野生型loxPを配置した場合では50%以上の株でマーカーの除去が確認されたが、変異型loxPペアではマーカーが除去された株は確認できなかった。In vitroにおいて野生型・変異型loxPのCre反応効率を比較してみると、変異型ではやや反応効率が低下していることがわかり、この反応性の低下が変異型loxPでマーカー除去株が取得できない原因だと思われた。そこで、直接導入法よりも多量のCreを核内に送り込めると思われる菌体内発現法を新たに検証した。Cre発現カセットを染色体上に導入しCre発現を誘導したところ、マーカーの両端に変異型loxPを配置した株においても、非常に高頻度でマーカーの除去が確認された。現在は、本手法の有用性を検証するため、麹菌自身が生産し構成遺伝子が少ないコウジ酸生合成系をモデルとして、二次代謝産物の高生産化を試みている。

(1)　水谷ら，2009年度日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 271

Aspergillus oryzae, marker recycling, Cre/loxP

講演番号：2B18a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ B校舎18会場

麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド（１）
－デフェリフェリクリシン大量生産技術の開発－
Deferriferrichrysin, an iron-chelating cyclic peptide produced by *Aspergillus oryzae* (1)
- The development of mass production technology of Deferriferrichrysin -

○松村　憲吾、戸所　健彦、山中　寛之、福田　克治、入江　元子、秦　洋二（月桂冠総研）
○Kengo Matsumura, Takehiko Todokoro, Hiroyuki Yamanaka, Katsuharu Fukuda, Motoko Irie, Yoji Hata (Gekkeikan)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は鉄制限培養において鉄イオン獲得のために、δ-ヒドロキシオルニチン、セリン、グリシンからなる環状ペプチドシデロフォア、デフェリフェリクリシン（Dfcy）を生産する。Dfcy は三価の鉄と強く結合して赤色のフェリクリシン（Fcy）に変化する。清酒醸造においては米麹由来の Dfcy が、酒造用水に含まれる鉄イオンをキレートし清酒が着色するため、品質劣化の原因である Dfcy をできるだけ生産しない麹菌株の育種が進められてきた。しかしながら、Fcy は水溶性が高く、他鉄剤と比較して、色、におい、味において優れた加工適性を示すため、清酒醸造とは別の側面からは、貧血予防食品や貧血症の医薬品へ利用される可能性がある [1)]。また Dfcy は鉄イオンと特異的に強く結合するため、鉄キレート剤としても利用の可能性がある。これまで生産性の向上が困難なため工業レベルでの生産の対象とはなっていなかったが、今回、培養方法の改良や生産菌株の育種により生合成系をより活発に誘導させ、キログラムオーダーで Dfcy/Fcy の取得が可能となったので報告する。さらに麹菌が生産する Dfcy/Fcy は清酒や酒粕として長年食経験があり、極めて安全性の高い物質である。これにより医薬品から食品、化粧品素材まで幅広い用途が期待される。

【方法および結果】大量生産のための液体培養方法を検討したところ、麹菌が Dfcy を生産するには十分な溶存酸素が必要であり、本培養での対数増殖期に加圧、通気量の上昇、および撹拌数の上昇により酸素容量移動速度を 8.0 m mol / L･h 以上にすることで麹菌の Dfcy 生産が上昇することが判明した。しかし麹菌による Dfcy の生産は菌体増殖に連動し、生産につれて菌体が高密度化するため、①粘性が高くなり撹拌効率が落ちる ②菌体量が多くなり酸素をたくさん消費する および ③酸素供給量を上げるための撹拌速度の上昇により、菌糸がせん断されダメージを受け生産速度が落ちる。これら 3 つの「負のスパイラル」に陥り、Dfcy 生産性は滞った。その解決策を種々検討した結果、せん断しやすく高粘性になりがちな繊維状の菌体でなく、小さな粒状（ペレット）に菌体を誘導することが効果的であることを見出した。種培養において増粘多糖類を加え粘度を 3～30 mPa･s とすることで菌形態を極小のペレットとした。それを数倍量の培地に移植する形で培養のスケールアップを行うことにより、溶存酸素が確保できる大量培養が可能となった。実際に工業規模で麹菌培養を行い、40 kg の Dfcy が取得可能となった。

[1)] Int J Vitam Nutr Res. 2007; **77** 13-21

siderophore, iron chelator, *Aspergillus oryzae*

講演番号：2B18a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ B校舎18会場

麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド （２）
－デフェリフェリクリシン高生産株の育種および培地の改良－

Deferriferrichrysin, an iron-chelating cyclic peptide produced by *Aspergillus oryzae* (2)
- The breeding of high Deferriferrichrysin productivity mutants of *Aspergillus oryzae* and improvement of liquid culture medium -

○戸所　健彦、福田　克治、松村　憲吾、入江　元子、秦　洋二（月桂冠総研）
○Takehiko Todokoro, Katsuharu Fukuda, Kengo Matsumura, Motoko Irie, Yoji Hata　(Gekkeikan)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は環状ペプチドシデロフォアであるデフェリフェリクリシン（Dfcy）を生産する。Dfcy およびその鉄キレート態であるフェリクリシン（Fcy）は、高い水溶性や pH・熱に対する高い安定性を有することから幅広い用途での利用が期待されてきた。しかし Dfcy は一般的培養条件下では生産量が非常に低いことや、鉄存在条件下で容易に生産抑制されること、糸状菌の液体培養が困難であること等から、商業規模での生産はなされてこなかった。我々は Dfcy の大量生産系構築を目指して培地の検討を行い、Dfcy を効率よく生産させうる培地組成を見出した。さらに菌株の育種により、Dfcy を高生産し、鉄存在条件での生産抑制がより穏やかとなる、すなわち鉄感受性が低下した株を獲得した。これらの検討によって、初めて Dfcy の大量生産系の構築に成功したので、ここに報告する。

【方法および結果】①培地の検討　麹菌による Dfcy 生産は培地中の微量鉄によって容易に抑制されるため、培地への鉄混入は最小限に抑える必要がある。麹菌培養培地の窒素源としては一般的に、硝酸塩やアンモニウム塩などの無機窒素源と、ペプトンや酵母エキスなどの有機窒素源が知られる。有機窒素源では菌体の生育がより高まるものの、鉄混入の可能性から Dfcy のような鉄感受性の高い物質生産には不向きであった。そこで、富栄養かつ鉄混入の抑えられた有機窒素源として、清酒粕やそのプロテアーゼ分解物の培地添加を検討した。その結果これら酒粕関連素材は培地由来の鉄混入を最低限に抑えつつ、Dfcy を効率よく製造する有機窒素源であることが示された。

②麹菌育種　種々の醸造用麹菌株から、Dfcy を最も高生産するものを選択し、NTG 処理により変異株取得を行った。約 300 の変異株から最も Dfcy 高生産する株を選抜する育種手法を 11 世代経た結果、Dfcy 生産性が野生株より著しく向上した F11:74-5 株を取得した。F11:74-5 株は野生株と比較して Dfcy 高生産性になっているのみでなく、鉄感受性が低下していることが明らかになった。F11:74-5 株の高生産性を遺伝子発現の面から解析するため、野生株と F11:74-5 株との両株における既知の Dfcy 生合成遺伝子 2 種類（L-Ornithine N^5-Oxygenase をコードする *sid1* 遺伝子、および nonribosomal peptide synthetase をコードする *sid2* 遺伝子）および Dfcy 生合成転写因子である *sreA* 遺伝子の発現量を realtimePCR によって解析し、Dfcy 高生産性と鉄感受性との関係を明らかにした。

fermentation, secondary metabolite, cyclic peptide

講演番号：2B18a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ B校舎18会場

麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド（３）
－フェリクリシンの摂取がマウスの体内の特異的な鉄分布と持久力向上に及ぼす影響－
Deferriferrichrysin, an iron-chelating cyclic peptide produced by *Aspergillus oryzae* (3)
- Specific distribution of iron derived from Ferrichrysin effects on improvement of endurance in mice -

○鈴木　佐知子、福田　克治、入江　元子、秦　洋二、安井　裕之[1]（月桂冠総研、[1]京都薬科大・代謝分析）
○Sachiko Suzuki, Katsuharu Fukuda, Motoko Irie, Yoji Hata, Hiroyuki Yasui[1] (Gekkeikan, [1]Kyoto Pharmaceutical University)

【目的】フェリクリシン（Fcy）の高い水溶性と安定性は優れた加工適性を示し、大量生産が可能となったことで、食品成分としても実用化が期待できる。我々はこれまでに、Fcyの機能性に関して、鉄欠乏性貧血の優れた改善効果を示し、貯蔵鉄の回復にも有効であることを明らかとした[1)]。また、Fcyの体内分布に関して、RIを用いたラットへの投与試験の結果から、Fcyにキレートされた鉄は効率よく体内へ吸収され、特に筋肉内に多く分布することを見出した[2)]。そこで、今回はFcyに特異的な筋肉への鉄補給に着目し、生体へ及ぼす影響を検討した。
【方法】5 週齢のBALB/c系雄マウスを 1 週間予備飼育した。この期間に徐々に水に慣らし遊泳させた。予備飼育終了時に、疲労困憊するまでの遊泳時間を計測し、平均が等しくなるように 9 匹ずつ 3 群に分けた。鉄供給源としてFcyを与えたFcy群、その対照として塩化鉄を与えた塩化鉄群では、それぞれ鉄濃度を 35 ppmに調整した精製飼料と蒸留水を自由摂取させ、週に 2 回、定期的に 30 分間遊泳させた。試験開始から、14 日目および 28 日目に、体重の 7%の重さのオモリを胸部に固定した状態で強制的に遊泳させ、疲労困憊するまでの遊泳持続時間を計測し、各群の平均値を求めた。また、28 日目の遊泳終了 30 分後に血中乳酸値を測定した。遊泳試験終了の翌日に、心臓、肝臓および腓腹筋を採取し原子吸光法により組織中の鉄濃度を測定した。また、血液中のヘモグロビン、血清鉄、遊離脂肪酸および中性脂肪を測定した。一方、予備飼育終了時から遊泳をさせない群も設け、運動がマウスに及ぼす影響も検討した。
【結果】試験開始から 14 日目の遊泳持続時間に対し、28 日目では両群ともに遊泳時間が延長したが、Fcy群の方が塩化鉄群よりも遊泳時間の延長傾向が認められ、持久力の向上が示唆された。また、組織中の鉄濃度の測定結果から、塩化鉄群と比較し、Fcy群では肝臓鉄が増加傾向にあり、筋肉中の鉄は有意に増加していることが明らかとなった。血液成分の検査では、遊泳をさせていない群と比較し、遊泳させた群ではヘモグロビン値が有意に増加し、さらに塩化鉄群よりもFcy群の値が高い傾向にあった。以上より、Fcyは血液（ヘモグロビン）および筋肉（ミオグロビン）に鉄を補給することで酸素の運搬や貯蔵機能を高め、運動による疲労を軽減し、筋力の低下を防ぐ効果が期待できると推察された。

[1)] Int J Vitam Nutr Res. 2007; **77** 13-21　[2)] 日本農芸化学会 2005 年度大会講演要旨集 p286

Ferrichrysin, muscle, endurance

講演番号：2B18a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ B校舎18会場

麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド（４）
－デフェリフェリクリシンの抗炎症、抗酸化効果－
Deferriferrichrysin, an iron-chelating cyclic peptide produced by *Aspergillus oryzae* (4)
- Effects of Deferriferrichrysin on anti-inflammation and anti-oxidization -

○入江　元子、福田　克治、秦　洋二、市川　寛[1]、内藤　裕二[2] 、吉川　敏一[2]
（月桂冠・総研、[1]同志社大学・生命医科学研究科、[2]京都府立医科大学大学院・消化器内科学）
○Motoko Irie, Katsuharu Fukuda, Yoji Hata, Hiroshi Ichikawa[1], Yuji Naitou[2], Toshikazu Yoshikawa[2]
(Gekkeikan, [1]Doshisha University, [2] Kyoto Prefectural University of Medicine)

【目的】活性酸素の生成には、遷移金属イオンが関与していることが知られており、特に鉄イオンの活性酸素生成に与える影響は大きい。麹菌*Aspergillus oryzae*によって産生されるヘキサ環状ペプチド-デフェリフェリクリシン（Dfcy）は、３価鉄イオンを特異的にキレートして錯体フェリクリシン（Fcy）を形成する。この鉄キレート力に着目し、活性酸素やフリーラジカルによって発生しやすいと言われている消化器疾患改善の可能性を検証した。

【方法】Wistar系雄性ラットを18時間絶食した後、ウレタン麻酔下に正中開腹して腹腔動脈根部を結紮し、同時に血管クリップで上腸間膜動脈の血流を遮断し30分後クリップを取り除き再灌流を行った。Dfcy水溶液及びFcy水溶液は蒸留水で調製後、腸管虚血を惹起する3時間前に経口投与した。Dfcy投与量は、10, 30, 100, 300 mg/kgとした。虚血再灌流障害を与えなかった正常群、及び虚血再灌流障害を有するがDfcyを投与しないコントロール群には同量の蒸留水を投与した。再灌流60分後、大動脈より脱血屠殺し小腸を摘出後、粘膜傷害の指標として小腸腔内漏出ヘモグロビン（Hb）量及び漏出蛋白量、粘膜内チオバルビツール酸（TBA）反応物質、小腸粘膜内ミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性、炎症性サイトカインCINC-1を測定した。

【結果】上腸間膜動脈の30分間虚血60分間再灌流により、小腸腔内漏出Hb量及び漏出蛋白質量は顕著に増加し、虚血再灌流による小腸粘膜障害が認められた。また、Dfcyは濃度依存的に漏出ヘモグロビン量及び漏出蛋白質量の増加を抑制し、100 mg/kg及び300 mg/kg投与群でコントロール群との間に増加の抑制について有意差が認められた。また、Dfcy投与により粘膜内TBA反応物質量、MPO活性、及びCINC-1の増加は抑制され、100 mg/kg及び300 mg/kg投与群でコントロール群との間に増加の抑制について有意差が認められた。以上の結果から、Dfcyは好中球浸潤、脂質過酸化の抑制、炎症性サイトカイン誘導抑制などの炎症作用により、小腸における虚血再灌流惹起性粘膜傷害を抑制することが分かった。また、電子スピン共鳴装置を用いてDfcy及びFcyの抗酸化能の評価を行っており、これについても合わせて報告したい。

Deferriferrichrysin, anti-oxidization, anti-inflammation

講演番号：2B18a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ B校舎18会場

麹菌が産生する鉄キレート環状ペプチド（５）
－培養細胞および皮膚モデルにおけるデフェリフェリクリシンの美白効果－
Deferriferrichrysin, an iron-chelating cyclic peptide produced by *Aspergillus oryzae* (5)
- Whitening effects of Deferriferrichrysin on melanoma cell and 3D human skin model -

○大浦　新、堤　浩子、秦　洋二　（月桂冠総研）
○Shin Oura, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata　(Gekkeikan)

【目的】清酒麹が産生するデフェリフェリクリシン（Dfcy）は、鉄キレート能をもつ環状ペプチドである。今回はDfcyの機能性を評価するために、*in vitro*において抗酸化活性ならびにメラニン抑制効果を確認し、化粧品素材への可能性を検討した。

【方法】試験管モデルでの抗酸化試験を行った。まずDPPHラジカル消去試験を行い、50％消去濃度（RS_{50}値ppm）を求めた。またSOD様活性の指標として、キサンチンオキシダーゼ阻害試験を行い、50％阻害濃度（IC_{50}値ppm）を求めた。続いて細胞レベルでのメラニン産生抑制試験を行った。まずマウスB16細胞を７日間培養したときに、自然産生されるメラニン量を培養液の着色で目視判定した。さらにより生体に近い評価系として、メラノサイト含有ヒト３次元培養表皮モデルでの美白試験を行った。これを16日間培養したのちに、メラニンを抽出して結果を数値化するとともに、MTT法によって細胞生存率を測定した。いずれも被験区ではDfcyを加えて、美白効果を評価した。

【結果】DfcyにDPPH消去能（RS_{50}値＝45 ppm）とSOD様活性（IC_{50}値＝500 ppm）が認められた。とくにSOD様活性については、フェルラ酸（IC_{50}値＝570 ppm）と同等かつアルブチン、αリポ酸、ビタミンC、ビタミンE（いずれもIC_{50}値＞2000 ppm）を大幅に上回った。B16細胞メラニン産生試験においては、Dfcyは培地中200 ppmの添加で抑制効果を示した。これはビタミンEよりも強く、ビタミンCとほぼ同等の効果であった。ヒト皮膚三次元モデルにおいては、Dfcyは1000 ppmの添加によって生細胞数あたりのメラニン産生をほぼ完全に抑制した。同濃度のビタミンCが全く抑制を示さなかったことから、Dfcyは組織レベルにおいて優れた美白効果を有することが示唆された。

anti-oxidant peptide, anti-melanoma, human skin model

講演番号：2B18p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ B校舎18会場

新規グルタチオン排出トランスポーター発現酵母を用いた細胞外グルタチオン生産

Extracellular Glutathione Production using Yeast Expressing Nobel Glutathione Exporter

○原 清敬、桐山　健太郎[1]、福田　秀樹、近藤　昭彦[1]（神戸大・自然、[1]神戸大・工）
○Kiyotaka Hara, Kentaro Kiriyama, Hideki Fukuda, Akihiko Kondo (Kobe University)

【目的】グルタチオンは、抗酸化作用、解毒作用などの機能を持つトリペプチドであり、医療、食品産業等、様々な分野で需要が高まっている。現在グルタチオンは、主に酵母を用いた発酵法によって生産されており、グルタチオン含有量を高める様々な努力がなされているが、グルタチオンを細胞内に蓄積させる限り空間的な限界を免れない。一方、大腸菌や酵母に膜処理を施し、グルタチオンが細胞膜を透過するようにした透過性菌体を用いる酵素法(1)-(2)では、グルタチオンの合成反応に必要な基質やATPも細胞外へ放出されるため、これらの添加が必要になるという欠点をもつ。そこで本研究では、グルタチオンのみを特異的に細胞外へと排出させる細胞外グルタチオン生産系の開発を目指した。

【方法】ヒトのグルタチオン排出トランスポーターABCG2(3)との相同性から、酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）グルタチオン排出トランスポーター候補遺伝子を選抜した。これらの候補遺伝子をセルフクローニングし、グルタチオン分解酵素およびグルタチオン取り込みトランスポーターを破壊した*S. cerevisiae*にて過剰発現させた。なお、細胞外のグルタチオン濃度の測定にはDTNB法を用いた。

【結果】野生型の酵母では、細胞外へのグルタチオンの排出がほとんど検出されなかった。そこで、グルタチオン分解酵素およびグルタチオン取り込みトランスポーターを破壊したところ、微量ながらグルタチオンの細胞外排出が確認された。本結果より、野生型の酵母ではグルタチオンを細胞外へ少量排出しているが、グルタチオンの分解や、細胞内への取り込みによって、その活性が見かけ上検出されなかったと考えられる。よって、酵母においてもグルタチオン排出トランスポーターの存在が示唆された。そこで、酵母のグルタチオン排出トランスポーターを同定するため、ヒトのグルタチオン排出トランスポーターABCG2との相同性から候補遺伝子を絞り込んだ。これらの候補遺伝子の過剰発現株のうち、ADP1の過剰発現株にて細胞外グルタチオン濃度が有意に高まった。本結果より、酵母で初めてADP1をグルタチオン排出トランスポーターとして同定した。さらに、グルタチオン合成系を強化することにより、ADP1を用いた細胞外グルタチオン生産性を向上させた。

(参考文献)
(1)Hara KY et al (2009) FEMS Microbiol Lett, 297, 217-224
(2)Yoshida H et al (2011) Appl Microbiol Biotechnol, 9, 1001-1006
(3)Brechbuhl HM et al(2010) J Biol Chem, 28,16582-16587

Yeast, Glutathione, Transporter

講演番号：2B18p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ B校舎18会場

バクテリア細胞内でのイノシトール立体異性体相互変換の可能性

Possible interconversion of inositol stereoisomers in bacterial cell

○吉田 健一、村上 絢野、竹中 慎治（神戸大・農）
○Ken-ichi Yoshida, Ayano Murakami, Shinji Takenaka (Kobe Univ.)

【目的】イノシトールとは1,2,3,4,5,6-cyclohexanehexolの総称であり、6個ある水酸基の立体配座の組み合わせによって9種類の立体異性体が存在する。天然界に存在する異性体は殆どが*myo*-inositolという異性体であり、それ以外の異性体は一般に希少である。しかし、生体内には*myo*-inositol以外の異性体も実際に存在することが知られており、中には特異な生理活性を有することが示されているものもある。例えば、D-*chiro*-inositolはインスリン様の作用を発揮して血糖値を下げるので糖尿病に、一方*scyllo*-inositolは脳内に蓄積してアミロイドの重合を妨げるのでアルツハイマー病に、それぞれ顕著な適応が示唆されるなど、重大な疾病の治療や予防への応用の期待がもたれる程である。しかし、これらの希少な異性体がどのようにして生体内にもたらされるか、そのメカニズムは未だ不明である。

我々は好熱性細菌*Geobacillus kaustophilus*のゲノムに枯草菌のイノシトール代謝系との機能的相似が想定できる遺伝子クラスターを見出した。しかし、奇妙なことには*myo*-inositol代謝の初発反応を担うイノシトール脱水素酵素をコードすると推定される遺伝子だけが3つタンデムに並んで存在し明らかに重複しているのである。本研究の目的は、この3種の重複イノシトール脱水素酵素遺伝子の存在意義を問うことにある。

【方法】*G. kaustophilus*の3種のイノシトール脱水素酵素候補をそれぞれ生産精製して、酵素学的な特徴を調べる一方、当該遺伝子クラスターの転写をノーザン法によって検討した。さらに、変異原処理によってイノシトールの利用能力を失った*G. kaustophilus*変異株を得て解析を加えた。また、*myo*-inositolを代謝している*G. kaustophilus*細胞内のメタボライトを抽出してGC-TOFMSに供し、細胞内のイノシトール異性体を分析した。

【結果】確かに、当該遺伝子クラスターは*myo*-inositolの分解利用のために機能しているらしく、また培地への*myo*-inositolの添加によって誘導される。3種の重複遺伝子は同じ転写単位に含まれており、従って3種は一斉に同時発現する。加えて、それぞれの産物は反応特性が異なるイノシトール脱水素酵素として機能することが判明した。そしてさらに、*G. kaustophilus*細胞内のメタボライトには、*myo*-inositol以外のイノシトール異性体が少なくとも2種類検出された。従って、反応特性が異なるイノシトール脱水素酵素が共存することによって、細胞内に取り込まれた*myo*-inositolは様々な位置で脱水素されたイノソース（keto-inositol）の混合物となり、また3者の中には逆反応によってイノソースをイノシトールに還元する際に水酸基を反転させるものがあり、結果的にバクテリア細胞内で自発的にイノシトール立体異性体の相互変換が起こった可能性が示唆された。この発見は、生体内に種々の希少イノシトール異性体がもたらされるメカニズムを理解するヒントを与えるものかもしれない。

inositol, stereoisomer, *Geobacillus kaustophilus*

講演番号：2B18p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ B校舎18会場

タイトル　食品（納豆）を用いた微生物農薬の開発

Title Development of microbial pesticide using fermented soybeans.

○澤野　沙耶佳、村田　大地、岡南　政宏、阿野　貴司（近畿大学大学院・生物理工学研究科）

○Sayaka Sawano, Daichi Murata, Masahiro Okanami, Takashi Ano (Division of biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki university)

【目的】植物病原菌は、植物に感染し、各器官に多様な病徴を引き起こし、農作物の収量や品質に大きな影響を及ぼす。近年、化学農薬に変わる農薬として、もともと自然界に生息していた微生物の拮抗作用を使用する生物農薬が注目されている。本研究では、枯草菌の一種である納豆菌を利用した日本の伝統食品である納豆に着目し、食品として安全性の高い納豆から植物病原菌生育抑制能をもつ菌を単離し、生物農薬への使用を検討することを目標とした。

【方法】細菌用寒天培地であるTSA、糸状菌用寒天培地であるPDAを用いて、一次スクリーニングとして市販の納豆一粒と植物病原菌である*Rhizoctonia solani* または*Fusarium oxysporum*の培養を行い、納豆の植物病原菌生育抑制能を調べた。次に、抑制の認められた納豆を用い、納豆表面の菌を懸濁後希釈し、植物病原菌生育抑制能の観察を行った。抑制が確認できたものについて、二次スクリーニングとして納豆の表面から菌を単離し、単離菌の植物病原菌に対する生育抑制能の確認を行うことにより、単離菌の抑制能力の比較を行った。次に、単離された抑制菌の培養上清が植物病原菌の生育を抑制することができるか検討した。単離菌の培養上清を5%、10%、15%の濃度になるようにPDA培地に混入し、植物病原菌抑制能の有無を観察した。さらに、16s rRNA遺伝子の塩基配列により抑制菌の同定を行った。

【結果】市販の納豆において植物病原菌の増殖抑制能を示す場合は、ほとんどの納豆で*R. solani*および*F. oxysporum*の二種類の植物病原菌の抑制を示した。しかし、単離菌においては、*R. solani* に対する抑制能はほとんどの菌に存在したが、*F. oxysporum*に対する抑制能を確認できるものは少なかった。それらの単離菌の中で*R. solani* に対し最も高い抑制能を示す菌の単離に成功した。この単離菌の培養上清を用いた実験では、培養上清の濃度が高くなるにつれ、植物病原菌抑制能が高くなることが認められた。本実験で単離された菌は、食品である納豆に由来する菌であるため安全性が高いと考えられ、微生物農薬として有用な候補株になることが考えられる。

fermented soybeans, phytopathogenic fungus, microbial pesticide

講演番号：2B18p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ B校舎18会場

非リボソーム型ペプチド合成酵素間の選択的分子間相互作用の試験管内再構成

In vitro reconstitution of selective inter-molecular interaction between non-ribosomal peptide synthetases

○長瀬 裕美、渡部 謙二、平野 展孝、春木 満（日大・工・生命応用化）
○Hiromi Nagase, Kenji Watanabe, Nobutaka Hirano, Mitsuru Haruki (Nihon Univ. College of Eng. Dept. of Chem. Bio. & Appl. Chem.)

微生物が生産する二次代謝産物には、抗菌活性・抗腫瘍活性等の有用な生理活性を持つ物質が数多く存在している。非リボソーム型ペプチド合成酵素（Non-Ribosomal Peptide Synthetase（NRPS））によって合成される多様な環状ペプチド型抗生物質もその一つである。NRPS は、1 つのアミノ酸導入に対して 1 つのモジュール（約 100 kDa）を必要とし、それぞれのモジュールは、ペプチド合成に必要な複数の触媒ドメインの集合体によって構成される。NRPS を用いる環状ペプチドの生合成系は、その構成アミノ酸の個数分のモジュールを必要とし、他に類を見ない巨大な酵素群（数百 kDa）と、それらの選択的分子間相互作用によって構成される。この NRPS 間の選択的分子間相互作用は、NRPS の N & C 末端部位に存在する 20~30 アミノ酸のペプチド鎖（Communication（COM）ドメイン）を介して行われており、それらの置換によってペプチド合成系を再編成出来ることが知られている。本研究では、COM ドメインを置換した NRPS モジュールの調製を容易にするため、PCR 断片からの蛋白質合成が可能な無細胞蛋白質合成系を用いて、*Bacillus brevis* 由来 Tyrocidine A 生合成系 NRPS（TycA, TycB, TycC）に含まれる NRPS モジュール 2 種類（TycB3（TycB の C 末 NRPS モジュール）, TycC1（TycC の N 末 NRPS モジュール））の無細胞合成・精製後、ジペプチド(D)Phe-(L)Asn 合成系の試験管内再構成を行った。この際、合成ジペプチドの NRPS モジュールからの解離を促進するため、下流側 NRPS モジュール（TycC1）の C 末端に、Thioesterase（Te）ドメインを融合した NRPS モジュール（TycC1-Te）を構築した。これらの NRPS モジュールを用いてジペプチド合成系の試験管内再構成を行い、逆相液体クロマトグラフィーによって目的ジペプチドの合成を確認した。また、同様の手法で、上流側 NRPS モジュール（TycB3）の C 末 COM ドメインを、TycA1 の C 末 COM ドメインに置換した場合、ジペプチド(D)Phe-(L)Asn が合成されないことを確認した。今後、本ジペプチド合成系を用いて、NRPS モジュール間の選択的分子間相互作用の解析を行ってゆく予定である。

cell-free protein synthesis, non-ribosomal peptide synthetase, Tyrocidine A

講演番号：2B18p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ B校舎18会場

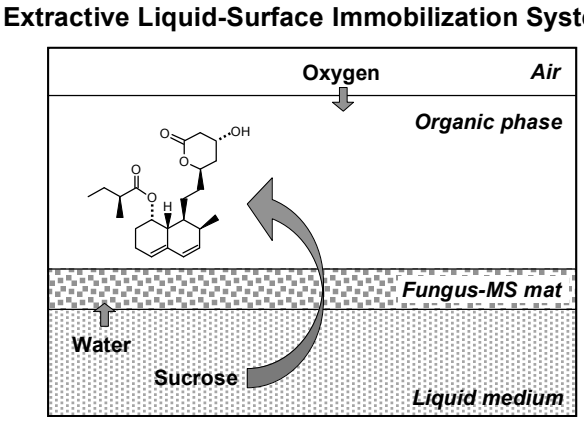
抽出液面固定化システムを用いたメバスタチンの発酵生産

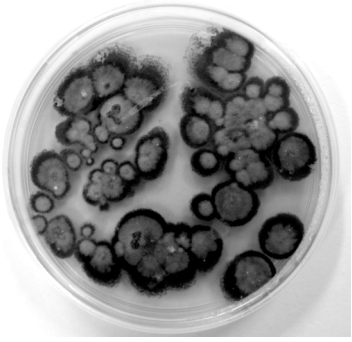
Production of mevastatin in an extractive liquid-surface immobilization system

○小田　忍、野口 奈津貴、大箸 信一（金沢工大・ゲノム研）
○Shinobu Oda, Natsuki Noguchi, Shinichi Ohashi (Kanazawa Inst. Technol.)

【目的】スタチン系高脂血症治療薬として世界中で使用されているプラバスタチンについては、ジェネリック医薬として流通している今日、その製造コストの低減が大きな課題となっている。特に、前駆体であるメバスタチンの効率的な製造プロセスの開発がプラバスタチン製造コストの低減に有効であり、生産株の育種改良と並んで、製造プロセスの改良を押し進めていく必要がある。メバスタチンのような脂溶性二次代謝物の新規な製造プロセスとして演者らは、液体培地と疎水性有機溶媒との界面に形成された糸状菌-中空微粒子（マイクロスフェアー）複合マットを発酵生産に利用する抽出液面固定化システム（Ext-LSI system）を報告した(1)。本研究では、この界面発酵システムを利用したメバスタチン生産株のスクリーニングと、選抜株についての発酵生産条件の最適化を検討した。

【方法・結果】ポリアクリロニトリル製中空微粒子(MS、MMF-DE-1)を用いて、修正サブロー培地と低粘性シリコンオイル（KF-96L-1CS）との液-液界面にPenicilliumに属する糸状菌を増殖させた。７日間の培養後、有機層を直接HPLCで解析することにより、メバスタチン生産株をスクリーニングした。その結果、約500株の中から、メバスタチンを8.4mg/L生産し得る野生株としてPenicillium sp. f12019をヒットした。本株は、メバスタチンと同一のUVスペクトルを示す高極性物質も副生していた。修正サブロー培地の炭素源をグルコースからスクロースに変更したところ、メバスタチンの生産量は大きく向上し、培養14日間で31.1 mg/Lのメバスタチンが生産された。一方、最適な窒素源はペプトンであった。その他、炭素源濃度、培地pH、温度、MS種、抽出溶媒等の最適化を図るとともに、副生物の生産能を欠損した変異株の取得も目指した。





Penicillium sp. f12019

(1) Oda, S., et al., Process Biochem., 44, 625-630 (2009).

Immobilization, mevastatin, secondary metabolite

講演番号：2B18p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ B校舎18会場

タイトル　リファンピシン耐性付与による放線菌の抗生物質生産性の増加と二次代謝の活性化に関する研究

Title　Antibiotic overproduction and activation of the secondary metabolite-biosynthetic gene clusters by *rpoB* mutation in various actinomycetes

○田中　幸徳[1,2]、越智　幸三[1,2]（[1]広島工大、[2]農研機構食総研）

○Yukinori Tanaka, Kozo Ochi（[1]Hiroshima Inst. Technol., [2]NARO-NFRI）

【目的】我々は既にいくつかの放線菌について、リファンピシン耐性変異（*rpoB*変異）が抗生物質生産性を増加させること、また、休眠遺伝子を目覚めさせることを報告している。本方法が有力な育種法であることを示すため、7種類の放線菌のリファンピシン耐性株の抗生物質生産性、二次代謝生合成遺伝子の発現を検討した。

【方法及び結果】モデル放線菌である*Streptomyces coelicolor*、エリスロマイシン生産菌*Saccharopolyspora erythrae*、バンコマイシン生産菌 *Amycolatopsis orientalis*、アクチノマイシン生産菌 *S. antibioticus*及び*S. parvulus*、フォルマイシン生産菌 *S. lavendulae*及びストレプトマイシン生産菌 *S. griseus*についてリファンピシン耐性菌を分離し、*rpoB*遺伝子内の変異点を決定した。続いて、変異株の抗生物質生産性を確認した結果、2～8倍の増加が見られた。また、ゲノムプロジェクトが終了している3菌株（*S. coelicolor*、*S griseus*、*S. erythraea*）について、二次代謝生合成遺伝子発現の解析を行った結果、ある種の*rpoB*変異株では劇的に二次代謝生合成遺伝子が活性化されていることを見出した。

本研究は、生研センターイノベーション創出事業のもとで行われた。

Streptomyces, Secondary metabolism, rpoB

講演番号：2B18p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ B校舎18会場

大腸菌での代謝経路再構築によるアーキア型膜脂質の生産

Production of archaeal-type membrane lipid by reconstructing the metabolic pathway in *Escherichia coli*

○磯部 圭祐、横井 宇、吉村 徹、邊見 久（名大院生命農・応用分子生命科）
○Keisuke Isobe, Takeru Yokoi, Tohru Yoshimura, Hisashi Hemmi
(Grad.Sch.of Bioagr.Sci.,Nagoya Univ.)

【目的】アーキアの膜脂質は他の生物群には見られない独自のものであり、その特徴はグリセロール部分の*sn*-2位と*sn*-3位にイソプレノイド鎖がエーテル結合していることである。イソプレノイド鎖の構造は様々であり、炭素数20～25の完全飽和イソプレノイド鎖を持つアーキオールや、２つのイソプレノイド鎖末端同士が結合し、二量化したカルドアーキオールなどの様々なコア構造を有する脂質が見つかっている。しかし、それらの生合成経路や生理的な意義には不明な点が多い。そこで我々は、アーキア由来の膜脂質生合成酵素遺伝子を複数クローニングし、それらを大腸菌に導入することにより、大腸菌内でのアーキア膜脂質の生産を目指した。この組換え大腸菌は、アーキア膜脂質の構造多様性を生み出す新奇生合成酵素の探索の手段として期待される。すなわち、同菌にアーキア遺伝子をさらに導入し、生産されるアーキア膜脂質、特にそのイソプレノイド鎖の構造を解析することで、既知の生合成経路に続く反応を触媒する未知酵素を単離することができると考えられる。
【方法】大腸菌の至適生育温度である37℃で高い活性を示すアーキア膜脂質生合成酵素は報告例が少ない。そこで、常温性メタン生成アーキアである*Methanosarcina acetivorans*より、アーキア膜脂質生合成に必要な４つの酵素［ゲラニルゲラニル二リン酸合成酵素、*sn*-グリセロール-1-リン酸デヒドロゲナーゼ、ゲラニルゲラニルグリセロールリン酸合成酵素、ジゲラニルゲラニルグリセロールリン酸（DGGGP）合成酵素］のホモログ遺伝子を新たにクローニングし、各ホモログの配列から予想される酵素活性を確認した。次に、その４つの遺伝子を同一のプラスミドに挿入したpBAD-ALB4を作製し、これにより大腸菌を形質転換した。その菌体から脂質を抽出し、LC-MSにより解析をおこなった。
【結果】導入した４つの酵素がすべて機能した場合、大腸菌内においてアーキア膜脂質の生合成中間体であるDGGGPが合成されると考えられる。解析の結果、(1) DGGGPの脱リン酸体、(2) DGGGP＋グリセロール、それぞれの分子量に一致するイオンピークが得られた。このことから大腸菌内でDGGGPが合成された後に、大腸菌の内在性の酵素がはたらき、脱リン酸化やグリセロール修飾がなされたことが示唆された。また現在、DGGGPのイソプレノイド鎖に存在する二重結合の還元を触媒する酵素、ゲラニルゲラニルレダクターゼやそのホモログの遺伝子をpBAD-ALB4に挿入し、それらのプラスミドで形質転換した大腸菌からアーキア脂質を抽出して構造解析を進めている。

isoprenoid, archaea, membrane lipid

講演番号：2B18p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ B校舎18会場

畜産草地研究所保有乳酸菌による発酵乳の機能性探索

Research on functionality of fermented milk by lactic acid bacteria of National Institute of Livestock and Grassland Science

○吉村 望、萩 達朗[1]、橘内 克弘[1]、成田 卓美[1]、田島 淳史、野村 将[1]（筑波大院生命環境、[1]農研機構・畜産草地研）

○Nozomi Yoshimura, Tatsuro Hagi[1], Katsuhiro Kitsunai[1], Takumi Narita[1], Atsushi Tajima, Masaru Nomura[1] (University of Tsukuba, [1]NILGS)

【目的】畜産草地研究所では、牛乳・乳製品や植物性発酵食品、生草等から分離した乳酸菌約2000株を保有しており、これらを利用した特徴ある乳製品の開発を目指している。2011年度大会において、乳酸菌23株の乳発酵特性を明らかにした。今回は、これら菌株による発酵乳について、γ-アミノ酪酸(GABA)生成および抗酸化能を調べた。

【方法】乳酸菌ライブラリーから、乳製品由来の*Streptococcus thermophilus* 4株、*Lactobacillus bulgaricus* 3株、*Lb. helveticus* 3株、および*Lactobacillus* sp. 13株の計23株を選択し、脱脂乳培地にて37℃で培養した。*S. thermophilus*と*Lb. bulgaricus*は両菌種の混合培養、その他の菌種は単独培養した。培養24、48時間後の試料について、遊離アミノ酸分析によりGABAの生成量を測定した。さらに、全乳を用いて各培養を調製し、48時間後の抗酸化能をDPPHラジカル消去活性評価法により測定した。

【結果】23株で計28通りの培養のうち、*S. thermophilus*と*Lb. bulgaricus*の混合培養で著量のGABA生成が観察され、特に*S. thermophilus* 9Y株あるいは501株と*Lb. bulgaricus* SYあるいはB-5b株の組合せで生成量が多かった。これら4株の単独培養のGABA生成量は混合培養のそれより少なく、培地に2.5 mM L-グルタミン酸ナトリウムを添加してもGABA生成量の増加は認められなかった。また、供試した全ての株において、培養後にDPPHラジカル消去活性は減少したが、B5-b+510およびL-52株における減少は他の株に比べて小さかった。本研究は農林水産省国産飼料プロジェクトの一環である。

milk fermentation, GABA, antioxidative potential

講演番号：2B18p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ B校舎18会場

ジャガイモ由来*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*におけるフェナジン生産およびクオラムセンシングの解析

Characterization of quorum sensing and phenazine production in *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* isolated from the potato

○諸星 知広、須藤 伴範、染谷 信孝[1]、池田 宰（宇都宮大院・工、[1]北海道農研セ）
○Tomohiro Morohoshi, Tomonori Sutou, Nobutaka Someya[1], Tsukasa Ikeda (Dept. Mol. Environ., Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., [1]Hokkaido Agric. Res. Cent.)

【目的】フェナジンは抗菌活性を有する化合物であり、様々な病原菌に対する防除作用が期待されている。フェナジン生産を示す*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508株はジャガイモ根より単離され、アシル化ホモセリンラクトン（AHL）を介したクオラムセンシングを有することが明らかになっている。他の*Pseudomonas*属細菌では、フェナジン生産がAHLを介したクオラムセンシングに制御されることが明らかとなっているが、*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*においては、遺伝子レベルでの詳しい解析は行われていない。本研究では、StFRB508株ゲノム情報からのAHL生産に関わる遺伝子を探索するとともに、AHL生産とフェナジン生産との関連性について解析を行った。
【方法・結果】StFRB508株ゲノムを解析したところ、2種類のAHL合成遺伝子およびAHLレセプター遺伝子のセット（*phzI*/*phzR*および*aurI*/*aurR*）が存在することが明らかとなった。次に、AHL生産とフェナジン生産の関連性を調べるため、AHL合成遺伝子*phzI*と*aurI*に抗生物質耐性遺伝子を挿入し、StFRB508株染色体上の各遺伝子を相同性組み換えにより破壊したが、片方のAHL合成遺伝子を破壊しただけではAHL生産とフェナジン生産は残存していた。そこで、*phzI*と*aurI*の二重破壊株を作製したところ、AHL生産とフェナジン生産の両方が見られなくなったことから、StFRB508株のフェナジン生産は*phzI*と*aurI*により生産されたAHLにより制御されることが明らかとなった。次に、二重破壊株に各種AHLを加えてフェナジン生産の応答を調べたところ、アシル鎖の炭素数が6のC6-HSLを加えたときに高いフェナジン生産が見られることが明らかとなった。次に、培地中の成分がフェナジン生産に及ぼす影響を調べるため、LB培地に各種単糖を添加した際のStFRB508株によるフェナジン生産を調べた。その結果、2%グルコースまたは2%スクロースを添加した際に高いフェナジン生産が見られることが明らかとなった。さらに、AHL合成遺伝子二重破壊株をグルコースまたはスクロース添加培地上で培養したところ、AHLを生産しないにも関わらず、ある程度のフェナジン生産を示すことが明らかとなった。以上より*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508のフェナジン生産は、AHLを介したクオラムセンシングと培地中の糖の両方に制御されることが明らかとなった。

phenazine, quorum sensing, *N*-acylhomoserine lactone

講演番号：2B18p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ B校舎18会場

タイトル　紅麹を副原料とした発泡酒の抗酸化活性
Title　Antioxidative activity of Low-Molt Beer Using Red Mold Rice
○玉城　愛加、玉城　康智（沖縄高専・生物資）
○Aika Tamaki, Yasutomo Tamaki (Okinawakousen)

【目的】発泡酒は「政令に定められている副原料を麦芽の重量の 100 分の 50 以上または政令に定められている副原料以外の素材を使用したもの」と定められており，日本では近年，副原料に様々な素材が使用されることで製品の多様化が進んでいる。ビールや発泡酒は醸造酒に分類され，蒸留酒のしょうちゅうとは異なり原料由来の味や成分をより製品に活かすことができる。一方，紅麹は古くから中国や台湾で紅酒・老酒の原料として利用され，沖縄では豆腐ようの製造に利用されている。紅麹は鮮やかな紅色と，生理活性物質ロバスタチンや GABA を含むことで注目されている。また，近年では抗酸化活性を持つことも報告されている。そこで本研究では，機能性食品として注目される紅麹を発泡酒の副原料として使用し，抗酸化活性を有する発泡酒の醸造を試みた。

【方法】通常の発泡酒醸造で副原料として使用されている米の代わりに紅麹を用いて試験醸造を行った。紅麹菌は，独立行政法人製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源部門(NBRC)で購入した菌株の中で NBRC4488(*Monascus ruber*)，NBRC4486(*M. purpureus*)，NBRC4484(*M. purpureus*)の 3 株を用いた。発泡酒の醸造は，糖化工程(66-70℃，60min)，失活工程(76℃以上，10min)，ろ過工程(スパージング)，ホップ添加(100℃，90min)，一次発酵工程(25℃，1week)，二次発酵工程(25℃，3week 以上)を経て醸造した。また，比較として米を副原料として(以下，米ビール)同様の操作でビールを醸造した。試験醸造した紅麹発泡酒および米ビールの抗酸化活性は，DPPH 分光測定法により測定し，DPPH 溶液の退色から Trolox 相当量を求めた。

【結果】試験醸造した紅麹発泡酒は，一般的な副原料である米を使用した場合と比較して糖度やエタノール濃度に大きな問題はなかった。また，麦汁の糖度および発泡酒のエタノール濃度も一般的なビール醸造の基準範囲内であったことから，紅麹は発泡酒の副原料として利用可能であると考えられた。また，紅麹発泡酒は米を使用した場合や市販ビールに比べ赤色であること，抗酸化活性が高い傾向があることが確認された。以上のことから，紅麹を使用して発泡酒を製造することで特徴のある発泡酒となることが示唆された。

Red mold rice, Low-molt beer, Antioxidative activity

講演番号：2B18p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ B校舎18会場

改良型ベンジルイソキノリンアルカロイド生合成系を用いた大腸菌でのレチクリン生産

Microbial production of benzylisoquinoline alkaloid using a newly designed pathway to reduce byproducts

○中川 明、松村 栄太郎、小柳 喬、松田 元規、南 博道、片山 高嶺、
佐藤 文彦[1]、熊谷 英彦 、山本 憲二（石川県立大、[1]京大院・生命）
Akira Nakagawa, Eitaro Matsumura, Takashi Koyanagi, Motoki Matsuda, Hiromichi Minami, Takane Katayama, Fumihiko Sato[1], Hidehiko Kumagai, Kenji Yamamoto (Ishikawa pref. univ., [1]Kyoto Univ.)

モルヒネ等のベンジルイソキノリンアルカロイド（BIA）は、植物の産生する二次代謝産物であり、薬理作用を持つため医薬品として広く利用されている。我々は、大腸菌を用いてグルコースから BIA の重要な中間体であるレチクリンの発酵生産に成功している(1)。レチクリンは、ドーパミンとモノアミンオキシダーゼ(MAO)により生成されるドーパミン由来のアルデヒドがカップリングすることにより生産されるが、チラミン及びフェネチルアミン由来のアルデヒドがそれぞれドーパミンとカップリングした BIA も生産されていることが明らかとなった。これは、ドーパをドーパミンに転換するために用いたドーパデカルボキシラーゼと MAO により、チラミン及びフェネチルアミン由来のアルデヒドが生成されることが原因であると考えられた。本研究では、この 2 種類の BIA の副次的な生成を防ぎ、効率的なレチクリン生産を行うことを目的に、新たなレチクリン生合成経路の構築を行った。

ドーパミンとアルデヒドのカップリング反応はノルコクラウリン合成酵素(NCS)によって行われるが、NCS は同様にドーパミンと 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(4-HPP)をカップリングすることが知られている(2)。4-HPP はチロシンの前駆体であり、大腸菌が本来合成する化合物である。そこで、チロシンをドーパに転換するために用いたチロシナーゼにより、4-HPP を 3,4-ジヒドロキシフェニルピルビン酸(3,4-DHPP)に転換し、3,4-DHPP とドーパミンを NCS によりカップリングさせることができれば、MAO を用いずにレチクリンを生産できる。MAO を用いないことでアルデヒドが生成されず、副次的な BIA も減るものと考えられた。実際に、MAO を有しないレチクリン生産菌を構築し生産培養したところ、レチクリンが生産された一方で、副生成 BIA は著しく減少した。今回、その改良型の生合成経路及びレチクリンの生産量向上について報告する。

(1)Nakagawa et al., *Nat Commun* 2011; 2:326
(2)Minami et al., *J Biol Chem.* 2007; 282(9):6274-82

alkaloid, microbial production, synthetic biology

講演番号：2B18p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ B校舎18会場

タイトル　放線菌の抗生物質高生産 *rpsL*（S12）変異株の定常期に存在する翻訳活性化因子の解析

Title　Analysis of translational activation factors in an antibiotic-overproducing *Streptomyces coelicolor* ribosomal *rpsL* mutant

○岩川 千紘、今井 優、渡邉 健、越智 幸三[1]、保坂 毅[2]（信州大・農、[1]広工大・情報、[2]信州大・若手拠点）

○Chihiro Iwakawa, Yu Imai, Ken Watanabe, Kozo Ochi[1], Takeshi Hosaka[2]（Shinshu Univ., [1]Hiroshima Inst. Technol., [2] YREC Shinshu Univ.）

【目的】放線菌において、特定の *rpsL* 変異（リボソームタンパク質 S12 遺伝子における変異）は、ストレプトマイシン耐性を付与するとともに、抗生物質の生産性を向上させる[1)]。モデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* では、リボソームタンパク質 S12 の 88 番目のアミノ酸がリジンからグルタミン酸へと置換した *rpsL*K88E 変異株が抗生物質を高生産する。この変異株は増殖定常期においても高い翻訳活性を維持するという特異な能力をもつことで特徴づけられている[2)]。抗生物質生合成遺伝子の多くは、対数増殖期よりもむしろ定常期において活発に転写されている。この時期に高い翻訳活性を有する *rpsL*K88E 変異株は、抗生物質の生合成に関わる酵素を効率的に生産できるため、結果的に抗生物質を高生産すると考えられている。しかしながら、*rpsL*K88E 変異株が定常期に高い翻訳能力を発揮する仕組みの詳細は未だ明らかになっていない。

本研究では、放線菌 *S. coelicolor* の抗生物質高生産 *rpsL*K88E 変異株の定常期における翻訳活性の増強機構を解明することを目的とし、同変異株の定常期に存在する翻訳活性化因子の探索と機能解析に着手した。

【方法及び結果】*S. coelicolor* の野生株及び抗生物質高生産 *rpsL*K88E 変異株の定常期細胞から調製した抽出液を超遠心分離（150,000×g, 3 時間）し、S-150 画分（上清）とリボソーム画分（沈殿）を得た。これらを試料とした *in vitro* 翻訳反応において、変異株の S-150 画分には何らかの翻訳活性化因子が存在することが判明している。そこで、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、変異株の S-150 画分のタンパク質プロファイルを野生株のそれと比較した。その結果、変異株の定常期では約 15 kDa の機能未知タンパク質 SCO4175 が著しく高発現していることを突き止めた。現在、大腸菌で過剰発現させた SCO4175 タンパク質を *S. coelicolor* の *in vitro* 翻訳系に供試し、SCO4175 タンパク質が翻訳活性化機能を有するのか否かを調べている。一方、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、定常期における変異株では、伸長因子 G（EF-G）やリボソーム結合因子 A（RbfA）など、いくつかの翻訳因子の発現量が野生株よりも高いことが明らかになった。以上の結果から、これら因子の協同的な働きが、定常期における抗生物質高生産 *rpsL*K88E 変異株の翻訳活性を増強させる要因であると推察した。

【参考文献】

1）Ochi K. *et al*., *Adv. Appl. Microbiol.* 56: 155-184（2004）.

2）Hosaka T. *et al*., *Mol. Microbiol.* 61: 883-897（2006）.

ribosomal *rpsL* mutation, translational activation factors, antibiotic production

講演番号：2B18p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ B校舎18会場

タイトル　リボソーム攻撃性薬剤を利用した紅麹菌の潜在的色素生産力の劇的活性化

Title　Dramatic activation of potential of *Monascus pilosus* to produce pigments using drugs that target the ribosome

水上 智也、越智 幸三[1]、○保坂 毅[2]（信州大・農、[1]広工大・情報、[2]信州大・若手拠点）

Tomoya Mizukami, Kozo Ochi[1], ○Takeshi Hosaka[2] (Shinshu Univ., [1]Hiroshima Inst. Technol., [2]YREC Shinshu Univ.)

【背景と目的】 放線菌にストレプトマイシンなどのリボソームを標的とするアミノグリコシド系抗生物質に対する耐性を付与すると、二次代謝産物の生産性がしばしば向上する[1)]。この知見をもとにして、真核生物である紅麹菌においても同様の現象が起こるか否かを検討したところ、ハイグロマイシン耐性を獲得した変異株が二次代謝産物（赤色色素）を高生産することを明らかにしたので報告する。また、その検討過程において、sublethal 濃度のハイグロマシン存在下で紅麹菌の色素生産性が劇的に向上することも突き止めたので、併せて報告する。

【方法と結果】 本研究では、紅麹菌 *Monasucus pilosus* NBRC4520 を実験材料とした。ポテトデキストロース寒天（PDA）培地を用いてハイグロマイシンの最小生育阻止濃度（MIC）を調べたところ、40 μg/ml であった。*M. pilosus* NBRC4520 の高密度分生子懸濁液を調製し、60 μg/ml 及び 80 μg/ml のハイグロマイシンを含む PDA 培地に塗抹した。25℃で 20 日間インキュベートした後、出現したコロニーをハイグロマイシン耐性変異株の候補株として分離した（出現頻度は 8.6×10^{-7}）。最終的に、これら候補株のうち耐性の維持が認められた 8 菌株をハイグロマイシン耐性変異株として選抜した。各ハイグロマイシン耐性変異株の色素生産性を PDA、ツァペックおよび麦芽エキス寒天培地を用いて調べたところ、そのうちの 2 菌株が野生株よりも高い色素生産性を示した。両菌株は液体培養においても色素を高生産することを確認した（野生株の約 5 倍）。現在、耐性変異株の特性を詳細に調べるとともに、変異遺伝子の特定にも着手している。

一方、*M. pilosus* に対するハイグロマイシンの MIC を決定する過程で、sublethal 濃度のハイグロマシン存在下で同菌株の色素生産性が向上することを見出した。MGP 培地を用いた液体培養により確認したところ、本菌株は若干の生育阻害が認められる 2~8 μg/ml のハイグロマイシンを添加した条件下で添加しない時の約 10~15 倍の色素生産を示した。他のアミノグリコシド系抗生物質（G418 など）は無効であったので、ハイグロマイシン特有の効果であると判断した。

以上のように、「ハイグロマイシン耐性の付与」と「sublethal 濃度のハイグロマイシンの培地添加」という遺伝的、生理的な 2 つの手法により、紅麹菌の潜在的な色素生産力を活性化し得ることを実証できた。本研究の成果は、紅麹菌のみならず一般的な糸状菌利用の高度化に向けて、極めて重要な新しい知見といえる。*Penicillium chrysogenum* のペニシリン生産に対する効果も併せて報告する予定である。

【参考文献】

1）Ochi K. *et al*., *Adv. Appl. Microbiol.* 56:155-184（2004）.

Monascus pilosus, hygromycin, secondary metabolites production

講演番号：2B18p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ B校舎18会場

ニホンミツバチ腸内細菌からの抗アメリカ腐蛆病菌活性を有する新規バクテリオシンの探索

Screening of new anti-*Paenibacillus larvae* (honeybee pathogen) bacteriocin from intestinal bacteria of *Apis cerana japonica*

○杉村 祐哉[1]、呉　梅花[1,2]、芳山 三喜雄[1]（[1]農研機構・畜草研、[2]筑波大院・生命環境）
○Yuya Sugimura[1], Meihua Wu[1,2], Mikio Yoshiyama[1] ([1]NARO Institute of Livestock and Grassland Science, [2]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

【目的】ミツバチの病原細菌であるアメリカ腐蛆病菌（*Paenibacillus larvae*）は家畜伝染病予防法における法定家畜伝染病である。2齢以内の幼虫が腐蛆病菌の芽胞を摂食することで感染・発症することが知られている。アメリカ腐蛆病の防除は抗生物質を用いた方法が主であるが、蜂蜜への残留の問題や利用可能な抗生物質の制限など問題点が多い。そこで、本研究では病原細菌に対する抵抗性が強いと考えられているニホンミツバチ（*Apis cerana japonica*）腸内細菌より新規バクテリオシン生産菌の探索を行い、バクテリオシンを用いたアメリカ腐蛆病の防除方法の確立を目指した。

【方法・結果】ニホンミツバチ腸内細菌からアメリカ腐蛆病菌に対してバクテリオシン様物質を産生していると思われる菌株*Bacillus cereus* Ni10（Ni10株）を得た。そこでNi10株を用いて検討を行った。Ni10株の抗菌物質の作用機作を調べるため、Ni10株培養上清をアメリカ腐蛆病菌培養液に添加し培養を続けた。Ni10株培養上清の添加以後、アメリカ腐蛆病菌培養液の吸光度は上昇せず、生菌数も減少することが明らかとなった。そのため、Ni10株の抗菌物質は殺菌的に作用することが明らかとなった。次に、*in vivo*での効果を検討するため、Ni10株培養上清をアメリカ腐蛆病菌の芽胞を添加したミツバチの幼虫の餌に混合し、幼虫に投与することで生存率を調べた。*In vivo*試験の結果、芽胞のみ添加した餌を摂食した幼虫は5齢までに90%以上が死亡した（図1）。一方、Ni10株の培養上清を芽胞と同時に摂食させた場合、餌のみを摂食した対照群の幼虫と違いは見られず、生存率は高いまま維持された。以上の結果より、ニホンミツバチ腸管内より取得したNi10株の産生するバクテリオシン様物質はアメリカ腐蛆病防除に効果的に利用可能であることが明らかとなった。本研究は生研センターイノベーション創出事業によるものである。

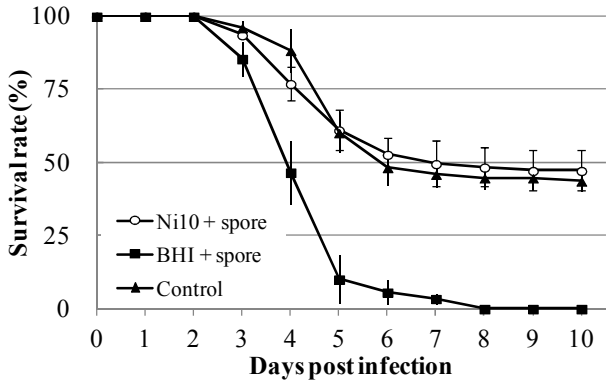


図1 Ni10株バクテリオシン様物質のアメリカ腐蛆病予防効果
Ni10 + spore:Ni10株上清と芽胞を混合して投与
BHI + spore：BHI培地と芽胞を混合して投与
Control：餌のみ投与

Apis mellifera, Bacteriocin-like substance, *Paenibacillus larvae*

講演番号：2B18p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ B校舎18会場

二成分性バクテリオシン「ガセリシンT」の発現および GxxxG モチーフが抗菌活性に及ぼす影響

Effects of mutation of the GxxxG motifs on the antibacterial activity of gassericin T, a class IIb bacteriocin

○ 安田 成美、川井 泰、伊藤 喜之[1]、荒川 健佑[2]、中村 圭志、西村 順子、北澤 春樹、齋藤 忠夫（東北大院農・生物産業創成、[1]明治・食機科研、[2]岡山大院自科）

○Narimi Yasuta, Yasushi Kawai, Yoshiyuki Ito[1], Kensuke Arakawa[2], Kiyoshi Nakamura, Junko Nishimura, Haruki Kitazawa, Tadao Saito (Tohokudaiin, [1]Meiji, [2]Okayamadaiin)

【目的】ヒト腸管から高頻度で検出される乳酸菌 *Lactobacillus gasseri*（ガセリ菌）は、相補的な二成分 GatA/GatX から構成される class IIb バクテリオシン「ガセリシンT」を生産する株が多い。ガセリシンT は広い抗菌スペクトルと温度・pH に対する高い安定性を有しており、天然の食品保存剤として有望と考えられる。しかし、ガセリシンT の作用機構については未だ不明な点が多い。また、GatA および GatX には、ヘリックス間相互作用や構造の安定化に関わるとされる推定 GxxxG モチーフ部位がそれぞれ複数存在し、ガセリシンT の作用機構に重要な役割を担っていると考えられる。本研究では、アミノ酸置換改変ガセリシンT を作製し、GxxxG モチーフが抗菌活性に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

【方法】*L. gasseri* LA158株のガセリシンT 発現系を構築するため、生合成遺伝子クラスター（*gatPKRTCZAXI*）上の構造遺伝子 *gatAX* を欠損させた LA158Δ*gatAX* を作製し、宿主とした。乳酸球菌由来の発現ベクター pIL253-P_{32} の P_{32} プロモーター下流に *gatAX* を挿入した pGT-AX を LA158Δ*gatAX* に導入した後、プラスミドとして導入した *gatAX* からガセリシンT が生産・分泌されることを確認した。次いで、pGT-AX を鋳型とした PCR を行って *gatA*/*gatX* 中の推定 GxxxG モチーフに Gly → Ala のアミノ酸置換変異を導入後、変異プラスミドを LA158Δ*gatAX* に形質転換し、各変異の抗菌活性への影響を確認した。

【結果】ガセリシンT 構造遺伝子 *gatAX* を欠損させた LA158Δ*gatAX* ではガセリシンT 活性が消失した。LA158Δ*gatAX* に、*gatAX* を組み込んだプラスミド pGT-AX を形質転換した株では、野生株 LA158 と比較して活性は 1/8 に低下したものの、ガセリシンT の発現が認められた。次いで、 pGAT I 中 *gatAX* の GxxxG モチーフ改変を行った結果、GatA の推定膜貫通ヘリックス領域に含まれる G_{18}xxxG_{22}、G_{27}xxxG_{31}、またはその両モチーフに含まれる各 Gly 残基を Ala 置換した変異体の全てにおいて抗菌活性の消失が認められた。このことから、GatA の G_{18}xxxG_{22}、G_{27}xxxG_{31} 両モチーフはガセリシンT の抗菌活性に必須であることが明らかになった。現在、GatA、GatX に含まれる、上記以外の GxxxG モチーフについて同様の解析を行い、ガセリシンT の活性発現に関わるアミノ酸残基・部位の特定を進めている。

bacteriocin, GxxxG motif, mutational analysis

講演番号:2B18p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ B校舎18会場

N・C末端がリンクした環状バクテリオシン「ガセリシンA」の生合成機構に関する研究

Genetic study on biosynthesis of gassericin A, a circular bacteriocin having peptide-bonded N- and C- terminal ends

中村 圭志、荒川 健佑[1]、鈴木 はるか、安田 成美、○川井 泰、伊藤 喜之[2]、西村 順子、北澤 春樹、齋藤 忠夫（東北大院農・生物産業創成、[1]岡山大院自科、[2]明治・食機科研）

Kiyoshi Nakamura, Kensuke Arakawa[1], Haruka Suzuki, Narimi Yasuta, Yasushi Kawai, Yoshiyuki Ito[2], Junko Nishimura, Haruki Kitazawa, Tadao Saito (Tohokudai, [1]Okayamadai, [2]Meiji)

【目的】ヒト腸管から高頻度で検出される乳酸菌 *Lactobacillus gasseri*（ガセリ菌）には、バクテリオシン（抗菌ペプチド）を生産する株が多数存在する。これらバクテリオシン（ガセリシン）は、高い熱・pH 安定性と、リステリア菌、バチルス菌、黄色ブドウ球菌などのグラム陽性食中毒・病原性細菌に対する抗菌効果を示し、食品保存剤としての応用が期待される。ヒト乳児糞便由来の *L. gasseri* LA39 株が生産する「ガセリシンA」は、N 末端と C 末端がペプチド結合した特徴的な環状構造を有している。環状ペプチドは、微生物からアカゲザルまでの広い生物種から 100 種類以上見出されているが、ガセリシンA を含めて、環状化機構や生物学的意義は詳しく解明されていないものが多い。本研究では、ガセリシンA 生合成遺伝子クラスターの部分欠損あるいはガセリシンA 構造遺伝子への変異導入を行い、生合成機構の解明を試みた。

【方法】ガセリシンA 生合成遺伝子クラスター *gaaBCADITE* 全域を含むプラスミドを基に、各 1 遺伝子欠損、あるいは構造遺伝子 *gaaA* に多種の 1 アミノ酸置換あるいはリーダー配列部分欠損変異を導入したプラスミドを作製した。バクテリオシン非生産株 *L. gasseri* JCM1131^T にこれらのプラスミドを導入後、各培養上清の抗菌活性を測定すると共に、ガセリシンA の親水性領域に対する抗体を用いてガセリシンA 生産量の定量を行った。また、一部の上清から変異ガセリシンA を逆相 HPLC で精製後、質量分析（FAB-MS）を行い、理論分子量から H_2O 1 分子相当の 18 低い値を検出することにより環状化形成を判定した。

【結果】生合成遺伝子の欠損試験では、*gaaBD*（機能未知膜タンパク質）、*gaaI*（自己耐性ペプチド）、*gaaTE*（推定 ABC トランスポーター）の各遺伝子欠損では抗菌活性は認められず、*gaaC*（機能未知膜ペプチド遺伝子）欠損でのみ抗菌活性が認められたが、質量分析の結果、D23-A24 間で切断された非環状型であった。これらの結果から、ガセリシンA の生合成・分泌にはクラスターの全遺伝子が関与していることが明らかとなった。*gaaA* 変異体（計 24 種類）に関しては、ガセリシンA（58 アミノ酸）の I1A、Y2F、W3F 変異体では抗菌活性が認められたが、I4、A58 残基に関しては作製した全ての変異体で抗菌活性が検出されなかった。リーダー配列（33 アミノ酸）の N 末 9 アミノ酸までの欠失および C 末の変異（N-1A、N-1D）でも抗菌活性は維持された。N-1A、N-1D および I1A 変異体の質量分析の結果、環状構造が保持されていた。これらの結果から、環状化・活性の維持には 2、3 残基目の芳香環側鎖、4 残基目の I、58 残基目の A が重要であり、一方 -1、1 部位およびリーダー配列の N 末領域は寄与が低いことが示された。

bacteriocin, antimicrobial, peptide

講演番号：2B18p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ B校舎18会場

ランチビオティックnukacin ISK-1の異常アミノ酸形成酵素NukMの機能解析

Characterization of NukM, the modification enzyme of nukacin ISK-1

○島藤千那津[1]，西江麻美[1]，永尾潤一[2]，園元謙二[1,3]（[1]九大院生資環・生機科，[2]福岡歯大・機能生物，[3]九大・バイオアーク）

○Chinatsu Shimafuji[1], Mami Nishie[1], Jun-ichi Nagao[2], Kenji Sonomoto[1]（[1]Kyushu University, [2]Fukuoka Dental College）

【目的】Nukacin ISK-1は抗菌性ペプチドであり、タイプA(II)ランチビオティックに分類される。リボソーム上で合成されたプレペプチドNukAは異常アミノ酸形成酵素NukMにより4ヶ所のSer、Thrがリン酸化および脱リン酸化を経て脱水された後、分子内のCysとの3ヶ所の環化という翻訳後修飾を受け、異常アミノ酸が導入される。NukMのC末端($NukM_C$)はタイプA(I)ランチビオティックの環化酵素であるLanCと20%の相同性を示すことから環化に関与していると推測される。また、タイプA(I)ランチビオティックの脱水酵素LanBと相同性は持たないがN末端($NukM_N$)が脱水に関与していると推測した。本研究ではNukMを二つのドメイン($NukM_N$, $NukM_C$)に分割し、それぞれの機能解析を行った。

【方法】大腸菌内で*nukA*、*nukM*$_N$、*nukM*$_C$をそれぞれHis-tag融合物として発現し、精製した。*in vitro*において$NukM_N$および$NukM_C$をNukAと反応させ、反応生成物を質量分析により解析した。また、NukMの基質認識部位の解明を行うため、基質であるNukA存在時および非存在時における精製NukM, $NukM_N$および$NukM_C$のATPase活性を測定した。

【結果】NukM全長と反応させた場合、4脱水3環化を生じた修飾NukAが検出された。$NukM_N$と反応させたものからは3脱水1環化または2脱水1環化1リン酸化を生じた部分修飾NukAが検出された。$NukM_C$と反応させたものでは未修飾のNukAのみが検出された。このことより、NukMのN末端は脱水、リン酸化および環化を担っていることが確認でき、C末端は基質を修飾出来ないことが示唆された。ATPase活性の結果では、NukM全長のNukA非存在時のATPase活性を100%とした場合、NukA存在下では138%の活性が確認できた。$NukM_N$はNukAの存在により42%から72%へと増加し、$NukM_C$はNukA存在下でも顕著な活性の増加は見られなかった。以上の結果から、N末端側が基質と直接的に作用していることが示唆された。しかし、$NukM_N$では完全な修飾が行えなかったことから、C末端の存在も不可欠であると予測された。

Bacteriocin, Lantibiotic, post-translational modification

講演番号:2B18p19
講演日時、会場:3月23日17:37～ B校舎18会場

Nukacin ISK-1のABCトランスポーターのドメイン間協調的作用に関する研究

Cooperative functioning of the two domains in ABC transporter

○西江　麻美[1]、佐々木　信[1]、永尾　潤一[2]、園元　謙二[1,3]（[1]九大院生資環・生機科、[2]福岡歯大・機能生物、[3]九大・バイオアーク）

○Mami Nishie[1], Makoto Sasaki[1], Jun-ichi Nagao[2], Kenji Sonomoto[1] ([1]Kyushu University, [2]Fukuoka Dental College)

【目的】抗菌性ペプチドnukacin ISK-1はリーダー領域を含む前駆体として菌体内で生合成される。前駆体はNukTによりリーダー領域が切断され、nukacin ISK-1として菌体外へ輸送されると推定される。NukTはN末端にペプチダーゼドメイン(PEP)、C末端にATP結合ドメイン(ABD)の保存配列を有するABC transporter Maturation and Secretion (AMS) 型タンパク質である(1)。本研究ではNukTの保存配列に注目しその特性を解明した。

【方法】保存領域に変異を導入し、各ドメインを失活させたNukT変異体を構築した。①輸送活性はnukacin ISK-1異種発現系を用いて培養液上清と菌体内のペプチドを質量分析法で評価した。②リーダー領域の切断活性は、NukT発現株から調製した反転膜小胞を用い、前駆体と反応後、抗菌活性および質量分析法により評価した。

【結果】①NukT発現株では培養液上清にnukacin ISK-1が検出された。ほぼ全てのNukT変異株で欠損株と同様に菌体内に前駆体が検出され、リーダー領域の切断および輸送のいずれも起こらなかった。②ABD 変異体を含むNukT変異体は*in vitro*でリーダー領域を切断できなかった。以上のことから、NukTはPEP、ABDのドメイン単独では機能せず、両ドメインが協調的に作用することではじめてNukT全体としての機能を発揮できることが示された(2)。

1. Nishie et al. ATP-dependent leader peptide cleavage by NukT, a bifunctional ABC transporter, during lantibiotic biosynthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering 108(6):460-464 (2009)*

2. Nishie et al., Lantibiotic transporter requires cooperative functioning of the peptidase domain and the ATP binding domain. *Journal of Biological Chemistry 286(13):11163-11169 (2011)*

ABC transporter, AMS protein, lantibiotic

講演番号:2B18p20
講演日時、会場:3月23日17:48～ B校舎18会場

Title: Ring A of nukacin ISK-1: a lipid II binding motif for type-A(II) lantibiotic

○Riazul ISLAM[1], Mami Nishie[1], Jun-ichi Nagao[2], Takeshi Zendo[1], Jiro Nakayama[1], Daisuke Kohda[3], Hans-Georg Sahl[4], Kenji Sonomoto[1,5] ([1]Kyushu University, [2]Fukuoka Dental College, [3]Kyushu University, [4]University of Bonn, [5]Kyushu University Bioarch)

【目的】Nukacin ISK-1 is a type-A(II) lantibiotic consisting of 27 amino acids with a linear N-terminal and globular C-terminal regions. Ring A of nukacin ISK-1, also present in different peptides of this group, resembles a lipid II binding motif (TIS/THD/EC) similar to those in mersacidin, LtnA1 of lacticin 3147 and plantaricin C, which might lead to a strong possibility that nukacin ISK-1 binds to lipid II as a docking molecule. Therefore the aim of this study was to elucidate the lipid II binding motif of nukacin ISK-1 emphasizing ring A.

【方法】Antagonism assay was performed using different peptides and peptidoglycan precursors (C_{55}-P, lipid I and lipid II) with *Lactococcus lactis* HP as an indicator strain. Accumulation experiment for cell wall precursor, UDP-MurNAc-pp, was done in *in vivo* system in *Staphylococcus aureus* SG511. Interaction analysis was investigated using VP-ITC (Isothermal Titration Calorimetry).

【結果】In our previous study positional significance of ring A residues has been investigated and found T9, S11, H12, D13 and C14 residues are essential for the biological activity of nukacin ISK-1 (Islam *et al.* Mol Microbiol 2009). Antagonism assay using different peptidoglycan precursors revealed that nukacin ISK-1 and nukacin D13E (a higher active variant) activity can be introverted by lipid I and lipid II molecules. We also observed a significant accumulation of peptidoglycan precursor, UDP-MurNAc-pp, for nukacin ISK-1 and nukacin D13E treatment compared to nukacin D13A (a less active variant) in *in vivo* system. From the interaction analysis nukacin ISK-1 and nukacin D13E were found with strong but similar binding affinities to DOPC and DOPC membrane embedded with 0.1 mol% lipid II, but nukacin D13A and nukacin C14S (a negative variant with no ring A structure) showed significantly lower affinities. Direct interaction of lipid II and different ring A variants displayed that nukacin ISK-1 and nukacin D13E have strong affinities (K_A, 5.90×10^6 M^{-1} and 5.45×10^6 M^{-1} respectively) to lipid II molecule; whereas nukacin D13A showed lower and nukacin C14S exhibited no interaction. Therefore based on the structural similarity and comparing with the positional significance of amino acids, here we inferred that nukacin ISK-1 binds lipid II molecule with ring A region.

lantibiotic, nukacin ISK-1, lipid II binding motif

講演番号：2B19a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ B校舎19会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の分生子特異的遺伝子の機能解析

Functional analysis of conidia specific gene in *Aspergillus oryzae*

○辻井 雅，森田 寛人，前田 浩，山形 洋平，竹内 道雄（東農工大院・応生化）

○Masaru Tsujii, Hiroto Morita, Hirosi Maeda, Youhei Yamagata, Michio Takeuchi (Tokyo univ. of agriculture and technology)

【目的】黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、我が国の醸造産業において酵素の供給源として広く用いられ、食品利用で安全な微生物として認められている。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の分生子及び発芽分生子の EST 解析の結果、 331-25 遺伝子から転写される mRNA は分生子にのみ見出され、 528 の EST のうち 43 回という高頻度で読まれた。本研究は 331-25 遺伝子から転写され、分生子特異的に存在する mRNA の機能を明らかにすることを目的として解析を行なった。

【方法】分生子、発芽分生子及び菌糸における 331-25 遺伝子 RNA の存在量の違いを確認するために、 Cz 培地にて *A. oryzae* RIB40 を平板培養した後、分生子を回収し、この分生子を Cz 培地にて液体培養し、菌体を回収した。次いで、その液体培養した菌体を、さらに Cz 平板培地にて 48 時間固体培養した菌体を分生子着生直前の菌体とした。得られた菌体から total RNA を抽出して,それをテンプレートに cDNA 合成を行い、 RT-PCR によって 331-25 遺伝子 RNA の各条件における存在量の比較を行なった。また、分生子から得られた total RNA をテンプレートに、 oligodT adapter primer を用いて逆転写を行い、 adapter primer と上流特異的プライマー、 adapter primer と下流特異的プライマーを用いた RT-PCR によって正鎖からの RNA と相補鎖からの RNA の存在量の比較を行なった。さらに、 5’- RACE 法と 3’- RACE 法を用いて転写開始点と転写終結点の決定を行なった。また、 331-25 遺伝子の破壊株を作製して、各条件で培養を行いその表現型を観察することによって、 331-25 遺伝子の機能解析を行なった。

【結果】分生子、発芽分生子、菌糸及び分生子着生直前における 331-25 遺伝子から転写される RNA の存在量について比較したところ、 331-25 遺伝子 RNA は分生子に特異的に存在していて、 初期発芽分生子では僅かにしか検出されず、発芽分生子と菌糸、分生子着生直前においては存在していないことが確認された。正鎖から転写される RNA と相補鎖から転写される RNA の存在量の比較では、分生子内で 331-25 遺伝子の正鎖からの RNA は微量に存在していたが、相補鎖からの RNA の方がより多量に存在していることが確認された。また、転写開始点と転写終結点の決定によって ORF の決定を行なった。さらに、 331-25 遺伝子の破壊株の固体培養における表現型の観察では、ホスト株と破壊株において表現型に差は認められなかった。

Aspergillus oryzae ,conidia ,RNA

講演番号：2B19a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ B校舎19会場

麹菌*Aspergillus oryzae*のハイドロフォービンHypA,HypBおよびHypCの機能解析

Function analysis of Hydrophobins, HypA, HypB and HypC in *Aspergillus oryzae*

○山川　結、水野佑香、石川絢也、中島春紫（明治大・農・農化）
○Yui Yamakawa, Yuka Mizuno, Junya Ishikawa, Harushi Nakajima (Dept. of Agricultural Chemistry , Meiji Univ.)

【目的】
ハイドロフォービンとはカビやキノコに見られる細胞表層タンパク質である。8つのCys残基の保存性や3次元構造が両親媒性を示すなどの特徴を持つ。これらはモノマーとして菌体外に分泌された後、親水-疎水界面で自己集合して表面張力を低下させ、気中菌糸の伸長を促す役割を果たす。気中構造表面で層を形成し菌体に撥水性を与えることや、植物細胞表面などへの吸着にも関与することが報告されている。一般に、1つの菌株はハイドロフォービン遺伝子を複数所有しているが、その使い分けについてはほとんど解明されていない。そこで本研究室では、清酒・味噌・醤油などの日本の伝統食品の醸造微生物である黄麹菌*Aspergillus oryzae*より、4つのハイドロフォービン遺伝子（*hypA, hypB, hypC, hypD*）を単離し、*hypA, B, C*については発現を確認している。蛍光タンパク質を用いた局在解析によりHypAのみ特異的に分生子に局在する事が観察されたことから、これらは機能的に使い分けられていると示唆されている。そこで本研究では個々のハイドロフォービンの機能解明を目的とした。
【方法】
ハイドロフォービン遺伝子*hypA, hypB, hypC*について、マーカーリサイクリング法を用いて単独および多重破壊株を作製した。これらの破壊株についてSEMやAFMを用いて分生子や菌糸の微細構造観察を行った。さらに各々の*hyp*遺伝子の転写量を測定し、形態（コロニーの大きさや分生子の色など)、発芽率やコロニー撥水性などについて比較した。
【結果】
*hyp*遺伝子群の破壊による基底菌糸の形態および生育速度などへの影響はほとんど認められなかった。しかし*hypA*遺伝子の破壊により分生子の表面構造は変化し、黒色化しやすくなり凝集性が高まるなどの変化が観察された事から、HypAと分生子との密接な関係が示唆された。一方、*hypB*遺伝子の破壊株では菌糸表面構造の変化および撥水性の低下が観察され、HypBは主に菌糸に局在して機能することが示された。*hypC*遺伝子の破壊では顕微的な変化は観察されなかった。リアルタイムRT-PCRによる*hyp*遺伝子の転写量解析から個々の遺伝子の発現時期および量に大きな違いがあることが示された。以上より*A. oryzae*の持つハイドロフォービンHypA,HypB,HypCがそれぞれ固有の機能を有していることが示唆された。

Hydrophobin, *Aspergillus oryzae*, marker recycling

講演番号：2B19a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ B校舎19会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の機能性ハイドロフォービンの調製と吸着

Construction and adsorption of functional hydrophobin of *Aspergillus oryzae*

○堂前圭佑、加瀬明日香、池田かすみ、大橋信太郎、中島春紫（明治大農・農化）
○Keisuke Domae, Asuka Kase, Kasumi Ikeda, Shintaro Ohashi, Harushi Nakajima (Dept. of Agricultural Chemistry , Meiji Univ.)

【目的】

ハイドロフォービンは糸状菌・担子菌の細胞表層に普遍的に存在する両親媒性の低分子量タンパク質である。単量体として細胞外に分泌された後、細胞表層に吸着し、疎水性領域を外側に向けて自己集合し、強固な単層を形成することにより、気中菌糸や胞子・分生子に撥水性を与えている。我々は、清酒・味噌・醤油の醸造に用いられ高いタンパク質生産能をもつ麹菌（*Aspergillus oryzae* ）からハイドロフォービンをコードすると考えられる遺伝子（*hypA*～*D* ）を単離し、そのうち HypA と HypB がそれぞれ分生子と気中菌糸の撥水性に関与していることを見出している。一方、ハイドロフォービンは疎水性基材の表面に強く吸着する性質を有し、基材表面をハイドロフォービンによりコーティングすることにより、基材の疎水性度が大きく変化することが報告されている。本研究では、麹菌を宿主として単量体のハイドロフォービンHypAおよびHypBを生産して親水性および疎水性の各種の基材への吸着性を検討するとともに、重金属吸着性などの機能性ペプチドを結合した機能性ハイドロフォービンを作製し、基材への吸着性と機能性の付与について検討を行なう。

【方法】

吸着性・自己集合性の強いハイドロフォービンの単量体を調製するため、麹菌を宿主として*enoA*プロモーター制御下で液体培養によりハイドロフォービンを生産し、疎水性クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。重金属吸着ペプチドをC末端に連結した機能性ハイドロフォービンを設計して同様に生産・精製し、各々の水溶液を各種基材上に滴下して乾燥することにより吸着させ、Western Blot法等により吸着性の検討を行なった。

【結果】

精製HypAは特に疎水性の基材表面に強く吸着することを確認し、さらにHypAが界面活性化効果を有することなども観察している。機能性ハイドロフォービンについても順次生産・精製を行っており、吸着性を始めとする挙動について検討を進めている。

Aspergillus oryzae ,Hydrophobin, adsorption

講演番号：2B19a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ B校舎19会場

タイトル　麹菌*A. oryzae*における細胞質型ホスホリパーゼA_2相同遺伝子*AoplaA*の機能解析
Title　Functional analysis of cytosolic phospholipase A_2-like gene *AoplaA* in *A. oryzae*

○駒井 紀之、小谷 昌平、北本 勝ひこ、有岡 学（東大院農生科・応生工）
○Noriyuki Komai, Shohei Kotani, Katsuhiko Kitamoto, Manabu Arioka (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

【目的】ホスホリパーゼA_2 (PLA_2) はグリセロリン脂質を加水分解し、脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素である。ホスホリパーゼA_2は大きく分けて細胞質型、分泌型、カルシウム非依存型の3種類に分類できる。このうち細胞質型PLA_2 (cytosolic PLA_2; $cPLA_2$) は、動物において受容体刺激に応じて小胞体やゴルジ体膜からアラキドン酸を遊離し、エイコサノイド類などの脂質メディエーターの産生に関与することが知られている。一方微生物では、酵母は$cPLA_2$様の配列を持たないが、糸状菌はそのゲノム中に1～2個の$cPLA_2$様の配列を持つ。我々は麹菌の持つ唯一の$cPLA_2$様タンパク質であるAoPlaAの生理機能解明を目指した研究を行ってきた。これまでの解析から、AoPlaAは予想外にもN末端にミトコンドリア局在化シグナルを持ち、ミトコンドリア外膜と内膜の間の膜間スペースに局在することが明らかとなり、動物$cPLA_2$とは異なる機能を有することが示唆されているが、その酵素学的性質や生理機能は不明である。本研究では*AoplaA*の詳細な機能解析を目的とした。
【方法】AoPlaAはその局在からミトコンドリアの脂質代謝に関与する可能性が考えられた。そこで*AoplaA*高発現株・破壊株とコントロール株について粗ミトコンドリア画分を調製し、そのリン脂質組成をMS/MS解析により比較した。また、ミトコンドリアの脂質代謝が変化することで生育に影響が出るのではないかと予想し、様々な培養条件において各株の生育比較を行った。その際、哺乳類の$cPLA_2$活性中心に相当する予想活性中心残基を変異させた*AoplaA*を高発現する株を作製し、同様に比較を行った。
【結果】*AoplaA*高発現株とコントロール株から調製した粗ミトコンドリア画分のリン脂質存在比を比較したところ、高発現株では36:3や36:4という鎖長の脂肪酸を持つホスファチジルエタノールアミン (PE) が減少しており、34:1や34:2の脂肪酸を持つPEが増加していた。また、各分子種の存在量を比較すると、*AoplaA*高発現株ではコントロールと比較して分子種によらずPEの存在量が減少していた。一方、*AoplaA*破壊株においては分子種によらずカルジオリピン量の増加が認められた。また生育比較では、*AoplaA*高発現株が15˚Cで弱い生育阻害を示すことを見出した。同様の生育比較を予想活性中心残基を変異させた*AoplaA*を高発現する株で行ったところ、2ヶ所ある予想活性中心残基のうちの一方を変異させた株については生育阻害が回復した。このことから、AoPlaAは活性を持ち、PE,CLの代謝に関与する酵素であると考えられた。現在、この株についても生育とリン脂質組成の変化にどのような相関が見られるか分析を行っている。

Aspergillus oryzae, phospholipase A_2, mitochondria

講演番号：2B19a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ B校舎19会場

麹菌 *A. oryzae* における選択的オートファジー関連遺伝子 *Aoatg11* の機能解析

Functional analysis of *Aoatg11* related to selective autophagy in *Aspergillus oryzae*

○田所 隆之、菊間 隆志、北本 勝ひこ （東大院・農生科・応生工）
○Takayuki Tadokoro, Takashi Kikuma, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

【目的】オートファジーは、細胞質成分を二重膜で囲い込むことによってオートファゴソームを形成し、リソソーム/液胞で分解する機構であり、真核生物に広く保存されている。飢餓に応答して起こる非選択的なオートファジーがよく研究されているが、近年、酵母において特定のタンパク質やオルガネラを特異的に認識し、液胞へ輸送する選択的オートファジーの存在が確認されている。酵母において、Ape1pなどの液胞加水分解酵素を輸送するCytoplasm to vacuole targeting (Cvt) 経路、ミトコンドリアを選択的に分解するmitophagy、ペルオキシソームを選択的に分解するpexophagyなどが選択的オートファジーとして知られている。しかし、*A. oryzae* など糸状菌では選択的オートファジーの存在は確認されていない。*S. cerevisiae*において、これまでに多くのオートファジー関連タンパク質が同定されており、その中で選択的オートファジー特異的に機能するタンパク質が見つかっている。Atg11pは、選択的に認識した基質のオートファゴソーム形成の場への輸送に機能することが報告されている。本研究では、*A. oryzae*における選択的オートファジーの存在を明らかにすることを目的とし、Atg11pのホモログであるAoAtg11の機能解析を行った。

【方法・結果】NSRKu70-1-1株の*Aoatg11*遺伝子に対し相同組換えを行うことで、破壊株を取得した。この破壊株を種々の培地で培養し観察したところ，野生株との生育の差は認められず、*A. oryzae*におけるオートファジー欠損株に特徴的な気中菌糸および分生子の形成阻害も示さなかった。これは、AoAtg11が非選択的オートファジーではなく、選択的オートファジー特異的に機能していることを示唆している。そこで、破壊株において選択的オートファジーの基質であるアミノペプチダーゼⅠ(AoApe1)やミトコンドリア、ペルオキシソームをEGFPで可視化した株を蛍光顕微鏡により観察し、液胞への取り込みを検討した。その結果、破壊株ではペルオキシソームの液胞への取り込みに遅れが生じることを見出した。また、AoAtg11の非選択的オートファジーへの影響を調べるため、*A. oryzae*においてオートファジーのマーカータンパク質であるAoAtg8のEGFP融合タンパク質を破壊株に発現させた。同様に蛍光顕微鏡で観察したところ、栄養飢餓条件下において野生株と同じように蛍光が液胞に蓄積した。これは、非選択的オートファジーが正常に機能していることを示している。以上の結果より、*A. oryzae*には選択的オートファジーが存在し、さらにAoAtg11は非選択的オートファジーではなく、pexophagyなどの選択的オートファジーに関与するタンパク質であることが示唆された。

Aspergillus oryzae, autophagy, AoAtg11

講演番号：2B19a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ B校舎19会場

グラム陰性天然ゴム分解菌*Methylibium* sp. NS21株の天然ゴム分解に関わる遺伝子の探索と解析
Isolation and Characterization of A Novel Gene Responsible for Rubber Degradation in Gram-Negative Rubber-Degrader, *Methylibium* sp. Strain NS21

○今井 俊輔、村松 由貴[1]、笠井 大輔、政井 英司、福田 雅夫（長岡技科大・生物、[1]NITE）
○Shunsuke Imai, Yuki Muramatsu[1], Daisuke Kasai, Eiji Masai, Masao Fukuda (Nagaoka Univ. Tech., [1]NITE)

【目的】主にpoly(*cis*-1,4-isoprene)から構成される天然ゴム (NR) は、地球温暖化ガス低減に直結する植物由来の地球に優しいポリマーとして注目されている。また近年の精製技術の向上によりNRの新規高機能ポリマー素材としての利用が期待されている。本研究では、NR製品の再資源化および高機能ポリマー生産への利用を目指し、新規NR分解菌の単離とNR分解酵素系の機能を明らかにすることを目的とした。
【方法】単離した分解菌のpoly(*cis*-1,4-isoprene)分解能は、Gel permeation chromatography分析によって評価した。トランスポゾンTn*5*の挿入によりNR寒天培地上でクリアーゾーン形成能が低下した変異株を分離し、PCRおよびコロニーハイブリダイゼーションによって変異が挿入された遺伝子を特定した。遺伝子破壊株は、相同組換えを利用した遺伝子置換法により遺伝子内部を欠落させることで作製した。また得られた破壊株の分解能はNR寒天培地上でのクリアーゾーン形成とアルデヒドの蓄積によって評価した。
【結果】各種土壌を用いたスクリーニングを行った結果、NR寒天培地にてクリアーゾーン形成能を示す新規NR分解菌*Methylibium* sp. NS21株を単離した。NS21株はNR分解菌としてこれまでに報告のないβ-プロテオバクテリウムに属する。シッフ試薬を用いてクリアーゾーンを染色した結果、NS21株はNRをアルデヒド末端を持つ分解産物へと変換することが示唆された。Tn*5*挿入変異株のTn*5*挿入部位を特定した結果、*Xanthomonas* sp. 35Y株のNR分解酵素遺伝子*roxA*の推定アミノ酸配列と36%の相同性を示すORF内部に挿入されていた。本遺伝子がNS21株のNR分解能に関与していると考え、*latA*と命名した。相同組換えにより作製した*latA*破壊株のNR分解能は、野生株の分解能と比較して顕著に低下したこと、破壊株に*latA*を含むプラスミドを導入することで分解能が回復したことから、*latA*はNS21株のNR分解に直接関与することが強く示唆された。現在、LatAの諸性質を明らかにするために、同種または異種宿主を用いた*latA*発現系の構築を行っている。

rubber degradation, *Methylibium*, poly(*cis*-1,4-isoprene)

講演番号：2B19a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ B校舎19会場

Pseudomonas stutzeri PTH10株における新規フタル酸代謝遺伝子の解析

Characterization of Novel Phthalate Catabolic Pathway Genes in *Pseudomonas stutzeri* PTH10

永井 一輝、○笠井 大輔、岩崎 卓巳[1]、西 達也[1]、政井 英司、福田 雅夫
（長岡技科大・生物、[1](株) ジナリス）
Kazuki Nagai, ○Daisuke Kasai, Takumi Iwasaki[1], Tatsunari Nishi[1], Eiji Masai, Masao Fukuda
(Nagaoka Univ. Tech., [1]Genaris, Inc.)

【目的】*Pseudomonas stutzeri* PTH10 株はフタル酸を唯一の炭素源、エネルギー源として生育する。現在までの解析により、PTH10 株はフタル酸を 2,3-ジヒドロキシ安息香酸（23DHB)へと変換し代謝する新規のフタル酸代謝経路を有することが示唆されている。本研究では、PTH10 株の新規フタル酸代謝経路の全容を明らかにすることを目的として、本株の 23DHB 代謝に関与する酵素遺伝子の同定と酵素の機能解析を行った。
【方法】酵素遺伝子は、*E. coli* BL21(DE3)株を宿主としてT7プロモーターの制御下で発現させた。PhtC活性は、23DHBのメタ開裂反応産物であると考えられる3-カルボキシ-2-ヒドロキシムコン酸-6-セミアルデヒド（3CHMS)に由来する338 nmの吸収の増大を分光光度計により測定するとともに、溶存酸素計を用いて酸素消費量を測定することで求めた。PhtD活性については、338 nmの吸収の減少を観察することで調べた。また相同組換えによる遺伝子置換法により各遺伝子の内部を欠失させた遺伝子破壊株を作製した。
【結果】芳香環開裂酵素遺伝子の推定アミノ酸配列の相同性を基に PTH10 株のゲノムデータベースを検索した結果、既知の Type I extradiol dioxygenase と約 30%の相同性を示す 1 つの ORF (*phtC*) を見出した。さらにその近傍には、amidohydrolase_2 family に属す加水分解酵素と相同性を示す ORF (*phtD*)の存在が認められた。*phtC* を発現させた大腸菌の細胞抽出液と 23DHB を反応させた結果、338 nm の吸収の増大ならびに溶存酸素の消費が観察されたことから、*phtC* が 23DHB のメタ開裂酵素をコードすることが示唆された。また、PhtC 反応液に *phtD* を発現させた大腸菌の細胞抽出液を添加した結果、338 nm の吸収の減少と 2-ヒドロキシムコン酸-6-セミアルデヒドに由来すると考えられる 374 nm の吸収の増大が認められた。この結果から、*phtD* は 23DHB メタ開裂産物の脱炭酸に関与する decarboxylase 遺伝子をコードすることが示唆された。さらに *phtC* および *phtD* の各遺伝子破壊株はフタル酸での生育能を完全に失ったことから、*phtC* および *phtD* は PTH10 株のフタル酸代謝に必須であることが明らかとなった。

phthalate, extradiol dioxygenase, *Pseudomonas*

講演番号：2B19a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ B校舎19会場

ferredoxin及びferredoxin reductaseをコードする*bphA3*及び*bphA4*の融合と融合酵素の機能解析

Construction and Characterization of Ferredoxin-Ferredoxin Reductase Fusion Gene

○福光 祐宜、笠井 大輔、政井 英司、古川 謙介[1]、福田 雅夫（長岡技科大・生物、[1]別府大・食養科）

○Yuki Fukumitsu, Daisuke Kasai, Eiji Masai, Kensuke Furukawa[1], Masao Fukuda (Nagaoka Univ. Tech., [1]Beppu Univ.)

【目的】 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) やその分解産物である1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene (DDE) は、生体に多くの被害をもたらすことが危惧されており、環境中に拡散したDDTやDDEの汚染浄化が望まれている。これまでに、ポリ塩化ビフェニル (PCB) 分解細菌*Rhodococcus jostii* RHA1のビフェニルジオキシゲナーゼ (BPHDO) がDDEの初発酸化にも関与することが示された。近年、ズッキーニなどのウリ科植物が地中の農薬を効果的に吸収・蓄積することが明らかにされたことから、BPHDO遺伝子 (*bphA*) を植物体で発現させることで効率的なDDE浄化系を確立できると期待された。BPHDOは、基質への酸素添加に関与するterminal dioxygenase成分と、terminal dioxygenase成分への電子伝達を行う鉄-硫黄クラスターをもつferredoxin成分及びferredoxin reductase成分から構成される。本研究では、*bphA*を導入した植物によるファイトレメディエーションの実現を目指し、植物体における*bphA*遺伝子の数を減らして安定性を高めるために、BPHDOの各成分をコードする遺伝子の融合と融合遺伝子がコードする酵素の機能解析を行った。

【方法】BPHDOのferredoxin及びferredoxin reductaseとして*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707株由来の*bphA3*及び*bphA4*を使用した。遺伝子の融合には66 bpのリンカー配列を付加し連結した。得られた融合遺伝子には5′末端にHisタグ配列を付加し、*E. coli* BL21(DE3)株を宿主として*cspA*プロモーターの制御下で発現させた。また生産した融合酵素はNiアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。得られた精製融合酵素の酵素活性は、cytochrome *c*還元活性による550 nmの吸光を測定することで評価した。

【結果】*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707株由来のferredoxin及びferredoxin reductaseをコードする*bphA3*及び*bphA4*を融合し、得られた融合遺伝子を*E. coli*で発現させた結果、予想されたサイズ (58.8 kDa) に近い60 kDaのタンパク質の生産が観察された。精製した融合酵素のcytochrome *c*還元活性を測定した結果、融合酵素では*bphA3*及び*bphA4*を独立して発現させた場合の約30倍高い活性が観察され、*bphA3*及び*bphA4*の融合遺伝子が機能的に発現することが明らかとなった。

fusion protein, electron transfer, biphenyl dioxygenase

講演番号：2B19a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ B校舎19会場

Rhodococcus jostii RHA1 株のスチレン代謝経路の解明

Characterization of Styrene Catabolic Pathway in *Rhodococcus jostii* RHA1

○古澤 裕樹、星 あゆみ、田中 良典、宮澤 大輔、下平 潤、笠井 大輔、政井 英司、福田 雅夫（長岡技科大・生物）

○Yuki Furusawa, Ayumi Hoshi, Ryosuke Tanaka, Daisuke Miyazawa, Jun Shimodaira, Daisuke Kasai, Eiji Masai, Masao Fukuda (Nagaoka Univ. Tech.)

【目的】高濃度のスチレンは、人の中枢神経系、血液系、肝臓への影響および遺伝毒性を示すことが指摘されており、微生物の酵素機能を利用した浄化に期待が寄せられる。ビフェニル (BPH) やエチルベンゼン (ETB) 等の様々な芳香族化合物を唯一の炭素源、エネルギー源として生育する *Rhodococcus jostii* RHA1 株は、それら化合物を *bph* および *etb* 遺伝子群がコードする複数のアイソザイムが関与する酵素系により代謝する。本研究では RHA1 株のスチレン浄化への利用を目指し、未だ解析されていない RHA1 株のスチレン代謝経路を明らかにすることを目的とした。

【方法】スチレンで生育した RHA1 株のプラスミドの有無はパルスフィールドゲル電気泳動により調査した。RHA1 株の各種遺伝子破壊株の作製は、相同組換えを利用した遺伝子置換法により行った。また *etbA* および *bphA* は、*Rhodococcus erythropolis* IAM1399 株を宿主として発現させ、各遺伝子を発現させた組換え体の休止菌体を用いてスチレン分解能を調査した。なおスチレン分解能は、GC-MS を用いて反応産物の生成を指標に評価した。マイクロアレイ解析にはスチレン存在下、非存在下で生育させた RHA1 株から調製した total RNA を用いた。

【結果】RHA1 株をスチレンで生育させた結果、本株が有する 3 つの線状プラスミドの内の 1 つ pRHL2 を欠落することが明らかとなった。さらに pRHL2 上に存在する ETB ジオキシゲナーゼ遺伝子 *etbAa1* および *etbAa2* の二重破壊株は、pRHL2 を欠失することなく pRHL2 欠失株と同等のスチレン生育能を示した。以上の結果から、*etbAa1* および *etbAa2* がスチレンでの生育に阻害的に作用する可能性が考えられた。その一方で、*etbA* と相同性を示す BPH ジオキシゲナーゼ遺伝子 *bphA* の破壊株はスチレンでの生育能を示さなかったことから、*bphA* は RHA1 株のスチレン代謝に必須であることが示唆された。

etbA および *bphA* を発現させた組換え体のスチレン分解能を調べた結果、*etbA* 発現株はスチレンを 1-フェニル-1,2-エタンジオール (PED) へと、*bphA* 発現株は PED と 3-ビニルカテコール (3VC) へと変換することが明らかとなった。以上の結果から、RHA1 株はスチレンを BphA が関与する反応により 3VC へと変換し代謝することが示唆された。さらにスチレンで生育した RHA1 株では、BPH 代謝に関与する芳香環開裂酵素遺伝子 *bphC1* および ETB の芳香環開裂産物の加水分解に関与する *etbD* の転写活性化が観察されたことから、RHA1 株は 3VC を *bphC1* および *etbD* が関与する芳香環開裂経路により代謝する可能性が考えられた。

styrene, *Rhodococcus*, dioxygenase

講演番号：2B19a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ B校舎19会場

Comamonas sp. E6株における新規芳香族カルボン酸トランスポーターの解析

A Novel Transport System for Aromatic Carboxylic Acids in *Comamonas* sp. Strain E6

保坂 大、○木下 雅喜、上村 直史、笠井 大輔、福田 雅夫、政井 英司（長岡技科大・生物）
Masaru Hosaka, ○Masaki Kinoshita, Naofumi Kamimura, Daisuke Kasai, Masao Fukuda, Eiji Masai (Nagaoka Univ. Tech.)

【目的】*Comamonas* sp. E6株は、テレフタル酸 (TPA)、イソフタル酸 (IPA)、フタル酸 (OPA)といったフタル酸類をプロトカテク酸 (PCA)へと分解し、PCA 4,5-開裂経路によって代謝する。我々はこれまでにTPAおよびIPA分解系遺伝子群 (*tph*と*iph*遺伝子群)の構造、機能、そして転写制御を明らかにしてきた。*tph*および*iph*遺伝子群にはクエン酸などの取り込みが報告されているTripartite Tricarboxylate Transporter (TTT) familyの基質結合レセプターと相同性を示す*tphC*および*iphC*がそれぞれ存在する。我々は既にTTT familyの小・大膜成分遺伝子とそれぞれ相同性を示す*tpiBA*を単離し、*tpiA*がTPAの取り込みに必須であることを明らかにした。本研究では、E6株のTPA取り込みに関する生化学的な知見を得るとともにTPA以外の芳香族カルボン酸の取り込みにおける*tpiBA*の関与について調べることを目的とした。
【方法】TPA存在下で培養したE6株の休止細胞と^{14}Cで標識したTPA ([^{14}C]TPA)を混合し、細胞内に取り込まれた[^{14}C]TPAの量を液体シンチレーションカウンターで測定し、TPA取り込み活性を調べた。TPA取り込みの至適pHは、pH 5.5からpH 9.5におけるTPA取り込み活性を測定することで求めた。プロトン濃度勾配を減少させるcarbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP)、ATPase活性を阻害するdicyclohexylcarbodiimide、K^+特異的なイオノフォアであり膜電位を減少させるバリノマイシンといった各種阻害剤またはNa^+存在下でのTPA取り込み活性を測定し、TPA取り込みにおけるエネルギー要求性およびNa^+の影響を調べた。*tpiB*破壊株を相同組換えによって作製し、本破壊株と*tpiA*破壊株のフタル酸類およびPCAでの生育能を調べた。
【結果】E6株におけるTPA取り込みの至適pHを調べた結果、pH 7.5であることが示された。TPA取り込みへの各種阻害剤およびNa^+の影響を調べた結果、プロトン濃度勾配を減少させるCCCP存在下においてのみTPA取り込み能の消失が観察された。またNa^+存在下においてTPA取り込みの促進は見られなかった。これらの結果から、TPAの取り込みはプロトン駆動力に依存することが強く示唆された。E6株の*tpiB*を破壊し、本破壊株と*tpiA*破壊株のフタル酸類およびPCAでの生育能を調べたところ、両破壊株はTPAだけでなくIPAでの生育能も欠損していた。さらにOPAとPCAでの生育が遅延することが示された。以上の結果から、*tpiA*と*tpiB* はE6株のTPAおよびIPAの取り込みに必須であり、OPAとPCAの取り込みにも部分的に関与することが示唆された。これらの結果は、E6株においてTpiAB膜タンパク質成分がTphCやIphCを含む複数の基質結合レセプターと相互作用することにより多様な基質の取り込みを行っていることを示唆するものと考えられた。

Comamonas, terephthalate, transporter

講演番号：2B19a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ B校舎19会場

Bacillus megaterium における光誘導性転写調節機構

Mechanism of light-induced transcriptional control in *Bacillus megaterium*

○萩原 健太、平田 直哉、高野 英晃、上田 賢志（日大生資科・生命セ）
○Kenta Hagiwara, Naoya Hirata, Hideaki Takano, Kenji Ueda (Nihon Univ.)

【目的】

B. megaterium は光照射条件下でカロテノイド(Crt)色素を生産する。我々はこれまでに、この*B. megaterium*におけるCrt生産が、*Streptomyces*や*Thermus*属細菌におけるのと同様に光応答性転写制御蛋白LitRによって制御されること、LitRはビタミンB_{12}(コバラミン)を光受容体とする新しいタイプの転写調節因子であること等を明らかにしてきた。本研究では、*B. megaterium*をモデルとしてLitRとDNAとの結合性やB_{12}との相互作用を解析し、その制御の詳細を解明することを目的とする。

【方法】

*B. megaterium*のLitR（$LitR_{Bm}$）を大腸菌を用いた組み換えタンパク質として精製し、ゲルシフト法やDNase Iフットプリント法等を用いてそのDNAへの結合性を*in vitro*で解析した。LitRタンパク質間の相互作用解析も行い、光照射に応じたその量体形成を測定した。さらに、B_{12}結合領域の部位特異的変異体を作製し、LitRにおけるB_{12}の結合性とそれに伴う機能の変化を観察した。

【結果】

$LitR_{Bm}$は自身のプロモーターとCrt合成遺伝子(*crtI*)のプロモーターに結合した。これは$LitR_{Bm}$が*crt*の転写を直接制御していることを示唆し、*B. megaterium*は*Streptomyces*や *Thermus*における特異的な転写因子を介した間接的な制御とは異なる制御体系を有しているものと推測された。

次に、$LitR_{Bm}$のタンパク質相互作用を解析した結果、それが明暗に関わらず２量体を形成していることが示された。最近、*Myxococcus xanthus*のLitRホモログであるCarHでは、光酸化によって還元型のB_{12}($AdoB_{12}$)が酸化型B_{12}(OHB_{12})に変化することによってコンフォメーション変化がおこり、その結果４量体形成が解除されるために転写の誘導が起こるというモデルが提唱されている（*PNAS* 108:7565-70 (2011)）。一方、今回の$LitR_{Bm}$に関する観察の結果は、その光受容に基づく転写誘発メカニズムが*M. xanthus*のそれとは異なっていることを示しており、上述の制御体系とともにLitRを介した光応答様式の多様性を示唆している。

Bacillus megaterium, LitR, Vitamin B_{12}

講演番号：2B19a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ B校舎19会場

放線菌*Streptomyces griseus*における銅イオンに依存した転写抑制機構

Mechanism of Cu^{2+}-dependent transcriptional repression in *Streptomyces griseus*.

○藤本 正浩、高野 英晃、上田 賢志（日大生資科・生命セ）
○Masahiro Fujimoto, Hideaki Takano, Kenji Ueda (Nihon Univ.)

【目的】Sco1/SenCファミリーの蛋白質は、末端酸化酵素であるシトクロム *c* 酸化酵素(COX)に銅イオンを運搬する。これまでに我々は、*S. griseus*のSco1/SenCホモログであるScoCがCOXだけではなく他の銅酵素の活性化にも重要な役割を担うことを明らかにした[(1)]。さらに、ScoCがコードされる*sco*オペロンの転写は、10 μMの銅イオンの添加によって抑制されることを発見した。これは、通常の寒天培地で生育する菌ではScoCが構成的に発現し、銅イオンの運搬体として積極的に機能するのに対して、10 μM程度の銅イオンが存在する場合には、運搬体の発現は不要であることを示唆している。銅による転写制御は、枯草菌の*ycn*オペロン[(2)]に関するもの以外に知見に乏しい。本研究では、放線菌における銅イオン依存性の転写抑制機構を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】銅イオン応答性に関わる転写調節因子を探索する目的でゲノム情報を検索した結果、膜蛋白質(*SGR6227*)とECFシグマ因子(*SGR6228*)をコードするオペロンのプロモーター中の配列が*sco*オペロンのそれと高い相同性を示すことを見いだした。同じ構造のオペロンは、放線菌に広く分布していた。本オペロンの転写は、*sco*オペロンと同様に培地に銅イオンを添加することによって抑制されたことから、コードされる2つの蛋白質が銅イオン応答性の転写調節機構に関わっていることが予想された。

そこで次に、*SGR6227*と*SGR6228*の破壊株を相同組み換えによって作製した。取得した両破壊株は、液体振盪培養における細胞の凝集性・沈降性ならびにフェノールオキシダーゼ活性の低下を示した。一方、COX活性は野生株と同等のレベルを示した。以前に我々は、*scoC*の破壊を行い、それによって細胞の凝集に関わるモノアミンオキシダーゼ、ラッカーゼ様フェノールオキシダーゼおよびCOXの活性が低下することを明らかにした[(1)]が、今回取得した２つの遺伝子の破壊株はCOX活性に影響しない点を除いて、それと類似の性質を示すことが判明した。

さらに、これらの破壊が銅イオン抑制性の転写に及ぼす影響を検証した結果、それらをコードするオペロンの転写量は低下していたが、*sco*オペロンの転写量は変化していないことが明らかになった。このことから、*SGR6227*と*SGR6228*の産物はそれらをコードするオペロンの転写を司るが、*sco*オペロンの転写には関与しないと考えられる。一方、プロモーター中に共通して見られる配列には未同定の転写抑制因子が共通して作用し銅依存的な転写調節を行っていることが予想される。また、SGR6227は、SGR6228の機能に対して正に作用することが考えられた。

【文献】(1) Fujimoto, M., *et al. Microb Biotechnol* (2011) in press
(2) Chillappagari, S., *et al. J Bacteriol* (2009) **191**:2362

Streptomyces, ECF sigma factor, copper ion

講演番号：2B19a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ B校舎19会場

放線菌*Streptomyces griseus*の気中菌糸形成に関わるアセチル基転移様酵素

An acetyltransferase-like protein involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*

○勝俣 直人、高野 英晃、上田 賢志（日大生資科・生命セ）
○Naoto Katsumata, Hideaki Takano, Kenji Ueda (Nihon Univ.)

【目的】22アミノ酸からなるAmfSは、放線菌*Streptomyces griseus*の気中菌糸形成に必要なランチビオティック様ペプチドである。前駆体のAmfSは修飾酵素AmfTによる脱水・環化されたのち、排出トランスポーターであるAmfABを介する分泌と未同定のプロテアーゼによる切断を経て活性型AmfSとなることが推測されている。これらのAmfS合成遺伝子群はクラスターを形成しており、A-ファクター制御カスケード中のグローバルレギュレーターであるAdpAによって直接転写誘導されることが判明している。*adpA*破壊株は気中菌糸形成能を欠損しているが、それはAmfSの細胞内強制発現や外部からの添加によって回復しない。このことは、AdpAに制御される遺伝子の中にAmfSによる気中菌糸形成の誘発に必須なものが存在することを示唆している。そこで本研究では、AmfSを介した気中菌糸形成に関与する遺伝子の同定を試みた。
【方法と結果】AmfS生産性を有する*adpA*遺伝子破壊株を作出し、それを宿主とする高コピープラスミド及び染色体断片を用いたランダムクローニングを実施した。その結果得られた約80,000の形質転換体の中に、気中菌糸の顕著な回復を示す形質転換体を49株取得した。その中の一つであるpNK12について挿入DNA断片の塩基配列を決定したところ、*SGR331-334*を含む領域が挿入されていることが判明した。この領域に含まれている各遺伝子破壊株を相同組み換えにより作製し、形態観察を行った結果、162アミノ酸からなるアセチル基転移酵素と予想される蛋白質をコードする*SGR333*破壊株に顕著な気中菌糸形成能の低下が認められた。*SGR333*破壊株のAmfS生産性は野生株と同程度であり、またAmfSの添加による気中菌糸回復は認められなかった。上記のpNK12による*adpA*遺伝子破壊株の分化回復は*SGR333*のみの導入では起こらなかったことから、AmfSと*SGR333*の共発現が必要であることが示唆された。以上の結果は、SGR333産物がAmfSによる気中菌糸形成の誘導に関与していることを強く示唆している。*S. griseus*のゲノム上にはアセチル基転移酵素と予想される99の遺伝子が存在し、それらには*SGR333*と全長にわたって相同性を示す11のパラログが含まれる。それにも関わらず*SGR333*のみの破壊で顕著な形態分化の低下が引き起こされたことは、その機能が他のアセチル基転移酵素では補完されない特異性の高いものであることを示唆している。SGR333産物に高い相同性を示す酵素の遺伝子は、広義の放線菌群にのみ分布することから、本酵素は放線菌の生理に特異的な機能と役割を担っているものと考えられる。アセチル基転移酵素は一次代謝、薬物代謝、脂肪酸合成などにおいて広く重要な働きを持つことが知られるが、バクテリアの形態分化への関与についての報告は少ない。本成果は、その一端を示す新しい知見である。

Streptomyces griseus, AmfS, acetyltransferase

講演番号：2B19p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ B校舎19会場

Corynebacterium glutamicum OdhI タンパク質の増殖と代謝における機能

Role of OdhI protein in growth arrest of *Corynebacterium glutamicum* cells

○竹内さほ，和地正明（東工大院生命理工・生物プロセス）
○Saho Takeuchi, and Masaaki Wachi (Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology)

【目的】*Corynebacterium glutamicum*は、ビオチン制限やペニシリンの添加、Tween40のような脂肪酸エステル界面活性剤の添加により、グルタミン酸生産が誘導される。このとき、菌体の増殖は停止する。本研究ではその増殖停止をもたらす因子の探索を目指した。ペニシリン処理によりグルタミン酸生産を誘導し、プロテオーム解析を行ったところ、発現が増加したタンパク質のうちの一つに2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体ODHCの阻害タンパク質OdhIが見い出された。OdhIタンパク質はリン酸化酵素PknGとホスファターゼPppによるリン酸化、脱リン酸化により制御されている。脱リン酸化型OdhIタンパク質はODHCのE1サブユニットOdhAに結合し、その活性を阻害する。一方、リン酸化型OdhIタンパク質はOdhAから解離し、阻害能を失う。

【実験方法および結果】*C. glutamicum* 野生株 ATCC31831 の染色体 DNA を鋳型として *odhI* 遺伝子を PCR により増幅し、*C. glutamicum* - *E. coli* シャトルベクターである pECt プラスミドの *trc* プロモーターの下流に挿入した。さらに伸長因子 Tu をコードする *tuf* 遺伝子のプロモーター領域を PCR で増幅し、*trc* プロモーター領域の上流に挿入することで発現の強化を行った。構築したプラスミドを野生株に導入したところ、IPTG 依存的な OdhI タンパク質の過剰発現が確認できた。しかしながら、増殖はほとんど影響されなかった。そこで OdhI のリン酸化状態をウエスタンブロッティングにより確認したところ、過剰発現させた OdhI のほとんどがリン酸化されていた。そこで OdhI のリン酸化部位である Thr14 を Ala に置換した変異タンパク質の過剰発現株の構築を行った。OdhI-T14A の過剰発現により、増殖の停止が見られた。その際、グルタミン酸とポルフィリンを生成していることが確認できた。またペニシリン誘導によるグルタミン酸生産条件下では、OdhI-T14A の過剰発現によりグルタミン酸の生産効率が上昇した。

これらのことから、増殖の停止には OdhI タンパク質の発現誘導のみならずそのリン酸化状態の制御も重要であることが明らかとなった。また OdhI タンパク質の発現はグルタミン酸生産においても重要な役割を果たすことが示唆された。

Corynebacterium glutamicum, ODHC, OdhI

講演番号:2B19p03
講演日時、会場:3月23日14:11～ B校舎19会場

*Corynebacterium glutamicum*のグルタミン酸排出に関与するNCgl1221遺伝子の機能解析

A role of the NCgl1221 mechanosensitive channel in L-glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*

○山下 周子、和地 正明（東工大院・生命理工・生物プロセス）
○Chikako Yamashita, Masaaki Wachi (Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology)

【目的】グルタミン酸生産菌である*Corynebacterium glutamicum*のグルタミン酸排出機構は未解明のままである。しかし近年、我々は大腸菌のメカノセンシティブチャネル(MscS)と相同性のあるNCgl1221遺伝子産物が排出に関与していることを見出した[1]。本研究では、NCgl1221がMscSに比べてC末側に長い機能未知のドメインを持つことから、このC末ドメインがグルタミン酸排出に関与しているか解析を行った。

【方法】まず、C末ドメインを様々な長さで欠失させたNCgl1221変異プラスミドを構築し、*C.glutamicum*の野生株、NCgl1221欠失株内で発現させ、グルタミン酸生産能の変化を調べた。さらに異種細菌のMscSが、NCgl121の機能を補うか調べるため、大腸菌と枯草菌のMscS発現プラスミドをそれぞれ構築し、*C.glutamicum*の野生株、NCgl1221欠失株で発現させ、グルタミン酸排出能の相補性を調べた。また、排出に重要なドメインの予測のため、大腸菌のMscSの結晶構造(PDB 2vv5D)を鋳型として、SWISS-MODELを用いてNCgl1221および枯草菌のMscSの3次元構造予測を行った。

【結果】NCgl1221を大腸菌のMscSと相同なN末ドメインまで欠失させた変異体は、NCgl1221欠失株のグルタミン酸生産能を回復させたことから、C末ドメインはグルタミン酸排出に必須ではないことが明らかとなった。C末の細胞外ドメインのみを欠失させた株では、グルタミン酸生産誘導なしに生産を行うようになった。このC末細胞外ドメインはグルタミン酸排出に抑制的な機能を持つことが示唆された。

大腸菌および枯草菌のMscSをNCgl1221欠失株で発現させてもグルタミン酸排出能の相補は確認されなかった。このことから、NCgl1221のN末ドメインには何らかの機能ドメインがあるのではないかと考え、３次元構造予測をおこなったところ、NCgl1221特異的なループ構造の存在が予想された。この予想されたループ構造部分を欠失させた株では生産能がなくなることから、この構造がグルタミン酸排出に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

【文献】[1]**Nakamura Jun, Seiko Hirano, Hisao Ito, Masaaki Wachi.** Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 Gene, Encoding a Mechanosensitive Channel Homolog, Induce L-Glutamic Acid Production. Appl Environ Microbiol., 2007,**73**:4491-8.

mechanosensitive channel, NCgl1221, *Corynebacterium glutamicum*

講演番号:2B19p04
講演日時、会場:3月23日14:22～ B校舎19会場

大腸菌のL-アラニン排出輸送体YgaWの膜貫通領域に存在する荷電アミノ酸の意義

Importance of charged amino acid residues in the transmembrane region of the L-alanine exporter YgaW in *Escherichia coli*

○ 金　世怜, 堀 初弘, 安藤 太助, 磯貝 恵美子, 米山 裕（東北大学院・農 ）
○ Seryoung Kim, Hatsuhiro Hori, Tasuke Ando, Emiko Isogai, Hiroshi Yoneyama (Tohoku Univ)

【目的】グルタミン酸を生産する土壌細菌が見いだされた当初より、多くの種類の細菌野生株がアラニン(Ala)を培地中に分泌することが知られていた。また、大腸菌の組換え株が著量のL-Alaを分泌生産することがその後報告され、本菌がL-Alaに特異性を有する排出輸送体をもつことが示唆されていた。我々はこの未知L-Ala排出輸送体を同定するために、ランダム変異により取得したL-Ala排出能欠損変異株を宿主としたショットガンクローニング法を用い、大腸菌のL-Ala排出輸送体遺伝子*ygaW*を取得することに成功した(AEM 77: 4027-4034, 2011)。*ygaW*遺伝子は149アミノ酸残基よりなるタンパク質をコードしており、その膜トポロジーを複数の解析ソフトウェアで予測した結果、いずれのアルゴリズムでもYgaWはN末端が細胞質に局在し４回膜貫通領域(TM)をもつことが示された。これらTM内には３個の荷電アミノ酸(Glu30、Arg45、Asp84)が存在しており、YgaWのL-Ala排出機能に重要な役割を担っていると考えられた。そこで、本研究では、これら３つの荷電アミノ酸をシステイン(Cys)に置換した変異型YgaWを作製し、その機能に及ぼす影響を評価することにした。
【方法】TM内に存在する個々の荷電アミノ酸Glu30 (TM1)、Arg45 (TM2)およびAsp84 (TM3)を部位特異変異法によりCysに置換した変異型YgaW (E30C、R45C、D84C)を作製し、各変異型*ygaW*遺伝子を染色体上の*ygaW*が欠損したD-/L-Ala要求変異株(ΔYgaW)に形質転換した。このΔYgaW株は培地中に添加したジペプチドAla-Alaに由来するL-Alaを細胞内に著量蓄積するためAla-Ala高感受性を示す。そこで、YgaWの機能に及ぼす各アミノ酸残基の置換変位の影響を評価するために、各形質転換体のAla-Alaに対する感受性を調べた(37°C、44時間培養)。
【結果】野生型*ygaW*遺伝子(pYgaW)を導入した形質転換体(ΔYgaW/pYgaW)はプラスミド上の*ygaW*遺伝子より発現したYgaWがL-Alaを排出するため、細胞内にL-Alaが蓄積せずAla-Alaに耐性を示す(MIC, >1,250 μg/ml)。一方、宿主であるΔYgaW株はAla-Alaに対し高感受性を示す(MIC, 10 μg/ml)。このΔYgaW株に各変異型*ygaW*遺伝子を導入した形質転換体(ΔYgaW/E30C、ΔYgaW/R45C、ΔYgaW/D84C)のAla-Alaに対する感受性を評価した結果、ΔYgaW/R45CのMICはΔYgaW株とほぼ同じMIC値(5-10 μg/ml)であり完全に活性を失っていた。一方、ΔYgaW/E30CとΔYgaW/D84CのMICは野生型*ygaW*遺伝子を導入したΔYgaW/pYgaWと同じであり(>1,250 μg/ml)、これらの変異型YgaWは活性を保持していることが明らかとなった。しかし、Ala-Ala存在下での24時間培養後のΔYgaW/E30CとΔYgaW/D84Cの生育は、野生型YgaWを発現するΔYgaW/pYgaWに比べ低下していたことから、これらの変異型YgaW(E30C、D84C)のL-Ala排出活性は低下しているものと考えられた。また、変異型YgaW (R45C)の活性が消失した原因については、Arg45が活性必須残基であるのか、あるいは、この変異によってYgaWの立体構造が大きく崩れて活性を失ったのか今後の検討課題である。

alanine exporter, charged amino acid, *Escherichia coli*

講演番号：2B19p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ B校舎19会場

マルチサブユニット型Mrpアンチポーターの精製と好熱性細菌由来Mrpホモログの機能解析

Characterization and purification of the multi subunit type Na^+/H^+ antiporter from thermopiles.

○伊藤　政博[1,2]、守野　正人[1]、鈴木　俊治[3]（[1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・バイオナノ、[3]JST・ICORP・ATP）

○Masahiro Ito[1,2]、Masato Morino[1]、Toshiharu Suzuki[3]（[1]Graduate School of Life Sciences and [2]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University、[3]JST・ICORP・ATP）

【目的】Mrp(Multi resistance and pH adaptation)アンチポーターは、Na^+/H^+アンチポーターとして機能し、好アルカリ性細菌のアルカリ環境適応に不可欠なタンパク質である。多くのNa^+/H^+アンチポーターが単量体もしくはホモ二量体として機能するのに対し、Mrpアンチポーターは6つから7つの膜タンパク質からなる巨大なタンパク質複合体として機能することがこれまでに明らかとなっている。しかし、その複合体構造やイオン輸送経路において不明な点が多く、活性を保持したMrp複合体の精製例もこれまでに報告されていない。そこで本研究では、Mrpアンチポーターの詳細な構造解析のために好アルカリ性細菌*Bacillus pseudofirmus* OF4と好熱性細菌由来*Anoxybacillus flavithermus* WK1株のMrpアンチポーター(Bp-Mrp、Af-Mrp)の精製方法の確立を試みた。

【方法】これまでに活性測定が行われていなかったAf-Mrpに関しては、まず大腸菌KNabc株において発現させることで機能解析を行った。大腸菌KNabc株は、主要なNa^+/H^+アンチポーターを欠損しているためにナトリウムに対して感受性を示す。

大腸菌で発現させたBp-MrpとAf-Mrpは、膜画分から可溶化後、TALONレジン(Clontech)により精製した。Na^+/H^+アンチポート活性を確認するため、精製した試料は人工脂質膜へ再構成した。また、再構成膜でMrpアンチポーター活性化に不可欠なプロトン駆動力を構築するために、*Bacillus* sp. PS3由来F_oF_1-ATPaseをMrp精製試料と共に混合した。

【結果】Af-Mrpの機能解析の結果、Af-Mrpはアルカリ環境で非常に高いNa^+/H^+アンチポート活性を保持していることが明らかとなり、精製検討に使用した。再構成膜において、Bp-MrpとAf-MrpのNa^+/H^+アンチポート活性が検出できたため、活性を保持したMrpアンチポーターが精製されていると考えられる。Mrpアンチポーターの精製手法は、本研究により初めて確立することができた。今後、さらなる条件検討によってMrp複合体の構造解析などに応用できることが期待される。

Alkaliphiles, Na^+/H^+ antiporter, protein purification

講演番号：2B19p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ B校舎19会場

ビフェニル資化性ゲノミックアイランド（ICE*bph*)の標的部位と選択性

Target site selection of biphenyl degradative genomic island(ICE*bph*)

○ 木村 訓清、前田 理久 (明治大農・農化)
○ Norikiyo Kimura, Michihisa Maeda (Meiji Univ.)

バクテリアのゲノム進化による多様性や環境適応は、遺伝子の水平伝達が主な要因である。水平伝達に関わるDNAエレメントには、プラスミド、トランスポゾン、ゲノミックアイランド(特に移動性を示すICE)などの可動性エレメントがある。中でもICEは、自己伝達能をもつ大きなDNAセグメントであるため、その移動によってバクテリアは急速なゲノム改変および進化を引き起こす。ICE*bph*は、PCB/ビフェニル分解遺伝子群をもつ53 kbのDNAエレメントであり、PCB分解菌*Alcaligenes denitrificans* A41 株内で保持されている。切り出し−接合伝達−組込みの三段階を通して受容株へと水平伝達され、ビフェニルによって促進される。これまでにそれ自身同士に加え、*Pseudomonas putida* KT2440 株にも水平伝達され、組込み標的部位はTTTTTCATであることが示されている。また、同一ゲノム中に複数コピーのICE*bph*を保持できるという顕著な特徴を持っている。

われわれは中でも複数コピーのICE*bph*の組込みに着目し、ICE*bph*の組込みに関わる標的部位およびその選択性について解析を行っている。独立した接合伝達実験から獲得したICEを1～5コピー保持する接合株について、サザンブロッティングによって検出されたバンドパターンからICE*bph*の組込み傾向を解析した。その結果、ICE*bph*が組込まれる傾向が高いと考えられる5 箇所の標的部位が見出された。また、5 箇所の標的部位を含む領域には、遺伝子がコードされていないまたは仮想タンパク質をコードしているという特徴がみられた。

Alcaligenes denitrificans A41, ICE*bph*, multiple integration,

講演番号：2B19p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ B校舎19会場

線状プラスミドSAP1 を用いた遺伝子クラスター輸送システムの構築

松田卓也[1],○藤森友真[2],池田治生[3],片岡正和[1]
([1] 信州大学大学院工学系研究科、[2] 信州大学工学部、[3] 北里大学生命科学研究所)
Takuya Matsuda[1], ○Yuma Fujimori[2], Haruo Ikeda[3], Masakazu Kataoka[1]
([1]Grad. Sc. Eng. Shinshu Univ., [2]Fac. Eng. Shinshu Univ., [3]Inst. Life Sci. Kitasato Univ.)

【目的】放線菌は、市場の約８割の抗生物質を産出しているなど、多種多様な２次代謝産物を生産しそれらを工業規模で生産する代謝能を持つことが知られている。生物工学分野では、ゲノムマイニングによって二次代謝系を設計する、いわゆる生合成マシナリー構築が今後主流になってくると思われる。放線菌は、高い代謝のロバスト性や生産性から生合成マシナリーの宿主として有望な細菌であるが、大腸菌や枯草菌のようにゲノムデザイン手法が確立されつつあるわけではなく、生合成遺伝子クラスターと言った大型のDNAを導入するのは一般的に困難である。
本研究では接合伝達性線状プラスミドSAP1を用いた大型遺伝子クラスターの導入、種間伝達システムの構築を目指している。
【概要・方法】放線菌の環状プラスミドはベクター化されているが、扱えるDNAの大きさと宿主内での安定性に難がある。二次代謝産物を生産する遺伝子クラスターは20~100kbp程度で、このような長大なDNAを環状プラスミドに持たせて放線菌で安定保持することは困難である。一方線状プラスミドは、大きさが10kbp程度から2Mbp程度までと多岐にわたり(1)、染色体と同様の線状構造と、複製起点からθ形状を介し、ローリングサークル型の複製形態をもつ環状プラスミド(2)よりも高い構造上の安定性を期待できる。本研究では大腸菌で調整した遺伝子クラスターをRP4traシステムで宿主レンジを広げた大腸菌－放線菌間接合(3)で制限修飾系の緩い*Streptomyces lividans*に導入後、actinophageの*att-int*システムにより開発したSAP1ベクター上へ展開する系を構築し、そこからSAP1の接合伝達システムで*S. avermitilis*へ導入する。
【結果】宿主菌開発として宿主菌の染色体への*att-int*系での組み込みを防止するため、部位特異的組み換えを利用して*S. lividans*染色体上の*attB*配列を除去した*S. lividans* (*attB-*)を構築し、SAP1 (*attB+*)を導入した。大腸菌内で調整したDNAを*S.lividans* (*attB-*)の保有するSAP1(*attB+*)へ組み込み、そのSAP1上に展開した遺伝子クラスターを放線菌間の接合伝達により*S. avermitilis*へ導入可能であることを確認した。
【参考文献】
1) Hopwood, DA., Annu Rev Genet., 2006, 40, 1-23.
2) Kataoka, M.et al., Mol Gen Genet., 1994 , 242, (2), 30-36.
3) Mazodier et al., J.Bacteriol 1989

Streptomyces, conjugation, linear plasmid

講演番号：2B19p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ B校舎19会場

*Aspergillus nidulans*のガラクトフラナン生合成に関与する遺伝子の機能解析

Functional analyses of a new glycosyltransferase gene involved in galactofuranan in *Aspergills nidulans*

○岡拓二、元松遥、畠山信太郎、浴野圭輔、二神泰基[1]、後藤正利[1]、竹川薫[1]、野村善幸（崇城大・生物生命・応微工、[1]九大院・農院）
○Takuji Oka, Haruka Motomatsu, Shintaro Hatakeyama, Keisuke Ekino, Taiki Futagami[1], Masatoshi Goto[1], Kaoru Takegawa[1], Yoshiyuki Nomura Hanako (Sojo Univ., [1]Kyushu Univ.)

【目的】*Aspergillus*属の細胞壁構成糖鎖には、β-グルカン、α-グルカン、キチン、ガラクトマンナンなどが含まれることが知られている。ガラクトマンナンは、α1,2-マンナンにβ1,5-ガラクトフラナンがβ1,6結合した多糖類である。しかし、これら細胞壁構成糖鎖のうちガラクトフラナンの生合成に関する遺伝子の知見は乏しい。そこで本報では、ガラクトフラナンの生合成に関与する遺伝子を同定することを目的とした。
【方法および結果】生物情報から 17 個のガラクトフラナン合成に関与すると推定される遺伝子を選抜し、それぞれ遺伝子破壊株を作製した。コロニーの表現型を観察したところ、１つの株が顕著な細胞壁欠損表現型を示した。また、β1,5-テトラガラクトフラナンを認識するモノクローナル抗体として知られる EB-A2 を用いて、各遺伝子破壊株から抽出したマンノプロテインに対してウェスタンブロット解析を行ったところ細胞壁欠損表現型を示した遺伝子破壊株でシグナルが欠失していた。また、本遺伝子破壊株の細胞壁中のガラクトース量を定量したところ、親株に比べて 60%にまで減少していた。よって、本遺伝子がガラクトフラナンの生合成に関与していると考え *gfsA*(galactofuranan synthase A)と名付けた。

染色体上の *gfsA* 遺伝子の 3’末端側にクロモソーマルタギング法を用いて 3xFLAG 配列を挿入し、発現した GfsA-3xFLAG を抗-FLAG 抗体によって検出したところ約 65 kDa の位置に単一シグナルを確認できた。また、Endo H*f* によって消化したところ、GfsA-3xFLAG のシグナルは、約 60 kDa に移動した。これらのことから、GfsA がタンパク質として確かに発現しており、*N*-型糖鎖修飾を受けていることが示された。さらに、GfsA-3xFLAG を精製し、*in vitro* において UDP-ガラクトフラノースと共に反応させたところ、EB-A2 によるシグナル強度の増加が認められたことから、GfsA-3xFLAG が確かにβ1,5-テトラガラクトフラナンの生合成に関わっていることが明らかになった。

また、*ΔgfsA* 株では親株に比べて菌糸の成長速度が 66%に減少し、分生子形成数が 11%に減少していた。さらに、薬剤耐性試験の結果、*ΔgfsA* 株は 0.002%の SDS に感受性を示し、100 μg/ml のカルコフルオロホワイトに、耐性を示すことが明らかになった。以上のことから、GfsA タンパク質がβ1,5-ガラクトフラナンの生合成に関わっており、糸状菌の正常な菌糸及び、分生子の形成に必要であることが明らかになった。

Aspergillus nidulans, glycosyltransferase, cell wall

講演番号：2B19p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ B校舎19会場

アスペルギルス症原因菌*Aspergillus fumigatus*におけるレクチン様タンパク質の機能解析

Functional analysis of the lectins in *Aspergillus fumigatus*

○酒井　香奈江、大荒田　素子、三浦　あゆみ、五ノ井　透（千葉大・真菌セ）
○Kanae Sakai, Motoko Oarada, Ayumi Miura, Thoru Gonoi (Chibadai・MMRC)

【目的】アスペルギルス症はアスペルギルス属菌によって引き起こされる種々の疾病の総称である。この疾患は免疫機能の低下した患者に起こりやすい日和見感染症であり、治療が遅れた場合の致死率が70～90％と高いことが問題になっている。HIV患者や臓器移植患者の増加などによりアスペルギルス症の発症率が増加傾向にある中、治療に用いている抗生物質への耐性菌の出現が報告されていることから、新たな作用機構をもつ治療薬の開発が求められている。そのためにも病気・感染のメカニズムについての知見を得ることが大切となってくる。これまでに細胞壁合成やマイコトキシン産生などいくつかの病原因子が報告されており、宿主側・菌側の様々な要因が複合して疾病を引き起こしていることが分かってきた。本研究では菌側の更なる要因を探るべくアスペルギルス症の主な原因菌である*A. fumigatus*を研究対象とし、糖鎖に結合する能力を持つタンパク質であるレクチンについての機能解析を行うことにした。病原性との関わりにおいて、レクチンは特に宿主側が菌体表面の糖鎖を認識することで免疫反応を引き起こすことが報告されており、研究が進んでいる。一方で真菌側のレクチンについては病原性との関わりについての研究はほとんどなされていない。そこで、*A. fumigatus*レクチンと病原性との関連を見出すことで、新たな病気のメカニズムについての知見を得ることを目的としている。

【方法及び結果】*A. fumigatus*の遺伝子配列から見つけたレクチン遺伝子と思われるもののうち、6つの遺伝子についてそれぞれ破壊株を作製した。作製した破壊株の病原性は、免疫抑制を行ったマウスの尾静脈から*A. fumigatus*の分生子を投与しマウスの生存率を比較することで確認した。その結果、マウス生存率を顕著に下げた破壊株が見つかったことから、この株についてさらに解析を進めていくことにした。相補株を作製したところ、マウスの生存率が野生型株と同程度まで回復することが確認された。さらに、感染マウスの臓器切片を観察したところ野生型では腎臓に菌の定着が見られたのに対し、破壊株では腎臓への菌の定着は見られなかった。しかし肝臓においては逆で、破壊株の定着が見られ、野生型株の定着は見られなかった。遺伝子破壊によってマウス生体内における菌の挙動が変化し、病原性も変化したものと考えられる。現在は菌のマウス生体内における挙動が変化した理由を探ると共に、破壊した遺伝子の*A. fumigatus*内での機能解析を進めているところである。

Aspergillus fumigatus, lectin, virulence

講演番号：2B19p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ B校舎19会場

イネいもち病菌の発芽管発現遺伝子ライブラリークローン B51 の機能解析

Functional analyssis of germ tube expressing cDNA library of *Magnaporthe oryzae*

○天野香奈子、佐々木健悟、小泉優希、各務佑哉、清田司、鎌倉高志(東理大院理工・応生科)
○Kanako Amano, Kengo Sasaki, Yuki Koizumi, Yuya Kakumu, Tsukasa Seida, Takashi Kamakura

【目的】イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* はイネに対して、最も深刻な被害を与える病害を引き起こす植物病原糸状菌である。イネいもち病菌によるイネへの感染は粘着状の物質である STM（spore tip mucilage）を分泌して植物表面に分生子を接着させることにより始まる。そして接着した分生子の先端から発芽管と呼ばれる特徴的な菌糸を成長させる。その後、発芽管の先端に付着器と呼ばれる器官を分化する。付着器の内部には高濃度のグリセロールが蓄積され、その流出を細胞膜と細胞壁の間隙に形成されるメラニン層が抑える。その結果生じる約 8 M Pa の膨圧を利用して侵入糸が物理的に植物内部に侵入する。植物内部に侵入後は、侵入菌糸を隣接細胞や細胞間隙に伸展させる。その結果、イネいもち病を引き起こし、感染したイネの葉には病斑がされるようになる。通常の感染の過程において、この付着器形成は必須の過程であるため、付着器形成時に発現している遺伝子の中には病原性に関与している可能性が高い遺伝子が含まれていると考えられる。

【方法・結果】発芽から付着器へ分化する感染過程において発現している遺伝子の中から、イネいもち病菌の病原性に関与するものを見出すために、当研究室で発芽管伸長時発現遺伝子ライブラリーを作成した。この遺伝子ライブラリーの中からリン酸化依存タンパク質 - タンパク質相互作用ドメインであるFHAドメイン(Forkhead associated domain)をもつと推定されるクローンB51を選択して、機能解析を行った。このドメインは多くの細胞内情報伝達関連タンパク質に存在しており、多岐に渡るシグナル伝達経路で重要な機能を果たしている。また、細胞周期チェックポイントやDNA損傷応答、転写制御などにも関与しているとされている。B51遺伝子破壊体を作成したところ、野生株と比べ、生育遅延、および発芽率、付着器形成率の低下がみられた。また、分生子の核壁、核を染色すると、核数、核壁数の異常が観察された。そこで、B51が細胞周期のチェックポイントに関与していると考え、ヒドロキシウレア(HU)、メチルメタンスルホン酸(MMS)、ベノミルといったDNA損傷を与える薬剤を投与し、その影響を調べたところ、野生株と比べて生育や付着器形成率に顕著な差が見られた。現在さらに、酵母Two-Hybrid法を用いて、B51と相互作用するタンパク質の探索することにより、本タンパク質の機能の解析を進めている。

phytopathogenic fungi, FHA domain, cell cycle

講演番号:2B19p11
講演日時、会場:3月23日15:49～ B校舎19会場

イネいもち病菌の非病原性遺伝子*AVR-Pia*の変異機構の解明

Homologous recombination caused a spontaneous deletion of *AVR-Pia* in *Magnaporthe oryzae*

竹内紗央里，佐藤佑樹，三木慎介，大塚圭輔，○曾根輝雄　（北大院農・応生科）
Saori Takeuchi, Yuki Sato, Shinsuke Miki, Keisuke Ohtsuka, and ○Teruo Sone (Grad, Sch. Agr. Hokkaido University)

【目的】*AVR-Pia*はいもち病菌が持つ,イネ品種愛知旭の抵抗性遺伝子*Pia*に対応する非病原性遺伝子である．Ina168株の同一染色体上に3コピー保存されているが，宿主特異性変異株Ina168m95-1株は全ての*AVR-Pia*遺伝子を欠損している．本研究ではその変異機構を解析した．
【方法と結果】Ina168株由来の*AVR-Pia*領域を含むコスミドクローンの塩基配列情報を基に，Ina168m95-1株との違いを調べた．その結果，Ina168m95-1株では，DNA型トランスポゾン*Occan*の5’末端側近接領域においてIna168株と100%の相同性を保持していたが,一方3コピーの*AVR-Pia*を含む3’末端側近接領域を大きく欠損していることが分かった．続いて，Ina168m95-1株のDNAを用い，5’末端側近接領域内においてinverse PCRを行い，*AVR-Pia*欠損に関わった両端を含む領域のクローニングを行った．その領域の塩基配列を解析したところ，*Occan*全長が含まれており,また*Occan*の3’末端側近接領域はIna168株のDNAにも保存されていた.以上により,2つの*Occan*の間で相同組み換えが起こり，その間に存在する3つの*AVR-Pia*が欠失した，と示唆された．

Keyword1, Keyword2, Keyword3

講演番号：2B19p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ B校舎19会場

分裂酵母の新規接合型の人為的創出と試験管内生殖隔離の証明

Genetic proof of reproductive isolation in a test tube

○清家 泰介、中村 太郎、下田 親（阪市大院理・生物地球）
○Taisuke Seike, Taro Nakamura, Chikashi Shimoda (Osaka City Univ.)

我々は分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe* を用いて生殖隔離を試験管内で実現することを試みている。分裂酵母には2つの接合型（P型、M型）があり、接合には接合フェロモンと受容体の分子認識が重要である。そこでM型細胞から分泌されるフェロモン（9アミノ酸）の網羅的ミスセンス変異体を152種類作製し、接合能を欠いた35の変異体を単離した。次に、フェロモン受容体にランダムに変異を導入し、フェロモン変異体の接合能欠損を回復させるサプレッサーを探索した。その結果、野生型とは交配できず、変異体同士でのみ交配可能な新規の接合型ペアが単離できた。これらの変異型株および野生型株に遺伝的マーカーを持たせ、組み換え体が生じないことを確かめることにより、生殖隔離を遺伝学的に証明することを試みている。また、*S. pombe* と最も近縁種の*S. octosporus* のフェロモン（同じく9アミノ酸からなるが、3アミノ酸残基が*S. pombe*のものと異なる）が*S. pombe* で機能しなかったことから、この両者間でも同じシナリオで生殖隔離が生じた可能性が示唆される。

reproduction isolation, mating, pheromone

講演番号：2B19p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ B校舎19会場

分裂酵母ヒストンシャペロンAsf1とSim3の機能的関連性

Functional relationship between fission yeast histone chaperone Asf1 and Sim3

○田苗　勝裕、堀内　富貴、山川　卓也、小村　将人、川向　誠
（島根大・生物資源・生命工）
○Katsuhiro Tanae, Tomitaka Horiuchi, Takuya Yamakawa, Masato Omura, Makoto Kawamukai
(Univ.Shimane, Fac.Life and Env.Sci)

真核生物のゲノムは、クロマチン構造よりなる。クロマチン構造は、4 種類のヒストンタンパク質（H2A, H2B, H3, H4）よりなるコアヒストン八量体に DNA が巻きついたヌクレオソームを基本単位として構成されている。クロマチンは、DNA 複製、転写、修復、組み換えといった DNA 上の反応に応じて柔軟にその構造を変える。ヒストンシャペロンは、このようなクロマチンの構造変換に関わる因子の一つであり、ヒストンに結合し主にそのクロマチンへの組み込み及び取り外しを担っている。対応するヒストンタンパク質の種類に応じて多様なヒストンシャペロンが存在している。Asf1 は、ヒストン H3/H4 のヒストンシャペロンの一つであり DNA 複製依存的なクロマチン構造変換と DNA 複製非依存的なクロマチン構造変換の両方の経路に関わっている。

分裂酵母 Asf1 の役割を解明するため、我々は、*asf1* 遺伝子の温度感受性変異株である *asf1-33* 変異株を構築した。これまでの研究により、*asf1-33* 変異株ではクロマチンの構造異常が生じており、さらに DNA 二重鎖切断と DNA 損傷チェックポイント因子である Chk1 のリン酸化が起きていることを明らかにした。これらの結果から、*asf1* が分裂酵母においてゲノム安定性の維持に必須であることが結論付けられた。

分裂酵母における*asf1*の役割をさらに解明するため、*asf1-33*変異株の表現型を抑圧する多コピー抑圧因子のスクリーニングを行った。その結果、*asf1*そのものに加え*sim3*を単離した。Sim3は、分裂酵母においてCENP-Aをセントロメア領域に組み込むヒストンシャペロンとして機能していることが報告されている。*sim3*は、*asf1-33*変異株の36℃での温度感受性の表現型をほぼ完全に抑圧した。さらに、*sim3*を過剰発現させることにより*asf1-33*変異株で観察されるクロマチンの構造異常やDNA損傷の発生が抑圧された。これらのことより、*asf1*と*sim3*とがヒストンシャペロンとして共通の役割を有することが示唆された。これまでに、ヒストンシャペロンAsf1とセントロメアクロマチン構築因子との直接的な関係性は報告されておらず、Asf1とセントロメア構築との関係性を考える上で興味深い結果である。

Fission yeast, Histone chaperone, Chromatin

講演番号:2B19p14
講演日時、会場:3月23日16:32～ B校舎19会場

野生産膜性酵母が有する*FLO11*遺伝子の解析と利用

Analysis and application of the *FLO11* genes of the wild pellicle-forming yeast

○中川 洋史、石合 美夕貴、戸田 康裕[1]、山村 英樹、早川 正幸、飯村 穣（山梨大院・医工総合・生命、[1]山梨大・工・生命工）

○Youji Nakagawa, Miyuki Ishiai, Yasuhiro Toda[1], Hideki Yamamura, Masayuki Hayakawa, Yuzuru Iimura (Dept. Biotech., Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi, [1]Dept. Biotech., Univ. Yamanashi)

【目的】出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*の産膜性株は、アルコール発酵後のワインの表面に酵母細胞から成る皮膜を形成する。産膜性株は液体培地の表面で増殖できるため、非産膜性株に比べ酸素の利用が容易であり、エネルギー効率やストレス耐性等、様々な面で優れた特性を有することが期待できる。演者らは既に、野生産膜性酵母の産膜に、細胞表層の糖タンパク質をコードする*FLO11*遺伝子が必須であることを明らかにしている(1)。そこで本研究では、様々な非産膜性酵母に自在に産膜能を付与できる方法を開発することを目的として、強い産膜能を示す野生産膜性酵母株が有する*FLO11*の解析と利用を行った。

【方法及び結果】強い産膜能を示す*S. cerevisiae*の野生産膜性株であるYFY-1株の*FLO11*をPCRにより増幅したところ、長さの異なる２種類の*FLO11*（*FLO11L*、*FLO11S*）を有することが判明した。それぞれの遺伝子の産膜への関与の度合いを調べるために、*FLO11L*の破壊株（*Δflo11L*株）と*FLO11S*の破壊株（*Δflo11S*株）をそれぞれ構築し、産膜能を比較した。その結果、*Δflo11L*株のほうが弱い産膜能を示したことから、YFY-1株の強い産膜能に、*FLO11L*が主要な役割を果たしていることが明らかになった。*FLO11L*と*FLO11S*のプロモーター領域の塩基配列はほぼ同一であり、リアルタイムRT-PCRの結果、*FLO11L*と*FLO11S*のmRNA発現量にも顕著な違いは見られなかったことから、*FLO11L*と*FLO11S*の産膜への関与の違いは、ORF領域の違いによることが示唆された。そこで、*TDH3*プロモーターと*FLO11L*および*FLO11S*のORF領域との融合遺伝子を、薬剤耐性マーカーを有する単コピー型ベクターにそれぞれ組み込んだプラスミドYCp+TDH3p-FLO11Lおよび YCp+TDH3p-FLO11Sを構築した。構築したプラスミドを非産膜性のワイン醸造用実用酵母であるOC-2株に導入したところ、YCp+TDH3p-FLO11Lが導入された形質転換体は、強い産膜能を示した。以上の結果より、強い産膜能を有するYFY-1株の*FLO11L*を利用することで、非産膜性の酵母に強い産膜能を付与できることが明らかになった。

(1) Y. Nakagawa et al., J. Biosci. Bioeng., 111(1), 7-9, 2011

pellicle formation, wild yeast, *FLO11*

講演番号：2B19p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ B校舎19会場

*Zygosaccharomyces rouxii*の*MAT*遺伝子座近傍における染色体構造の変化

Chromosomal rearrangements involving the *MAT* locus in *Zygosaccharomyces rouxii*

○渡部　潤、上原　健二、茂木　喜信（ヤマサ醤油・醤油研）
○Jun Watanabe, Kenji Uehara, Yoshinobu Mogi (YAMASA)

【目的】醤油醸造において、醤油酵母*Z. rouxii*はアルコールや香気成分の生成を担っており、麹菌・乳酸菌と共に欠かす事のできない重要な微生物である。近年、*Z. rouxii*には3つの異なったタイプの株（ゲノムシーケンスされたCBS732タイプの株、*Z. pseudorouxii*とも呼ばれるNCYC3042タイプの株、そしてこの2タイプの株が交雑したATCC42981タイプの株）が存在することが示されており[(1)]、醤油から分離される*Z. rouxii*の大部分は3番目のタイプである。今回、*Z. rouxii*の交雑育種を推進するための基礎的な情報を取得する目的で、CBS732タイプの1倍体株の*MAT*遺伝子座の解析を実施した。

【方法】NBRCから購入した*Z. rouxii*の中からCBS732タイプの1倍体株を選択するために、T-subgenome（CBS732タイプ由来）とP-subgenome（NCYC3042タイプ由来）にコードされた*ADE2*遺伝子特異的なプライマーを用いたPCR解析を実施した。また、ゲノムシーケンスされたCBS732の*MAT*, *HMR*及び*HML*遺伝子座の両端に設計した特異的なプライマーセット(それぞれ1-A, 2-B及び3-C)を用いたPCR解析を実施し、株間における同遺伝子座の構造的な差を検討した。さらにパルスフィールド電気泳動を用いた核型解析とサザンブロット解析により、染色体構造の変化を検出した。

【結果】*ADE2*遺伝子のPCR解析の結果、NBRC1130（CBS732と同一株）, DA2及びDL2（CBS732の由来の栄養要求性株）に加え、NBRC0686, 0740, 1053及び1733が1倍体であることが確認された。これらの1倍体株を対象にしたPCR解析の結果、CBS732由来のDA2とDL2では、ゲノムシーケンスの結果から予想された通り、1-A, 2-B及び3-Cのプライマーの組合せで増幅が認められた。興味深いことに、CBS732と同じ株であるはずのNBRC1130では、1-Aと2-Bの組み合わせでは増幅が認められず、1-B, 2-A及び3-Cの組み合わせで増幅が認められた。さらに、NBRC0686, 0740及び1053では1-C, 2-A及び3-Cの組合せで、NBRC1733では1-A, 2-A及び3-Cの組合せで増幅が認められた。これら結果から、*Z. rouxii*の1倍体株では、株間において*MAT*遺伝子座近傍の遺伝子構造が異なっている可能性が示唆された。

さらに、パルスフィールド電気泳動とサザンブロット解析の結果から、1倍体の*Z. rouxii*において、株間で核型に著しい多型が存在すること、及びPCR解析で認められた*MAT*遺伝子座近傍における遺伝子構造の変化は染色体レベルの構造変化を伴うものであること、が示唆された。

以上の結果を基に、1倍体の*Z. rouxii*における*MAT*遺伝子座近傍の染色体構造変化メカニズムについて考察する。

1) J. L. Gordon and K. H. Wolfe: Yeast, **25**, 449 (2008).

Zygosaccharomyces rouxii, *MAT*, Chromosomal rearrangements

講演番号：2B19p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ B校舎19会場

Debaryomyces 属酵母のフェノール分解遺伝子の解析

Analysis of phenol biodegradation gene of the genus Debaryomyces

○中野晃幸[1]，柴田光治[2]，能木裕一[3]，浜本牧子[1，2]（[1]明治大院・農，[2]明治大・農，[3]JAMSTEC）
○Teruyuki Nakano[1], Koji Shibata[2], Yuichi Nogi[3], Makiko Hamamoto[1，2]（[1]Meiji Univ. Grad. Sch.，[2]Meiji Univ.，[3]JAMSTEC）

【目的】我々は高濃度フェノール分解性酵母として深海サンプルより耐塩性の *Debaryomyces hansenii* KY-307 株を分離し，その代謝経路が *ortho*-経路であることを明らかにしている[1)]。本研究では，これまで報告のなかった *Debaryomyces* 属酵母数種のフェノール分解性について調べるとともに，フェノール代謝に関わる遺伝子の中でベンゼン環開裂に関わるオキシゲナーゼ遺伝子の解析および発現について調べた。

【方法と結果】*D. hansenii* および本種と生理学的性質が極めて類似の*D. fabryi* の基準株について，高濃度フェノール分解性を調べた結果，KY-307株と同程度の分解性を有することが明らかになった。次に，*D. hansenii* 基準株のゲノム配列解析より，フェノール代謝経路においてベンゼン環の*ortho*-開裂に関わる遺伝子catechol 1,2-dioxygenase（C12O）であることが推測されている配列を基に作製したプライマーを用いて，KY-307株および*D. fabryi* 基準株のゲノムDNAを鋳型としてPCR後，増幅産物の塩基配列を決定した。その結果，KY-307株と*D. hansenii* 基準株は95%, KY-307株と*D. fabryi* 基準株は88%, *D. hansenii* 基準株と*D. fabryi* 基準株は88%の相同性を示した。一方，アミノ酸レベルではそれぞれ97%，93%および95%の相同性を示した。現在，本遺伝子破壊株を作製し，そのフェノール分解性を調べるとともに，遺伝子発現量について解析中である。

[1)] 中野ら，２０１１年度日本農芸化学会大会講演要旨集

biodegradation, *Debaryomyces*, phenol

講演番号：2B19p17
講演日時、会場：3月23日17:15～ B校舎19会場

枯草菌の主要なアセチル化タンパク質（p47）の解析

Analysis of a major acetylated protein (p47) of *Bacillus subtilis*

○古園 さおり、鈴木 健裕、堂前 直、吉田 稔（理研・基幹研）
○Saori Kosono, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Minoru Yoshida (RIKEN-ASI)

【目的】タンパク質アセチル化は主にリジン残基で起こる可逆的な翻訳後修飾であり、バクテリアからヒトまで進化的に保存されたタンパク質の制御メカニズムとして知られている。アセチル化及び脱アセチル化酵素はアセチルCoAやNAD^+などの代謝化合物を反応に利用することから、タンパク質アセチル化は代謝や栄養状態に応答したタンパク質の機能制御に関わると考えられる。我々は、枯草菌を対象としたアセチローム解析（アセチル化タンパク質の網羅的解析）を実施し、120のアセチル化タンパク質を同定した。本研究では、対数期で強くアセチル化される約47 kDaのタンパク質（p47）について解析を行った。

【方法および結果】2xSG（0.1%グルコースを含む）培地で培養した枯草菌ライゼートに、対数期で強くアセチル化される約47 kDaのタンパク質（p47）を見いだした。MS解析および特異的抗体を用いたウェスタン解析の結果、p47は翻訳伸長因子EF-Tu（TufA）であることが判明した。

TufAのアセチル化レベルは対数期で高く、定常期に入るとすみやかに減少した。枯草菌にはクラス1，2型及びクラス3型脱アセチル化酵素が存在する。脱アセチル化酵素二重欠損株（Δ*acuC* Δ*srtN*）では、定常期におけるTufAのアセチル化が維持されたことから、AcuCとSrtNのどちらか、もしくは両方がTufAの脱アセチル化に寄与していることが示唆された。また培地条件を検討したところ、2xSG、L、グルコース最少培地ではTufAのアセチル化は見られたが、コハク酸もしくはクエン酸最少培地ではTufAのアセチル化は見られなかった。以上のことから、TufAのアセチル化は、代謝や栄養状態に応答した翻訳制御に関わるのではないかと考えている。これまでに8カ所のTufAアセチル化部位を同定しており、現在変異解析によりそれらの役割を検討中である。

Bacillus subtilis, protein acetylation, translation

講演番号：2B19p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ B校舎19会場

好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌から新たに同定されたべん毛モーターの運動性解析

Swimming behavior of alkaliphilic *Bacillus* which has a novel flagellar motor.

○佐野元彦、寺原直也[1]、伊藤政博（東洋大院・生命科学、[1]大阪大院・生命機能）

○Motohiko Sano, Naoya Terahara[1], Masahiro Ito (Graduate School of Life Sciences, Toyo University and [1]Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University)

【目的】多くの細菌はべん毛という運動器官を持ち、液体中や固体表面を移動することができる。べん毛は膜に埋め込まれたモーターに相当する基部体、プロペラに相当するフィラメント、それらをつなぐフックの 3 つで構成されている。基部体は回転子と固定子からなり、イオンチャンネルとして機能する固定子に共役イオンである H^+ または Na^+ が流入することでべん毛は回転すると考えられている。これまでの研究から、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌のべん毛モーター固定子は H^+ 駆動型の固定子 MotAB、Na^+ 駆動型の固定子 MotPS、および外環境の pH に応じて H^+ と Na^+ を使い分ける *Bacillus clausii* KSM-K16 株型固定子 MotAB が報告されている。

今回、当研究室は JCM (Japan Collection of Microorganisms)から 19 種類の好(耐)アルカリ性 *Bacillus* 属細菌を譲渡していただき、各菌株のイオン選択性に関わる固定子のアミノ酸配列を解析し、べん毛モーター固定子のグループ分けを行った。*Bacillus* 属における固定子のイオン選択性は固定子複合体の MotB 型サブユニットの膜貫通膜領域が重要な役割を果たしていることが報告されている。一般にイオン選択性に重要な役割を果たしていると考えられているアミノ酸残基としては、MotB 型サブユニットの膜貫通領域中程に位置する Val と Leu が報告されている。すなわち、この部分のアミノ酸残基が Val の固定子は、H^+ 駆動型を示し、Leu の固定子は、Na^+ 駆動型を示す。しかし、19 種類のアルカリ性 *Bacillus* 属細菌のうち *B. alcalophilus* のみが、アミノ酸配列のアライメント解析からは、Na^+ 駆動型固定子 MotPS に分類されるにもかかわらず、Met が利用されていた。そこで、本研究では *B. alcalophilus* がもつ MotPS 固定子の機能を調べるために、各種の運動性試験解析を行った。

【方法】好アルカリ性細菌*B. pseudofirmus* OF4 811M株はNa^+駆動型固定子MotPSを持ちNa^+濃度の増加に伴い遊泳する。また、Na^+チャネルの阻害剤EIPA (5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride)を用いることで遊泳速度が低下することが知られている。このOF4 811M株をNa^+駆動型固定子のコントロールとして*B. alcalophilus*がどのような共役イオンを利用して運動性を示すかを調べた。

【結果】*B. pseudofirmus* OF4 811M株はNa^+濃度の増加に伴い遊泳する傾向が見られた。それに対して、*B. alcalophilus*はNa^+およびK^+濃度の上昇に伴い遊泳する結果が得られた。Na^+駆動型固定子の阻害剤であるEIPAを用いた実験からは、*B. alcalophilus*はNaClまたはKClどちらの存在下でもEIPA濃度の上昇に伴い、遊泳速度が阻害を受けた。以上の結果から、*B. alcalophilus*はこれまでに報告例がないNa^+とK^+の両方のカチオンをべん毛モーターの回転に利用できる全く新しいタイプの固定子をもつことが分かった。

alkaliphilic *Bacillus*, flagellar motor, potassium ion

講演番号：2B19p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ B校舎19会場

degenerate PCRを用いた*Bacillus thuringiensis*由来の殺虫タンパク質遺伝子の検出と単離

degenerate PCR-based diagnosis and identification of genes encoding insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*

森村夏花[1]、波多野裕美[1]、久保友梨佳[2]、小宮浩史[2]、唐谷ゆふ[1]、東　慶直[1]、○武部　聡[1,2]
([1]近畿大院・生物理工、[2]近畿大・遺伝子工)
Natsuka Morimura[1], Hiromi Hadano[1], Yurika Kubo[2], Hiroshi Komiya[2], Yu Karatani[1], Yoshinao Azuma[1], ○So Takebe[1,2] ([1]Grad. Sch. BOST, Kinki Univ., [2]Dept. Gen. Tech., Kinki Univ.)

【目的】*Bacillus thuringiensis* (Bt)が産生する結晶性タンパク質（Cry）は現在までに 600 種類以上が見つかっており、その中には昆虫目特異的な殺虫活性をもつものやガン細胞特異的な細胞損傷作用をもつものがある。このため、Cry は生物農薬や医薬としての利用が期待されている。一方、Bt はこれまでに数千株が登録されているが、これら既知 Bt 菌株の中で産生する Cry の種類や作用について調べられたものはほとんどなく、数多くの有用で優れた性質をもつ Cry が未発見のまま眠っていると考えられている。Cry には 8 つの保存された領域（block 1～block 8）があるので、この領域のアミノ酸配列から degenerate プライマーを設計して PCR を行えば、既知菌株がもつ *cry* 遺伝子を効率よく検出できると考えた。この検出法は Cry の発現量に依存しない。したがって、土壌細菌から *cry* 遺伝子を指標として新規 Bt 菌株を分離する簡便かつ高感度なスクリーニング法としても利用できる。

【方法】Cry の block 領域をもとに４つの degenerate プライマー･ペアを設計した。これら degenerate プライマーの *cry* 遺伝子検出効率を見るために、既知 Bt 菌株を対象に PCR を行い、得られた増幅 DNA 断片の塩基配列を決定した。これをもとに DNA data bank を対象に BLAST 検索を行い、既知 *cry* 遺伝子との相同性を求めた。次に、土壌から分離した細菌を対象に degenerate PCR を用いた新規 Cry の探索を行った。

【結果】鱗翅目、鞘翅目、双翅目昆虫に殺虫活性を示す既知 Bt 菌株を用いて degenerate PCR による *cry* 遺伝子の検出を行ったところ、例えば鱗翅目に対する殺虫活性を示す Bt からは *cry1* が検出されるというように、それぞれの菌が示す殺虫特異性と合致する既知遺伝子が検出された。さらに data bank には登録されていない新規遺伝子も単離することができた。一方、土壌から分離した胞子形成菌からも *cry* 遺伝子が検出され、単離した遺伝子の中には新規なものもあった。これらの遺伝子については、コードするタンパク質を調製し、生物検定を行う予定である。

Bacillus thuringiensis, *cry*, degenerate PCR

講演番号：2C20a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ C校舎20会場

発酵黒八女茶由来機能性ポリフェノールX成分の構造解析およびその機能性

Structural analysis and physiological functions of Black Tea polyphenol X from Fermented Black Yame Tea.

○折居　千賀、善藤　威史、園元　謙二、田中　俊昭[1]、吉野　貴唯[1]、植木　達朗[2]、野田　義治[2]、馬渡　志郎[3]、船津　軍喜[3]、藤野　武彦[3]（九大院・農、[1]一番食品株式会社、[2]福岡県醤油醸造協同組合、[3]株式会社レオロジー機能食品研究所）

○Chika Orii, Takeshi Zendo, Kenji Sonomoto, Toshiaki Tanaka[1], Takatada Yoshino[1], Tatsuro Ueki[2], Yoshiharu Noda[2], Shiro Mawatari[3], Gunki Funatsu[3], Takehiko Fujino[3] (Fac. Agr., Kyushu Univ., [1]Ichiban Foods Co., Ltd., [2]Fukuoka Soy Sauce Brewing Cooperation, [3] Institute of Rheological Functions of Food Co., Ltd.)

【目的】日本茶やウーロン茶および紅茶の機能性および茶由来ポリフェノール類に関する研究は充分になされているが、微生物を用いた後発酵茶に関してはまだ諸についたばかりである。我々は以前に黒麹菌を用いた発酵茶「発酵黒八女茶」を新たに開発した[1)]。同発酵茶には発酵によって生じる特徴的なポリフェノール成分が認められた。そこで本研究では発酵茶由来ポリフェノールX成分に注目し、構造を解析し、その機能性を明らかにすることを目的とした。

【方法】原料として福岡県産八女茶葉を、発酵菌には黒麹菌 *Aspergillus awamori* を用いた。茶葉を滅菌後35℃で好気発酵させた[1)]。発酵茶の熱水抽出物を用いてX成分の精製および結晶化を行った[1),2)]。精製X成分をTLCおよび各種NMR分析に供し、構造を解析した。また、X成分を含有する発酵黒八女茶の熱水抽出物をSHRラット（高血圧自然発症モデル）、KK-Ayマウスあるいは STZラット（糖尿病モデル）に投与し、血圧上昇抑制、経過血糖値測定および血液生化学検査、安全性試験をはじめとした各種機能性評価を行った。

【結果】同発酵茶由来の精製X成分をTLC分析に供したところ、*p*-アニスアルデヒドでは呈色が見られたが$FeCl_3$では呈色を示さなかったため、カテキン類とは異なる構造を有する可能性が示唆された。そこで各種NMRによる構造解析を行いX成分の構造を明らかにすることができた。X成分は分子量が276、組成式が$C_{14}H_{12}O_6$であり、カテキン類とは異なる構造を有したポリフェノール誘導体であった[3)]。X成分を含有する発酵茶熱水抽出物を投与したラットおよびマウスにて赤血球変形能低下の改善[1)]、血糖値上昇抑制、中性脂肪の低下、血圧上昇抑制効果において有意差が確認された。また、同発酵茶は各種安全性試験において毒性は認められなかった。このことより、X成分および同成分を含有する同発酵茶を摂取することで動脈硬化、肥満防止、糖尿病発症予防、血圧改善といった健康に関する効果を得られる可能性が示唆された[3)]。なお、同発酵技術と発酵産物の機能性に関しては経産省研究支援事業による研究であり、現在特許出願中である。

1）特開2010-220489
2）特開2007-238584
3）特願2011-088448

fermented tea, *Aspergillus awamori* , polyphenol

講演番号：2C20a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ C校舎20会場

無通風箱培養法による均一培養と酵素生産特性解析

Uniform culture and characterization of enzyme production by non-airflow box culture method

○伊藤一成、五味勝也[1]、狩山昌弘[2]、三宅剛史　（岡山県工技セ、[1]東北大院農・生物産業創成、[2]フジワラテクノアート）

○Kazunari Ito, Katsuya Gomi[1], Masahiro Kariyama[2], Tsuyoshi Miyake (Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Fujiwara Techno-Art)

【目的】固体培養における糸状菌の高い酵素生産性はよく知られているが、再現性が低く、基質全体を均一に培養することは困難であることが問題となっている。我々はこの問題を克服する無通風箱培養法を以前に考案した。この方法により培養すると、従来の固体培養法と比べてより乾燥する培養経過をたどり、酵素生産性が上昇することを見いだした。今回は無通風箱培養法の原理を示し、均一培養の実現、さらにこの培養法の有利性を示すため酵素生産特性を詳しく解析したので報告する。

【方法】両培養法の培養状態を調べるために、小麦ふすまに麹菌(*Aspergillus oryzae* AOK11株)を接種後、フタ付き金属製のトレイと無通風箱内で、一般的な培養環境（30℃、95%RH、初期基質水分量70%）の下で4日間培養し、品温経過・出麹水分含量・アミラーゼ活性を測定した。また酵素生産などの経過を詳細に調べるために、両培養法ともにほぼ同じ品温経過をたどり(温度の影響を除外するため)、比較的どの酵素も高生産される一定環境（25℃、95%RH、初期基質水分量100%）の下で4日間培養し、この期間中の酵素活性などを調べた。

【結果】無通風箱培養法では従来法よりも、水分状態・品温経過・酵素活性のすべての点で、培養状態の均一さを示すことができ、その再現性も向上していた。また酵素生産経過においては、どちらの培養法においても培養中期以降に酵素生産のピークを迎えたが、無通風箱培養法の方が酵素生産量の増加速度が早かったため、短時間の培養で酵素がより多く生産されていることが分かった。この酵素生産性と同様に無通風箱培養法では、従来法よりも菌体量が培養初期で多くなっており、今回設定した培養条件における酵素生産性の違いは、菌体量に起因することが示唆された。

Keyword1 solid-state fermentation, Keyword2 uniform culture, Keyword3 enzyme production

講演番号：2C20a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ C校舎20会場

スポンジケーキを基質とする麹菌培養法の研究

Cultivation method for *Aspergillus oryzae* using sponge cakes as a culture mediume.

○荘咲子、高田名津美、中村友香、田中恵、上野義栄[1]、田中克幸[2]、八田一（京都女子大・食物、[1]京都府中小企業技術セ、[2]奥野製薬工業

○Sakiko Sho, Natumi Takada, Yuka Nakamura, Megumi Tanaka, Yoshie Ueno[1], Katsuyuki Tamaka[2], Hajime Hatta (KWU, [1] Kyotofuchusyoukigyougijyutuse, [2] Okunoseiyaku)

【目的】

麹菌（*Aspergillus oryzae*）は穀類などを基質として固体培養を行うことにより豊富な酵素を生成する。我々は、麹菌を利用した「麹」と鶏卵加工業界で問題となっている余剰凍結卵白を用いた発酵調味液の調製の検討を行ってきた。今回、卵白液と小麦粉を用いて調製したスポンジケーキ培地に麹菌を培養する「スポンジケーキ麹」の糸状菌高密度培養法を検討した。

【方法】

卵白液を窒素源、小麦粉(強力粉)を炭素源とし、各種ベーキングパウダーを添加したスポンジケーキを焼成した。5mm 角に切断した後、水分 45%になるよう調整を行い、麹菌（*A. oryzae* HO-117：菱六）を接種し、定温恒温器中で、温度 30℃、湿度 95%の条件下で、3 日間培養(製麹)した。これらの「スポンジケーキ麹」の各種酵素活性の測定を行い、プロテアーゼ活性等を指標に、最適調製条件の検討を行った。

【結果と考察】

比容積の高いスポンジケーキ培地は多孔質化しており、麹菌の生育に適している。スポンジケーキ麹には、その空隙に旺盛な菌糸の繁殖が観察された。スポンジケーキ麹の酵素活性は、培地の比容積により差が生じ、中性プロテアーゼ活性においては約35000～55000U/gの変動がみられた。また、ベーキングパウダーの種類により差が生じ、中性プロテアーゼ活性においては約50000～90000U/gの変動が見られた。リン酸塩を含む膨張剤を使用したスポンジケーキ麹は、脱脂大豆を窒素源、割砕小麦を炭素源とした通常の醤油麹に比べ、プロテアーゼ活性やアミラーゼ活性が、約2～3倍の値を示した。

Keyword1 Asp. Oryzae, Keyword2 egg white, Keyword3 sponge cakes

講演番号：2C20a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ C校舎20会場

麹菌の *niaD* 自然変異株のスクリーニングとセルフクローニングへの応用

Development of a self-cloning system using *Aspergillus oryzae niaD* spontaneous mutant

○高見 英輝、前田 浩、竹内 道雄、山形 洋平（東農工大院・応生化）
○Hideki Takami, Hirosi Maeda, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は、酒・醤油・味噌などの発酵食品に利用されている安全な微生物である。しかし、食品にその組換え体由来酵素などを利用するためには、表現型による安全性の保証だけではなく、ゲノムレベルでも安全性を確認することが重要となってきた。そこで本研究では、すでにゲノム解読が終了している *A. oryzae* RIB40 について、ホスト株と組換え技術の面からもゲノムレベルで安全性を保証できる組換え体の作製を目的としている。
【方法】グルタミン酸塩を窒素源とした塩素酸ナトリウムを含む Czapek-Dox (CD) プレート培地に、*A. oryzae* RIB40 の胞子懸濁液を塗布し、生育してくる株を単離することで、ポジティブセレクションによる nitrate reductase 遺伝子（*niaD*）自然変異株のスクリーニングを行った。*niaD* に変異が生じているかどうかは、硝酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムを窒素源とした培地での生育を比較する窒素源資化性テストとシークエンスにより解析した。組換えカセットは、すべて *A. oryzae* のゲノムを鋳型に増幅した DNA フラグメントで構成し、セルフクローニングとなるように設計した。選択マーカー遺伝子に *niaD*、目的遺伝子に cutinase 遺伝子（*cutL1*）、プロモーターに enolase 遺伝子（*enoA*）プロモーターを使用し、マーカー遺伝子と目的遺伝子を並列に配置した DNA フラグメント（カセット ①）ならびに目的遺伝子の左右にマーカー遺伝子断片をアームとして配置した DNA フラグメント（カセット ②）とを組換えカセットとして形質転換を行った。カセットの組換え位置、数はサザンブロッティングにより解析した。組換え体は、誘導物質グルコースを含む YPD 液体培地で培養し、培養上清への CutL1 の分泌を cutinase 活性、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングにより解析した。
【結果】30% 塩素酸ナトリウムを含む CD プレート培地で生育可能で、窒素源が硝酸ナトリウムでは生育できず亜硝酸ナトリウムで生育可能な 2 株を得た。これらは *niaD* に一塩基欠損もしくは一塩基変異が起こっていることを明らかにした。これら 2 株を各々 *A. oryzae* niaD827、*A. oryzae* niaD2210 と名付けた。このうち *A. oryzae* niaD2210 をホスト株としてセルフクローニングによる組換えを行ったところ、カセット ① による組換えでは複数の locus で組換えが起こり、カセット ② による組換えでは *niaD* locus でのみ組換えが起こっていることがわかった。挿入遺伝子数に比例する形で、cutinase 活性が見られ、SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティングどちらにおいても CutL1 が確認された。
なお、本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus oryzae, spontaneous mutant, self-cloning

講演番号：2C20a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ C校舎20会場

グルコース・エタノール共存下における酢酸菌の酸化発酵挙動の解析

Oxidative fermentation behavior of acetic acid bacteria in the presence of glucose and ethanol

貝沼（岡本）章子、○尹蓮梅、石川森夫、岡田卓也、山上圭吾[1]、小泉幸道（東農大応生科・醸造、[1]ミツカン中研）

Akiko Okamoto-Kainuma, ○Lianmei Yin, Morio Ishikawa, Takuya Okada, Keigo Yamagami[1], Yukimichi Koizumi (Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [1]Central Research Inst., Mizkan group Corp.)

【目的】酢酸菌はエネルギー代謝の一環として酸化発酵を行い、食酢醸造等に用いられる。酸化発酵は、細胞膜上の脱水素酵素による細胞外基質の酸化を電子伝達系と連動させてATPを獲得する現象であるが、酢酸菌は通常複数種類の脱水素酵素を膜上に有しており、複数の化合物を基質として利用することができる。しかし、これらの脱水素酵素間の相関や細胞内資化経路との関連性、基質利用の優先性等については不明な部分が多い。本研究では、*Acetobacter*属と*Gluconobacter*属の酢酸菌について、グルコースとエタノールの利用挙動に注目し、関連脱水素酵素群の転写挙動について検討を行った。

【方法】酢酸菌は、*Acetobacter pasteurianus* NBRC3283株および*Gluconobacter oxydans* DSM2003株を用いた。両株をそれぞれエタノール・グルコースの共存下で振とう培養し、経時的に生育度、グルコース消費量、有機酸生成量の測定を行った。有機酸の定量はイオン排除HPLCで行った。また、同様の培養条件下において、膜結合性デヒドロゲナーゼ遺伝子の発現挙動を経時的に解析した。遺伝子の発現量解析は、ABIの7300 Real Time PCR Systemを用いて行った。この際、膜結合性アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(*adh*)、アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子(*aldh*)、およびグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子(*gdh*)を解析対象とした。

【結果】エタノール・グルコース共存下では、*A. pasteurianus*の場合はエタノールを優先的に酸化し、エタノールの枯渇に伴って酢酸の過酸化（細胞内資化）と連動する形でグルコースの酸化を活発化した。一方、*G. oxydans*の場合は、グルコースを優先的に酸化し、グルコースの枯渇に伴ってエタノールの酸化を活発化するという挙動を示し、いずれの株の場合も基質の利用に関して優先順位が存在した。これらの基質の酸化に関わる膜結合性デヒドロゲナーゼ遺伝子（*adh*, *aldh*, *gdh*）の転写挙動を解析した結果、いずれの株においても、基質利用の優先順位を反映した形で各種デヒドロゲナーゼ遺伝子が発現しており、酢酸菌におけるこのような特徴的な炭素源の利用挙動は、転写レベルで制御されていることが示唆された。

acetic acid bacteria, membrane-bound dehydrogenase, oxidative fermentation

講演番号：2C20a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ C校舎20会場

次世代シークエンサーを用いたゲノムスケールでの酢酸菌分類の試み

Taxonomic study of acetic acid bacteria on the basis of genome sequences analyzed by a next-generation DNA sequencer

貝沼（岡本）章子、○海野祥子、石川森夫、志波優[1]、吉川博文[1,2]、松谷峰之介[3]、松下一信[3]、山上圭吾[4]、小泉幸道（東農大応生科・醸造、[1]東農大・ゲノムセンター、[2]東農大応生科・バイオ、[3]山口大・農、[4]ミツカン中研）

Akiko Okamoto-Kainuma, ○Shouko Umino, Morio Ishikawa, Yuh Shiwa[1], Hirofumi Yoshikawa[1,2], Minenosuke Matsutani[3], Kazunobu Matsushita[3], Keigo Yamagami[4], Yukimichi Koizumi (Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [1]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Biol. Chem., Yamaguchi Univ., [4]Central Research Inst., Mizkan Group Corp.)

【目的】 酢酸菌科の微生物は現在 28 属が設置されているが、16S rRNA に基づいた系統が必ずしも表現型の違いを反映せず、系統関係が混乱している。これは、酢酸菌の易変異性と関係していると思われる。このため、酢酸菌の分類においては、従来の方法に加え、新規の手法による知見を加味して考える必要性が生じている。本研究では、次世代シークエンサーを用いて酢酸菌科のバクテリアのゲノム解析を行い、得られたゲノム情報に基づいた系統解析を行って、16S rRNA による系統や表現型との関連・相違についての比較検討を行った。

【方法】 酢酸菌各株のゲノムは、Illumina Genome analyzer II により解析した。得られたドラフトゲノム配列及び公開されているコンプリートゲノム配列中の ORF について総当たり BLASTP 解析を行い、全ての株間で共通に保存されているオルソログ遺伝子のグループを同定した。解析対象の各株について、このオルソログ遺伝子のアミノ酸配列を concatenate した pseudo-single-sequence を作成し、CLUSTALW 及び MEGA version 4.0 を用いて、NJ 法による系統解析を行った。16S rRNA 配列については、定法により系統樹を作成した。

【結果】 酢酸菌8株(*Ameyamaea chiangmaiensis*, *Asaia bogorensis*, *Asaia krungthepensis*, *Asaia siamensis*, *Kozakia baliensis*, *Neoasaia chiangmaiensis*, *Swaminathania salitolerans*, *Tanticharoenia sakaeratensis*) についてドラフトゲノム配列を決定し、*Acetobacter pasteurianus*, *Acidiphilium cryptum*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Granulibacter bethesdensis*のコンプリートゲノム配列と併せて628のオルソログ遺伝子を抽出した。このオルソログ遺伝子より成るpseudo-single-sequenceの系統樹を、16S rRNA配列による系統樹と比較したところ、両者はかなり異なる様相を呈し、ゲノムレベルでの系統は16S rRNA配列による系統よりも、より表現型を反映した形となった。また、*A. chiangmaiensis* と *T. sakaeratensis* については、両解析間で系統的位置に大きな差異を生じた。現在、さらに株数を増やし、より網羅的に酢酸菌におけるゲノムスケールでの系統解析を進めている。

acetic acid bacteria, next-generation sequencer, phylogenetic analysis

講演番号：2C20a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ C校舎20会場

Gluconacetobacter xylinus NBRC3288 における酸素欠乏応答に関する研究

Study on the response to oxygen depletion in *Gluconacetobacter xylinus* NBRC3288

○渡辺 誠司、白井 睦訓[1]、大西 康夫（東大院農生科・応生工、[1]山口大院・医）

○Seiji Watanabe, Mutsunori Shirai[1], Yasuo Ohnishi (Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. of Tokyo, [1]Dept. Microbiol. Infect. Dis., Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ.)

【背景・目的】食酢の深部発酵法において、酢酸菌による活発な酢酸発酵は培養液中の溶存酸素濃度の低下を招き、これが酢酸発酵の律速となっている。すなわち、深部発酵法における酢酸発酵時、酢酸菌は自身の酸素消費によって慢性的な酸素欠乏状態に晒されている。また、キャビテーションによる酸素供給を止めて一定期間静置保存した発酵液中において、絶対好気性菌である酢酸菌は全滅せずに一部生存しており、こういった培養液が次の酢酸発酵の種（前培液）として使用される。これらのことより、酢酸菌は酸素欠乏に対して何らかの耐性機構を有していると考えられる。この酸素欠乏耐性機構を研究することにより、生存率が高い酢酸菌の育種および効率的な培養法が確立できると考え、本研究に取り組んだ。

【結果・考察】*G. xylinus* NBRC3288 のゲノム情報から、大腸菌の酸素欠乏に応答する転写制御因子 Fnr のホモログ GXd01677 を見出した。*GXd01677* 破壊株を作製して表現型を解析した結果、非酢酸発酵時ではあるが、振とう培養液を長時間静置した際の生菌数が野生株対して有意に減少することが分かった。そこで、GXd01677 の標的遺伝子を明らかにするため、野生株と *GXd01677* 破壊株のトランスクリプトーム解析を行った。*GXd01677* 破壊株において発現量が低下していた 22 遺伝子について RT-PCR による再確認を行い、17 遺伝子を選抜した。今回、これらのうち *GXd01603*（acetate kinase）および *GXd01602*（xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase; Xfp）に着目した。*GXd01603-02* はオペロンを形成しており、その転写開始点を *GXd01603* 翻訳開始点の 32 塩基上流に見出した。この転写開始点より 41.5 塩基上流には Fnr の結合コンセンサス配列が存在しており、本オペロンが Fnr ホモログ（GXd01677）の標的であることが強く示唆された。また、野生株において本オペロンの転写産物は酢酸発酵培養液を静置することにより増加した。一方、*GXd01677* 破壊株においては増加せず一定であった。坂口フラスコで酢酸発酵させた培養液を静置して CFU の測定を行った結果、静置時間の増加に伴う CFU の減少は、野生株に比べて *GXd01603-02* 破壊株においてより顕著であった。流加によりエタノール濃度を一定に保つミニジャー培養試験を行い、高酸度条件下における影響を調べた結果、*GXd01603-02* 過剰発現株の最終到達酢酸濃度は野生株を上回った。いくつかの細菌において、Xfp および acetate kinase により xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate から acetyl phosphate 経由で ATP を生成する経路が報告されている。今回得られた結果より、*G. xylinus* NBRC3288 は、酸素欠乏時において Fnr ホモログ GXd01677 を介して転写活性化される *Gxd01603-02* 遺伝子産物の機能により、生存状態を保つためのエネルギーを獲得していると考えられる。

Acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter xylinus* NBRC3288, Fnr,

講演番号：2C20a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ C校舎20会場

味噌用麹菌*A. oryzae* KBN630株における酸性ホスファターゼ（Aph）遺伝子多重破壊株の作出

Multiple disruption of acid phosphatase genes in the *miso koji* mold, *A. oryzae* KBN630

○安田 庄子、長谷川 摂、小野 奈津子、伊賀 佳美[1]、白石 洋平[1]、和久 豊[1]、杉本 達哉[2]、 楠本 憲一[3]、北本 則行（愛知産技研・食工技セ、[1] ビオック、[2]ナカモ、[3]食総研）

○Shoko Yasuda, Osamu Hasegawa, Natsuko Ono, Yoshimi Iga[1], Yohei Shiraishi[1], Yutaka Wagu[1], Tatsuya Sugimoto[2], Ken-Ichi Kusumoto[3], Noriyuki Kitamoto (Food Res. Center, Aichi Ind. Tech. Inst., [1] Bio’c, [2] NAKAMO, [3]NFRI)

【目的】核酸系調味料を添加した調味味噌は、味噌中の酸性ホスファターゼ（Aph）による旨味成分の分解防止のため、高温の加熱失活処理が不可欠である。しかし、高温加熱により味噌の品質が低下するため、Aph低生産麹菌を利用した新規な省エネルギー型味噌製造技術の開発が求められている。我々は、味噌製造における*aph* 遺伝子群の機能解明とAph低生産麹菌の育種を目指して研究を行っている。始めに味噌用麹菌*A. oryzae* KBN630株において、*ku70* および*pyrG* 遺伝子を破壊することにより、90%以上の高頻度の相同組換え系を開発した[1)]。次に麹菌ゲノム情報から*A. niger phyA* 遺伝子と相同性のある推定酸性ホスファターゼ遺伝子を８個（*aphA*～*aphH* ）、*A. niger phoA* 遺伝子及び*A. niger aphA* 遺伝子と相同性のある遺伝子をそれぞれ３個（*aphI* ～*aphK* ）及び２個（*aphL* 、*aphM* ）見出し、それぞれの遺伝子破壊を行った。これら13株の遺伝子破壊株を用いて豆麹を作製し、Aph活性を測定した。その結果、*aphC* 遺伝子破壊株のAph活性が親株の約５%にまで顕著に低下し、*aphA* 遺伝子破壊株と*aphE* 遺伝子破壊株のAph活性が親株の約80%に低下した[2)]。今回はさらにAph活性の低下した株を取得するために、*aphC* ・*aphA*・*aphE* 遺伝子の二重・三重破壊株の作製を試みたので報告する。

【方法および結果】pUC18に*aphC* 遺伝子のプロモーター上流領域、ターミネーター下流領域、*pyrG* 遺伝子および*aphC* 遺伝子のコード領域の後半の一部を順に組み込んだ*aphC* 遺伝子削除用ベクターpDelaphCを構築した。pDelaphCを用いて*A. oryzae* KBN630-17K3株を形質転換し、得られた形質転換体の中から5-フルオロオロチン酸（5-FOA）およびウリジン含有ツァペック寒天培地に生育してきた形質転換体を単胞子分離により純化して*aphC* 遺伝子削除株を取得した。次に*aphA* 遺伝子削除用ベクターpDelaphAを用いて*aphC* 遺伝子削除株を形質転換し、同様の方法で*aphC* ・*aphA* 二重削除株を取得した。さらに遺伝子破壊用ベクターpDisaphEを用いて*aphC* ・*aphA* 二重削除株を形質転換し、ツァペック寒天培地に生育してきた形質転換体を純化して*aphC* ・*aphA*・*aphE* 遺伝子の三重破壊株を取得した。現在、*aphC* ・*aphA*・*aphE* 遺伝子の二重・三重破壊株の豆麹におけるAph活性の変化を測定している。

本研究は「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の一環として実施した。

１）Food Science and Technology Research (2011) 17:161-166
２）第11回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集 P-42 (p.59)

Aspergillus oryzae, acid phosphatase, gene disruption

講演番号：2C20a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ C校舎20会場

醤油用黄麹菌(*Aspergillus oryzae* RIB915株)のゲノムシーケンス解析

The genome sequence analysis of *Aspergillus oryzae* RIB915 used for soy sauce making.

○藤村 友明[1]、野村 孝典[1]、岩下 和裕[1,2]、山田 修[2]（[1]広島大院・先端研、[2]酒総研）
○Tomoaki Fujimura[1],Takanori Nomura[1],Kazuhiro Iwashita[1,2],Osamu Yamada[2] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat.,Hiroshima Univ., [2]NRIB)

【目的】麹菌(*Aspergillus oryzae*)は、醸造産業や酵素産業等において重要な微生物であり、使用用途により、特性の異なる多様な株が使用されている。これまでに当研究室では、麹菌 DNAchip を使用し、各種実用麹菌株の進化系統解析を行うと共に、清酒用麹菌のモデル株である RIB128 株、現在の主要な清酒用麹菌株の 1 つである RIBOIS01 株についてドラフトゲノムシーケンス解析を行い、これらのゲノム構造の違いについて具体的に検討してきた。今回、醤油麹または種もやし由来の菌株の中から、各種酵素の生産性や作成した醤油の官能評価の結果から RIB915 株を選択しゲノムシーケンス解析を行った。また、今までゲノムシーケンス解析を行った *A.oryzae* 3 株と比較解析することで、実用麹菌のゲノム進化やゲノムの構造と各菌株の特性との関連について解析することを目的とした。

【方法・結果】まず、醤油用麹菌RIB915株からDNAを抽出し、次世代シーケンサー 454 Genome Sequencer FLX(Roche社)に供し、pair end解析によりシーケンスを行った。その結果、5,282本の contig、679本の Scaffoldが得られ、その総長は約 37.0 Mbpであった。また、Scaffold で長いものは4Mbpに達した。次に、BLASTを用い RIB40 株のゲノムと比較したところ、500 bp 以上の染色体の欠失と新規挿入配列がそれぞれ100箇所以上ずつ見出された。また、染色体間組換え数箇所確認された。さらに、Spalnにより各遺伝子をRIB40株と比較したところ、RIB40株の93.6%の遺伝子が保存されていた。一方、新規配列に含まれている遺伝子をGlimmer 3により予測すると、862遺伝子予測され、NCBI Genbankに対するBLAST検索により、97遺伝子との相同性が確認されたが残りの遺伝子は全く新規の遺伝子であると思われた。

次に、今まで解析が行われた*A.oryzae* 4株間での比較ゲノム解析を行った。まず、*Aspergillus* 属で保存されているMycotoxinクラスター(Aflatoxin, Aflatrem, Cyclopiazonic acid)に属する遺伝子を比較すると、4株共、遺伝子の欠失やフレームシフトによるストップコドンの出現により、機能が失われている事が示唆された。次に、二次代謝クラスター予測プログラム、SMURFを使い、二次代謝クラスターの比較を行うと、約80%のクラスターが4株間で保存されていた。糸状菌の二次代謝クラスターは十分解明されていないことから、今後着目し詳細に解析する必要がある。また、各株でユニークなクラスターが数個ずつ確認され、それらが各菌株の特性のひとつであると考えられる。

現在、清酒醸造や醤油醸造産業で重要な事が既に明らかとなっている遺伝子や転写因子について、詳細な比較解析を実施している。

Aspergillus oryzae Genome sequence Comparative genomics

講演番号：2C20a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ C校舎20会場

耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* DMB1 のエタノール発酵性

Characterization of a thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* DMB1

○五島　徹也、井上　宏之、松鹿　昭則、矢野　伸一（産技総研バイオマス研セ）
○Tetsuya Goshima, Hiroyuki Inoue, Akinori Matsushika, Shinichi Yano (BTRC, AIST)

【目的】近年、地球温暖化対策や化石資源代替のために、バイオエタノールの需要が急増している。木質系バイオマスからの効果的なエタノール生産技術の確立のために、エタノール生産能の高い酵母株が求められている。木質系バイオマスの糖化液にはキシロースが多量に含まれるが、エタノールの発酵生産に広く用いられる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、五単糖の分解が困難である。キシロースを発酵できる酵母として *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis* などが知られるが、エタノール耐性が低く、キシロース代謝系がグルコースなどの糖類の存在下で抑制される。そこで、キシロース代謝にキシロース還元酵素（XR）及びキシリトール脱水素酵素（XDH）の遺伝子を高い発酵効率をもつ酵母（*S. cerevisiae*）に導入するなど、キシロース代謝能を獲得させる育種が進められている。産総研では、上記遺伝子に加えて *S. cerevisiae* 由来のキシルロキナーゼ（XK）の遺伝子をキシルロース発酵能の優れた工業用 *S. cerevisiae* 酵母 IR-2 株に導入し、この遺伝子組換え酵母が、グルコース存在下でもキシロースを効率よく発酵できる C5・C6 糖同時発酵性酵母株の作製に成功している。しかし、*S. cerevisiae* は併行複発酵（SSF）に不可欠な高温耐性、耐酸・耐塩性の能力を保持していない。C5・C6 糖同時発酵技術の確立のため、我々は高温耐性酵母 *Kluyveromyces marxianus* に注目し、SSF 酵母の分子育種を行っている。耐熱性酵母を用いる高温発酵は、発酵の迅速化のみならず、冷却エネルギーの削減、雑菌混入の防止などのメリットも見込まれ、省エネルギー及び二酸化炭素の排出削減を可能にする発酵技術になると期待される。

【方法・結果】我々は、バガス糖化液から耐熱性酵母 *K. marxianus* DMB1 株を取得している。*S. cerevisiae* では発酵不可能な 47.5℃の高温で発酵試験を行った結果、DMB1 株は高いエタノール発酵可能であった。このことから、*K. marxianus* DMB1 株は木質系バイオマスからの効果的なエタノール生産技術に求められるエタノール生産能の高い酵母株として期待している。本発表では、産総研オリジナル耐熱性酵母 *K. marxianus* DMB1 株の高温での発酵特性やバイオマス資源からのエタノール発酵能について報告したい。

ethanol fermentation, yeast, xylose

講演番号：2C20a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ C校舎20会場

花から分離した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のマイクロサテライト解析による遺伝的多様性解析

Application of microsatellite classification to the analysis of the genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from flowers

○小野奈津子、安田（吉野）庄子、船越吾郎、加藤雅士[1]、北本則行（愛知産技研・食工技セ、[1]名城大・農）

○Natsuko Ono, Shoko Yoshino-Yasuda, Goro Funakoshi, Masashi Kato[1], Noriyuki Kitamoto (Food Res. Center, Aichi Ind. Tech. Inst., [1]Dept. of Agr., Meijo Univ.)

【目的】食生活の多様化などに伴って様々な嗜好に対応する発酵食品の製造が求められ、異なった生理学的性質を持つ新たな*S. cerevisiae* の分離が試みられている。優れた性質の菌株を得るにはより多くの多様な菌株を迅速かつ効率的に分離し比較・検討することが必要であるが、多大な時間と労力が必要とされている。そこで、我々は自然界から迅速かつ効率的に新規な優れた性質を有する*S. cerevisiae* を分離し、分離した*S. cerevisiae* による発酵食品製造を目指して研究を行っている。これまでに、*S. cerevisiae* の優先的な増殖を可能とする選択的集積培地を選定する[1)] とともに、*S. cerevisiae* 特異的検出プライマーを活用したスクリーニング方法を組み合わせることによって、迅速に*S. cerevisiae* を分離する手法を確立した。今回は、確立した*S. cerevisiae* 迅速的分離法を用いて花から分離した*S. cerevisiae* の遺伝的多様性について染色体DNA上に存在するマイクロサテライトを解析することによって検討したので、報告する。

【方法および結果】確立した*S. cerevisiae* 迅速的分離法を用いて、愛知県内の様々な花から*S. cerevisiae* の分離を試みたところ、12種類の花から28株の*S. cerevisiae* を分離することに成功した。花から分離した28株の*S. cerevisiae* 、30株の産業用酵母（清酒酵母、ワイン酵母、パン酵母）及び実験室酵母について、Jean-Luc Legrasらの方法[2)] により、12遺伝子座(C5、C3、C8、C11、C9、SCYOR267c、YKL172w、SCAAT1、C4、SCAAT5、C6、YPL009c)のマイクロサテライトを含む領域をmultiplex PCR法により増幅させた。PCR増幅DNA断片のサイズをDNAシーケンサーで測定した後、得られたデータに基づいてクラスター解析を行った。清酒酵母、ワイン酵母、パン酵母の大部分がそれぞれの用途を反映して用途別にクラスターを形成していた。一方、花から分離した*S. cerevisiae* は産業用酵母とは異なる独自のクラスターを形成していた。このような結果から、花から新たに分離した*S. cerevisiae* は従来の産業用酵母とは異なる性質を有していると考えられた。

本研究の一部はエリザベス・アーノルド富士財団平成23年度学術研究助成により行った。

1) 日本食品科学工学会誌（2011）第58巻（9号）：433-439
2) Molecular Ecology (2007) 16, 2091-2102

Saccharomyces cerevisiae, microsatellite, genetic diversity

講演番号：2C20a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ C校舎20会場

魚醤油（イカイシル）の発酵熟成過程における乳酸菌数の変化および抗酸化活性成分の変化

Change of cell number of lactic acid bacteria and variation of antioxidative components during the fermentation of fish sauce(ishiru) from squid

○鈴木　隆元、赤堀　早恵香、黒木　美咲、小柳　喬、笹木　哲也[1]、道畠　俊英[1]、中村　静夫[1]、熊谷　英彦　（石川県大、[1]石川工試）

○Takamoto Suzuki, Saeka Akahori, Misaki Kuroki, Takashi Koyanagi, Tetsuya Sasaki[1], Toshihide Michihata[1], Shizuo Nakamura[1], Hidehiko Kumagai (Ishikawa-PU, [1]IRII)

【目的】石川県能登地方特産の魚醤油であるイカイシルはイカの内臓を 1~2 年間発酵熟成させたものである。　このイシルの発酵には乳酸菌の関与が知られているが、関わっている乳酸菌の種類や発酵過程における変化については十分に解析されていない。　また、イカイシルには抗酸化活性の存在が報告されているが、その性質や成分については明らかになっていない。　本研究ではイカイシルの発酵熟成過程における乳酸菌数の変化および抗酸化活性成分の変動について検討を行った。

【方法】発酵容器から経時的に上層、中層、下層部分の発酵液を採取し、段階希釈の後、0、3、5、10、15%の食塩を含む MRS 寒天培地に播種して乳酸菌数を測定した。　発酵液中の抗酸化活性は DPPH ラジカル消去法、スーパーオキシドラジカル消去法、ORAC 法、鉄還元法で測定した。

【結果】イカイシルの発酵液は容器中で上層、中層、下層の 3 層に分離する。　発酵液中の乳酸菌は上層、中層、下層いずれにおいても発酵初期に $10^{7\text{-}8}$ レベルまで増殖し、それ以降は減少する傾向を示した。　発酵後期には上層では 10^{1} レベル、中層、では 10^{3} レベル、下層では $10^{4\text{-}5}$ レベルになった。　0%食塩濃度の培地で生育する菌は発酵初期にのみ存在した。　食塩を含む培地で生育する乳酸菌数は、食塩濃度の違いにより大きな差は見られなかった。　異なる発酵段階の上層、中層、下層から食塩を含む培地で分離した菌をランダムに選択して、16SrDNA 配列により菌種同定を行った結果、選択した菌はすべて *Tetragenococcus halophilus* と同定された。発酵液中の抗酸化活性は上層、中層に比べて下層部分で強い傾向が認められた。　発酵経過に伴う抗酸化活性の変化のパターンは、活性測定法によって異なっており、消去するラジカルに対する反応性に違いのある成分の存在が示唆された。　発酵の進行に伴い活性成分の変化が起こっていることが考えられた。　発酵段階の異なる発酵液中の抗酸化成分をゲル濾過カラムにより分画した結果、発酵が進むにつれて活性成分が低分子化していることが認められた。

fish sauce, lactic acid bacteria, antioxidative activity

講演番号:2C20a13
講演日時、会場:3月23日11:32～ C校舎20会場

自然界から分離した酵母*Saccharomyces cerevisiae* AK 46のパン生地発酵力の改良

Improvement of leavening ability in dough of *Saccharomyces cerevisiae* AK 46 isolated from natural habitat

○高谷政宏、三雲大[1]、田村雅彦[1]、折笠善丈、小田有二（帯畜大・食品、[1]日本甜菜製糖・総研）
○Masahiro Takaya, Dai Mikumo, Masahiko Tamura, Yoshitake Orikasa, Yuji Oda (Obihiro Univ. Agr. Vet. Med., Nippon Beet Sugar Manuf. Co.)

【目的】酵母*Saccharomyces cerevisiae* AK 46はエゾヤマザクラの果実を発酵させた汁液から分離された菌株であり、製パン用「とかち野酵母」として商品化されている。AK 46は天然系パン酵母としては製パン適性に優れているが[1)]、市販パン酵母と比較すると糖無添加パン生地の発酵力が低い[2)]。そこで、2-デオキスグルコース(2-DOG)耐性による菌株改良を試みた。

【方法】AK 46の菌体懸濁液(約10^9/ml)0.1mlを0.08% 2-DOG含む最少マルトース寒天培地（マルトース　2.0%、Yeast Nitrogen Base without Amino Acids 0.67%、寒天 2.0%）に塗布し、2枚の中から出現した1個のコロニーを変異株MCD4として保存した。各菌株はYPS培地（2.0% Yeast extract, 4.0% Peptone, 0.2% KH_2PO_4, 0.1% $MgSO_4$・$7H_2O$, 3.0% NaCl, 0.05% アデカノール LG-294, 2.0% スクロース）で30℃、24時間振盪培養し、回収した湿菌体（固形分33%）を使用した。パン生地発酵力は、糖無添加または小麦粉10gに対して5%または30%のスクロースを含むパン生地からのガス発生量(ml/2h/10g小麦粉)として計測した。製パン試験は小麦粉200gを使用した食パンの配合で行った。

【結果】AK 46には他の酵母菌株とは異なる性質を有している。その一つは、テンサイ糖蜜からのエタノール生成が遅いこと、もうひとつは*SUC2*遺伝子内に2か所の塩基置換があることで、MCD4にもこれらの特徴が認められた。MCD4およびAK 46の糖無添加パン生地発酵力は48.0および28.5(ml/2h/10g小麦粉)、5%スクロース添加パン生地発酵力は52.0および42.0と大幅に改善されており、30%スクロース添加パン生地発酵力は14.5および17.0と同程度であった。糖無添加パン生地の発酵力と関係するα-グルコシダーゼ活性は、AK 46からMCD4の変異により約2倍に増加した。次に、中種法および直捏法による食パンの製造試験を実施した。糖無添加の中種生地からの炭酸ガス発生を追跡すると、最高速度に達する時間はAK 46では120分であるのに対してMCD4では80分にまで早まっていた。酵母は中種生地内にわずかに存在する単糖類を発酵して60分以内に消費し、その後は小麦粉に含まれるβ-アミラーゼなどの作用によってデンプンから生成するマルトースを発酵する。MCD4は基質の単糖からマルトースへの変化に素早く適応できるようにマルトース発酵性が構成的に発現しているものと考えられた。製造したパンの比容積はMCD4で6.11±0.04、AK 46で5.88±0.04であった。直捏法でのパン生地からの炭酸ガス発生速度は、MCD4がAK 46を常に上回っており、製造したパンの比容積はMCD4で5.66±0.09、AK 46で5.09±0.05となり、MCD4のほうが有意に大きな値を示した。培養菌体を乾燥して冷蔵保存したところ、MCD4の生菌率はAK 46と同等であった。

1)特開2010-68739; 2)*Food Sci. Technol. Res.*, 16, 45-50(2010)

baking, yeast, 2-deoxyglucose

講演番号:2C20a14
講演日時、会場:3月23日11:43～ C校舎20会場

Saccharomyces cerevisiae によるチーズホエー・デンプン質混合原料からのエタノール生成

Ethanol production from the mixture of cheese whey and starchy materials by *Saccharomyces cerevisiae* strains

○藤井秀峰、折笠善丈、小田有二（帯畜大・食品）
○Hidetaka Fujii, Yoshitake Orikasa, Yuji Oda (Obihiro Univ. Agr. Vet. Med.)

【目的】チーズ製造の副産物であるホエーにはラクトースが含まれているが、エタノール原料として使用するには問題点がある。第一に通常の酵母*Saccharomyces cerevisiae*はラクトースを発酵できないため、あらかじめガラクトースとグルコースにまで酵素分解しなければならないこと、第二にラクトースの濃度が約5%と低く、エタノールの生産効率が悪いことである。ホエー以外の原料と混合することによって糖濃度を上げることもできるが、ガラクトースの発酵がそれ以外の糖によって抑制される現象も予想される。そこで、各種の*S. cerevisiae*菌株からチーズホエー・デンプン質混合原料から効率的にエタノールを生成する菌株を選抜し、その発酵特性について調べた。
【方法】加熱で発生した固形分を除去後、ラクターゼ処理したチーズホエーに規格外の小麦粉を懸濁し、α-アミラーゼで液化後、グルコアミラーゼと植物組織崩壊酵素でデンプンをグルコースにまで加水分解した。このチーズホエー・小麦粉糖化混合液（グルコース 28%、ガラクトース2%）を酵素処理ホエーで希釈し、糖濃度を20%（グルコース 18%、ガラクトース2%）に調整して発酵用培地とした。同様の方法で、小麦粉の代わりにバレイショデンプンを原料とした発酵用培地も調製した。酵母はYPD培地で24時間振盪培養後、菌体を回収して培養液の10倍容量の発酵用培地に接種した。これを通気制限下で振盪培養し、上清中のエタノールおよび糖を分析した。
【結果】パン酵母、エタノール酵母、野生酵母などの*S. cerevisiae* 28株をチーズホエー・小麦粉糖化混合液で60時間培養したところ、ほとんどの菌株はガラクトースを消費せず、生成エタノール量は75～80 mg/ml程度であった。しかし、樹液由来のNBRC 10514とNBRC 10515の2株はガラクトースを発酵しており、生成エタノール量は89 mg/mlに達していた。生成エタノール量がもっとも高かったNBRC 10515の培養経過を追跡したところ、グルコースの発酵は24時間で完了しており、ガラクトースはそれ以降に消費され始めた。NBRC 10515はカタボライトリプレッション解除株ではなく、グルコース消費後のガラクトース発酵の誘導が迅速に行われる菌株と推定された。次にNBRC 10515の培養菌体を回収して、別の新しい培地を添加して繰り返し使用する連続バッチ発酵試験を行った。生成エタノール量は60時間でほぼ一定(90 mg/ml)となり、5回繰り返すことができた。バッチ回数にともなって菌体数2×10^{8}(cells/ml)から10^{9}(cells/ml)にまで増加し、生菌率も95%以上であった。グルコースの発酵完了に要する時間はバッチ回数に伴って短縮化され、4回目で12時間になったが、ガラクトースの完全消費には60時間かかった。小麦粉の代わりにバレイショデンプンを原料とした培地においても、同様の結果が得られた。

ethanol, cheese whey, yeast

講演番号：2C20p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ C校舎20会場

PUT遺伝子導入株を用いた低プロリン濃度甲州ワインの醸造について

Making a low proline level Koshu grape wine by PUT genes transformed wine yeast.

○三木　健夫、安藤　直哉、谷本　守正（山梨大・院）
○Takeo Miki, Naoya Ando, Morimasa Tanimoto (Yamanashidai, Inn)

【目的】甲州白ワインは他の白ワインと比較して多量のプロリン（約500 mg•l^{-1}）を含む。プロリンは中性水溶液中で苦味や甘味を呈することが知られている。甲州ワインは、官能検査により淡麗・低酸味と指摘されることが多く、本ワインの酒質にプロリンが悪影響を与えている可能性が示唆されている。当研究室では、甲州ワインのプロリンを低減させる方法について検討を行ってきた。本研究では、低プロリン濃度の甲州ワインを醸造することを目的に、プロリン資化代謝に関連する遺伝子(*PUT1*,*PUT3* and *PUT4*)を導入したワイン酵母株を用いて合成果汁培地および甲州ブドウ果汁を発酵させ、製造されたワイン中のプロリン濃度を比較した。

【方法】供試菌株としてワイン酵母*Saccharomyces cerevisiae* OC-2株(*Diploid*, Δ*URA3* / Δ*ura3*), を用いた。一方、OC-2株よりのプロリンオキシダーゼ遺伝子（*PUT1*）、プロリン資化を制御する転写因子タンパク質遺伝子（*PUT3*）およびプロリン膜輸送タンパク質遺伝子（*PUT4*）をクローニングした。プラスミドベクターpRS416に*PUT1*、*PUT3*および*PUT4*遺伝子を連結したものをOC-2株に形質転換し、それぞれP1、P3およびP4株とした。試験培地として、プロリンを含む合成果汁培地（グルコース 20%, yeast nitrogen base w/o amino acid 0.67%, プロリン500 mg•l^{-1} ）および甲州果汁培地（pH 3.2, 糖分 20%, プロリン 632 mg•l^{-1}）を用いた。各ワイン酵母株を培地に接種し、20˚Cで3～5週間、発酵させ培地に含まれるグルコース、エタノールおよびプロリン濃度の変化を調べた。プロリンはStocchiら*の方法に従い、HPLCを用いて分析した。

*Stocchi, V. *et al*. (1992) *Amino Acids*, **3**, 303-309.

【結果】P1、P3およびP4株を甲州果汁および合成果汁に接種して発酵させた結果、いずれの株を用いた場合でも培地中のエタノール濃度は7.8～8.9%であり、対照株とほぼ同等の発酵能力を示すことがわかった。一方、発酵終了後のプロリン濃度減少量は合成果汁では、いずれの株を用いても5%程度であり、各株間でプロリン濃度減少量に大きな差は見られなかった。しかし、甲州果汁におけるプロリン濃度の減少量は、対照株、P1およびP3株で5～10%程度の減少しか見られなかったのに対して、P4株を用いた場合は26%減少することがわかった。これらの結果から、低プロリン濃度の甲州ワインを醸造する手段の一つとして、P4株（PUT4遺伝子導入株）を用いた発酵が有効であることが示された。

Wine, yeast, Proline

講演番号：2C20p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ C校舎20会場

ワイン醸造における香気成分生成に関わる酵母の作用に関する解析

Effect of genetic variation of yeast in wine aroma production

○藤村　朱喜、磯貝　宜美、齋藤　優生、方壁　あゆみ、村中　梨紗、妙田　貴生、西澤　信、戸枝　一喜、大山　徹、永島　俊夫、藤森　嶺、中川　純一（東農大・食香）

○ Shuki Fujimura, Yoshimi Isogai, Yuki Saito, Ayumi Houkabe, Risa Muranaka, Takao Myoda, Makoto Nishizawa, Kazuki Toeda, Tohru Ohyama, Toshio Nagashima, Takane Fujimori, Junichi Nakagawa (Dept. Food and Cosmetic Sci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】　ワイン醸造は用いるブドウ原料の特性や微生物の作用、熟成の過程など様々な要因が関わり成り立つ。酵母によるアルコール発酵はワイン醸造に欠かせないが、その他にも芳醇な香りの形成に関わる酵母の作用は重要であると推測される。しかし、多くの香り形成のメカニズムは明らかにされておらず、優良ワイン用酵母の選抜はアルコール発酵能や亜硫酸耐性能、芳香成分の生成能などの代表的な選択基準をもとに行われている。そこで、より詳細な香り形成の仕組みが明らかになれば、ワインの個性化や差別化を可能にするワイン酵母の構築に役立ち、今後のワイン消費の拡大に貢献できると思われる。そこで本研究ではワイン醸造における香気成分生成とそれに関わる酵母の代謝について明らかにすることを目的とし、それらについてエピジェネティクス制御との関連性についても併せて検討する。

【方法と結果】　ワイン香気成分生成に関わる遺伝子群の解析を目指し、*Saccharomyces cerevisiae* BY4742 野性株およびエピジェネティクス関連遺伝子欠損株について、最少培地を用い、アルコール発酵能について解析した。その結果、エピジェネティクス関連欠損株である*Δsir2*、*Δsir3*、*Δsir4*、*Δrpd3*、*Δhda2*、*Δada2*、*Δgcn5* 株は野性株とほぼ同程度のアルコール発酵能を持つことが明らかになった。次に、これらの株およびワイン醸造用乾燥酵母CRU-BLANCについてブドウ果汁による300mLスケールでの発酵試験を行った。発酵開始後1日目でアルコール生成がみられ、発酵が進むに伴って起こる香りの変遷は各株で差異があることが官能レベルで認められた。そこで、現在、すでにエタノール耐性能が高いと報告される*Δsir3*、*Δsir4* 株（Matsuda et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011）および野性株について、発酵終了後の果汁を試料としGC-MS測定による香気成分の分析を行っており、成分ピークに違いがみられるか解析を試みている。また、その他の遺伝子欠損株、ワイン用酵母OC-2株などについても解析を進めており、エピジェネティクス関連遺伝子が香気成分生成に与える影響を中心にワインの香気成分生成やその調節に関わる遺伝子等について明らかにしていく。

Wine aroma, *Saccharomyces cerevisiae*, Epigenetics

講演番号：2C20p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ C校舎20会場

大麦麦芽中のxylanaseの阻害物質について

Characteristics of xylanase inhibitor in barley mait

○縮　彩佳、金内　誠、亀山　眞由美[1]、Charles W.Bamforth [2](宮城大・食産、[1]食総研、[2]UC Davis)
○Ayaka chijimi, Makoto Kanauchi, Mayumi kameyama[1] , Charles W.Bamforth [2] (Miyagidai, [1]NFRI,[2]UC Davis)

【目的】ビール醸造においてβ-glucan や pentosan などの細胞壁由来成分は麦汁の粘度の上昇やビール混濁などの原因となる。一般的にこれら成分は醸造工程中に麦芽酵素によって分解される。ところが大麦や小麦において pentosan 分解酵素の一種である xylanase 阻害物質についての報告がされている。しかしこれまでビール醸造におけるこれら阻害物質についての検討は行われていない。これまで我々は麦芽中の xylanase を精製し、この酵素化学的性質について明らかにした。そこでさらに本研究ではこの xylanase に対する阻害物質の影響について検討することとした。

【方法】麦芽抽出液は大麦(品種 Legary)を 16℃で 7 日間発芽させた。それより緩衝液またはエタノールにより阻害物質の抽出を行った。それを限外ろ過ユニット（Amicon ）にて排除限界分子量 3KDa、30KDa となる様に分画した。乾固後、再溶解したものを阻害活性溶液とした。阻害化性溶液をさらにゲルろ過クロマトグラフィーによって分画した。その後、TLC ガラスプレートを用いて阻害活性物質を単離した。これら阻害物質は、加熱試験及びプロテアーゼやポリフェノール吸着効果を有する polyvinyl polypyrrolidone を用い各種試験を行った。また、各種機器分析をおこなった。

活性測定に用いた精製は同大麦麦芽より硫安沈殿法及びイオン交換クロマトグラフィーによって粗精製したものを用いた。基質は p−Nitrophenyl−β−*D*−xylopyranoside を用い 50℃、60 分反応させ、405nm 吸光度にて活性を測定した。

【結果】阻害物質は水溶性画分に見られた。さらに限外ろ過膜による画分の結果、分子量 3KDa 未満であった。小麦で報告されている TAXI、XIP は分子量 40KDa 程度であり、これらと比較し比較的低分子物質が阻害能を有することが示唆された。また本物質は加熱及びプロテアーゼ処理によっても阻害活性能を維持したことから、タンパク質及びペプチド性ではない新規 xylanase 阻害物質である可能性が示された。またポリフェノール吸着材 PVPP による吸着試験にて阻害活性率が 15%低下した。

FTIR および UV スペクトルを検討した結果、3000、1000cm^{-1} 付近および 200nm 付近に強いピークが検出された。

以上の結果より、マッシング中に失活することがない酵素阻害物質であることが示唆された。

xylanase, inhibitor, malt

講演番号：2C20p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ C校舎20会場

大麦麦芽中のアスコルビン酸ペルオキシダーゼについて

The Characteristics of Ascorbate Peroxidase in Barley Malt

○金内　誠、Bamforth, Charles W.[1)]（宮城大　食産業、[1] UC Davis)
○Makoto Kanauchi, Charles W. Bamforth

【目的】ビール醸造において、酸化は品質に悪影響を及ぼす。その要因の一つとして、ビール原料である麦芽中に存在する酸化酵素、チオールオキシダーゼ やシュウ酸オキシダーゼが挙げられる。チオールオキシダーゼ は、タンパク質中のチオール基を酸化させ、ジスルフィド結合と過酸化水素を生成する。また、これにより、タンパク質は、ろ過性が悪くなる。また、シュウ酸オキシダーゼは、麦芽中に存在するシュウ酸を酸化させる。これら 2 つの酵素はともに過酸化水素も生成し、脂質やポリフェノールを酸化し香気を悪くする、あるいは混濁などを引き起こす。これまで、Kanauchi et al. (J. Inst. Brew. 115(3), 232-237, 2009; J. Am. Soc. Brew. Chem., 2009, 67, 89-94. 2009) は、麦芽中のチオールオキシダーゼやシュウ酸オキシダーゼについて検討した。その結果、大麦の発芽中に生産されたチオールオキシダーゼの酵素化学的性質や、さらに、貯蔵中の活性減少を明らかにした。また、シュウ酸オキシダーゼは至適 pH が 4.0 で、その分子量は 58.5kDa で、糊粉層と幼根において活性が見られた。そこで、本研究では、過酸化水素を消去する酵素のペルオキシダーゼ（主にアスコルビン酸ペルオキシダーゼ）に着目し、この酵素の発芽中の活性の挙動やその酵素の局在、酵素科学的な検討を行った。
【方法】大麦は Metcalfe 2008 年、カナダ産を用いた。これを、1%次亜塩素酸カルシウムで殺菌後、8 時間浸漬後、16 時間エアーレスト、さらに 24 時間浸漬させ、その後、水切りし、16℃で、経時的に採取しながら、7 日間発芽させた。発芽させた大麦はただちに冷凍し、凍結乾燥した。これを粉砕後、2mM EDTA および NaCl を含むリン酸緩衝液（pH 7.0）にて抽出し、粗酵素液とした。アスコルビン酸ペルオキシダーゼは 0.5mM アスコルビン酸－0.2mM 過酸化水素を含むリン酸緩衝液（pH 7.0）に粗酵素液を添加し、A290 にて、その減少量を測定した。1Unit は、1 分間に 1mM のアスコルビン酸を酸化する酵素量とした。
　また、酵素の極在について検討するために、アスコルビン酸と過酸化水素を発芽させた大麦に添加し、室温で 1 時間放置した。分解されずに残存する過酸化水素を Diaminobenzidine(DAB)によって発色させ、酵素の局在を確認した。
【結果】発芽に伴い、3 日目より徐々に活性が上昇し、4 日目では、1.3U/g 麦芽、5 日目では、活性は、12.9U/g 麦芽であった。しかし、6 日目では 12.3 U/g 麦芽、7 日目では 10.4 U/g 麦芽と、徐々に減少していった。また、アスコルビン酸量も同様に５日目で最大となった。本酵素の活性の局在を、DAB によって検討した。幼根や糊粉層では、分解されずに残存している過酸化水素が見られた。しかし、胚乳には過酸化水素が残存しておらず、胚乳のアスコルビン酸ペルオキシダーゼによって分解されたと示唆された。

malt, beer, ascorbate peroxidase

講演番号：2C20p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ C校舎20会場

下面発酵ビール酵母における接合可能株の単離

Isolation of mating competent cells from bottom-fermenting brewer's yeast

○横山　亮[1]、星田　尚司[1]、尾形　智夫[2]、赤田　倫治[1]（[1]山口大・医系・応用分子生命、[2]アサヒビール醸造研）

○Ryo Yokoyama[1], Hisashi Hoshida[1], Tomoo Ogata[2], Rinji Akada[1] ([1]Yamaguchi Univ, [2]Asahi Breweries, LTD)

【目的】下面発酵ビール酵母である*Saccharomyces pastorianus*は*Saccharomyces cerevisiae*（Sc）由来の染色体と、*Saccharomyces bayanus*（Sb）由来の染色体を持つ異型4倍体である。ビール酵母は胞子形成をしにくく、接合による菌株改良がほとんど行われていない。しかし、このビール酵母から胞子形成させた胞子分離体を利用して、交配が可能な接合性株の単離を行った。

【方法】*ura3*変異を持つ胞子分離体とテスター用のSc１倍体を掛け合わせ、交配が可能な株が含まれているかを調べた。接合可能な株の単離では、ビール酵母胞子分離体をYPD培地上に広げ、数秒間UVを照射し、コロニーを形成させた後、研究用Scの*MAT***a**または*MATα*のテスター株をYPD培地に広げ、胞子分離体のコロニーをレプリカした。これを培養した後、最少培地にレプリカした。ビール酵母胞子分離体との交配で互いの栄養要求性が相補された株が最少培地で増殖する。

また、胞子分離体の*MAT*遺伝子周辺のScまたはSb特異的遺伝子の存在をPCRで調べた。

【結果】胞子分離体に接合が可能な株の有無を調べた結果、Scの両テスター株と交配した株が、わずかであるが最少培地で確認された。したがって、交配が可能な*MAT***a**と*MATα*の株が胞子分離体に含まれているということがわかった。そこで、接合可能株の単離を行った結果、*MAT***a**を示す6株を単離することが出来た。しかし、*MATα*を示す株は単離できていない。そこでこの接合可能株の*MAT*座を持つ3番染色体を調べた結果、Sc由来の染色体とSb由来の染色体の両方を持っている株の他に、Sc由来の染色体が欠失している株や、Sb由来の染色体が欠失している株があることがわかった。これにより、下面発酵ビール酵母の胞子分離体は染色体が不安定で欠失しやすい性質を持っているのではないかと考えられる。

bottom-fermenting yeast, mating competent cell, deletion of chromosome

講演番号：2C20p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ C校舎20会場

液胞プロトンポンプ（V-ATPase）関連遺伝子（*DBF2, VMA41, RAV2*）の過剰発現によるエタノール耐性ビール酵母の作製

Construction of ethanol tolerant bottom-fermenting yeasts by overexpression of vacuolar H^+-ATPase-related genes

長谷川園子、○尾形智夫[1]、小川 順[2]、高木博史[3]、島 純（京大・微生、[1]アサヒビール醸造研、[2]京大院農・応用生命、[3]奈良先端大・バイオ）

Sonoko Hasegawa, ○Tomoo Ogata[1], Jun Ogawa[2], Hiroshi Takagi[3], Jun Shima (Kyoudai-bisei, [1]Asahi Breweries, [2]Kyoudai-ouyouseimei, [3]Grad. Sch. Biol. Sci. Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】

ビール高濃度醸造において有用性の高いエタノール耐性ビール酵母を造成することを目的とした。本研究では、pHの恒常性の維持に重要な機能を担い、さらにストレス耐性との関連性が示唆されている液胞プロトンポンプ(V-ATPase)機能関連遺伝子群に着目した。始めに、各種遺伝子過剰発現株を作製し、エタノール耐性株を選抜した。続いて、選抜した菌株について発酵特性を評価し、初発糖濃度が15%以上に及ぶビール高濃度醸造過程におけるストレス耐性株を樹立した。

【方法】

1)ビール酵母の胞子分離体(二倍体)を親株として、ゲノム上の標的遺伝子上流のプロモーター置換により、V-ATPase関連遺伝子群について各遺伝子の過剰発現株を作製した。

2)1)で作製した菌株に対して、スポット試験を実施し、エタノール耐性を評価した。

3)2) でエタノール耐性の認められた遺伝子過剰発現株において、実用に即したビール発酵試験を実施し、発酵特性を解析した。さらに、最も高い発酵能を示した菌株については、生菌率およびエタノール産生量を測定した。

【結果】

スポット試験によりストレス耐性を調べた結果、*DBF2, VMA41, RAV2*の各遺伝子過剰発現株では親株（野生型株）に比べ、エタノール耐性の向上が認められた。続いて、実用に即したビール発酵試験を実施したところ、各菌株とも親株に比べ、発酵能が有意に向上することが判明した。さらに、最も高い発酵能を示した*DBF2*過剰発現株については、親株に比べ、発酵過程におけるエタノール産生量が有意に増加し、発酵後の生菌率もおよそ20%上昇することが明らかとなった。

以上の結果より、*DBF2 VMA41, RAV2*の各遺伝子過剰発現株は、実際のビール高濃度醸造にも耐えうる高度なエタノール耐性という有用形質を新たに獲得したことが示唆された。

（本研究は、生研センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業の一環である）。

ethanol tolerance , high gravity fermentation, V-ATPase

講演番号：2C20p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎20会場

タイトル　沖縄県由来黒麹菌の単離と諸性質の検討

Title　Identification and characterization of Black-koji molds from Okinawa

坂元理奈、金城悠希菜、○渡邉泰祐、外山博英（琉球大農・亜熱生資）

Rina Sakamoto, Yukina Kinjo, ○Taisuke Watanabe, Hirohide Toyama

(Dept. of Biosci. and Biotechnol., Univ. of Ryukyus)

【目的】蒸留酒は世界中に広く存在するが、黒麹菌を用いた蒸留酒は泡盛を含む我が国の焼酎類のみである。蒸留技術については、タイもしくは中国から琉球王国に伝わったと考えられているが、黒麹菌を用いた醸造技術のルーツは明らかではない。本研究では沖縄県由来の黒麹菌のスクリーニングを行い、単離された黒麹菌の諸性質を現在泡盛醸造に使用されている黒麹菌と比較することによって、泡盛黒麹菌が沖縄由来であるか明らかにすることができると考えている。沖縄県内の土壌から黒麹菌をスクリーニングした結果を報告する。

【方法】沖縄県由来の種々の土壌・稲藁のサンプルから、ポテトデキストロース培地に0.25% TritonX-100を添加した寒天培地で30°C, 48-72 hr培養後、黒色分生子を形成したコロニーを黒麹菌候補株として単離した。さらに上記培地に0.5% 不溶性小麦デンプンを添加した寒天培地上でハロを形成したコロニーをアミラーゼ生産黒麹菌候補株として選抜した。その後、選抜したアミラーゼ生産黒麹菌候補株をMyco-Perm Blue（（株）スギヤマゲン）で染色・固定し、分生子頭構造について形態学的観察を行った。

【結果】計 82 の土壌・稲藁サンプルから 337 株の黒麹菌候補株を得ることができた。また、ハロアッセイによって、この中からアミラーゼ活性を有する黒麹菌候補株を 122 株選抜した。沖縄県の自然環境中には、アミラーゼ活性を有する黒麹菌が多数存在している可能性が示された。また、選抜された 122 株の形態学的観察を行った結果、2 段階梗子を有する株が 107 株見出された。黒麹菌は 2 段階梗子を有することが報告されていることから [1]、これら 107 株は形態学的見地からみて黒麹菌であることが示された。現在、これら候補株について、オクラトキシン生合成遺伝子の有無、液体培地に対する生酸性測定から各黒麹菌候補株の分類を進めている。

【参考文献】(1) Yamada *et al. J Biosci Bioeng*. **112** (3) 233-7 (2011)

Keyword1 Awamori, Keyword2 *Aspergillus awamori*, Keyword3 Okinawa

講演番号：2C20p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎20会場

宮古島単離酵母MY17株による泡盛醸造の検討

Awamori brewing with MY17 strain that was isolated from bagasse in Miyakojima Island

○ 京極 理人[1,2]、藤井 力[1,2]、川本 佑太[1,2]、韓 錦順[2]、金井 宗良[2]、吉田 聡子[2]、福田 央[2]、山田 修[2]、砂川 拓也[3]、古波蔵 春海[4]、喜世盛 正春[4]、奥島 憲二[4]、家藤 治幸[1,2]
[1]広大院・生物圏、[2]酒総研、[3]多良川、[4]りゅうせき

○ Masato Kyogoku[1,2], Tsutomu Fujii[1,2], Yuta Kawamoto[1,2], Jinshun Han[2], Muneyoshi Kanai[2], Satoko Yoshida[2], Hisashi Fukuda[2], Osamu Yamada[2], Takuya Sunagawa[3], Harumi Kohagura[4], Masaharu Kisemori[4], Kenji Okushima[4], Haruyuki Iefuji[1,2]
[1]Grad. Sch. Biosph. Sci. Hiroshima Univ, [2]Natl. Res. Inst. Brewing, [3]TARAGAWA CORP, [4]RYUSEKI CORP

【目的】現在宮古島では、基幹産業であるサトウキビ総合利用として糖蜜を利用した燃料用バイオエタノール生産を含む地産地消型で持続可能な環境循環システムを構築するプロジェクトが行われている。我々は亜熱帯気候の宮古島からバイオエタノール生産に適した発酵性能を持つ酵母をスクリーニングし MY17 株を単離した。一方で宮古島では泡盛製造が盛んに行われている。今回、単離株である MY17 株を泡盛製造に利用可能か検討を行ったので報告する。
【方法・結果】宮古島で単離した酵母 MY17 株を用いて、黒麹菌の乾燥麹を用いた総米 360g、汲水歩合 150%換算の小仕込み試験を行った。もろみの水蒸気蒸留により得られた試料は、対照の AW101 株を用いた小仕込みの試料とは明らかに異なる酒質であった。香気成分分析を行ったところ、泡盛古酒の特徴香であるバリニンの前駆体である 4-ビニルグアイアコールを 1840ppm と AW101 株の場合の約 6 倍生産することが分かった。また、汲水歩合 170%の試験では、AW101 株と比較の仕込みして炭酸ガス減量が低いものの、汲水歩合をのばしたところ AW101 株仕込みとほぼ同程度の炭酸ガス減量となった。実製造規模で泡盛の醸造試験を行った。汲水歩合 170%では小仕込み試験同様、対照の AW101 株を用いた仕込みに比べ、アルコール収得量は低かった。香気成分等について分析中である。

4-vinylguaiacol, Awamori, Miyakojima

講演番号：2C20p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎20会場

「The YEASTS 5th」における清酒酵母の分類学的位置

The taxonomic position of sake yeast in The YEASTS 5th

○門倉　利守、国分　萌里、矢島　優子、中山　俊一、中里　厚実（東農大応生科・醸造）
○Toshimori Kadokura, Moeri Kokubu, Yuko Yajima, Shunichi Nakayama, Atsumi Nakazato (Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】2011年The Yeasts, a Taxonomic Study 5th Editionが発刊された。5th Edit.では遺伝子の系統解析により種の分類が行われ、4th Edit.での　*Saccharomyces*属は*Saccharomyces sensu stricto*だけが*Saccharomyces*属に残り、*Saccharomyces sensu lato*は*Kazachstania*属などの他属に移されて、*Saccharomyces*属は近縁の8種2変種となった。1952年に1st Edit.が発刊されて以来、清酒酵母*S. sake*は*S. cerevisiae*のsynonymで同種とされ、4th Edit.からは試験株としても使われなくなったが、清酒酵母は5th Edit.においても*S. cerevisiae*の同種とされている。しかし、種を同定するkey to speciesでは4th Edit.同様にビタミン欠培地での増殖により、清酒酵母は*S. bayanus*に同定されるなどの矛盾を生じている。これまで演者らは生態学、生理学、分子生物学的な独自の指標により、*S. cerevisiae*とは異なる清酒酵母の独自性を提唱し、2007年度の本大会ではそれらに関連した遺伝子による系統解析により*S. cerevisiae*と区別できることを報告した。また、Akaoら[1)] 酒総研、NITEのグループは清酒酵母協会7号のゲノム解析を行い、*S. cerevisiae*の実験室株とゲノムの相同性が約5%異なることを報告している。さらに、The Yeasts4th Edit.では*cerevisae*と*bayanus*の雑種として*pastorianus*が認められ、5th Edit.では*bayanus*の変種としてvar. *bayanus*とvar. *uvarum*が認められたことで、清酒酵母の分類学的位置を検討することには十分な意義がある。そこで本報告では、The Yeasts, 5th Edit.の分類・同定指標に従って清酒酵母*S. sake*の分類学的位置を検討した。

【方法】清酒酵母として協会株、IFO(NBRC)株、ATCC株を用い、The Yeasts, 5th Edit.の分類指標であるrDNA、mtDNA関連の遺伝子による系統解析と、同定指標であるkey to speciesの生理学的試験を行い清酒酵母の分類学的位置について考察した。また、演者らの独自の指標により清酒酵母に近縁な酵母についても検討した。

【結果】種の分類に用いられる26SのD1/D2領域とITSによって、清酒酵母は*S. cerevisiae*など他の*Saccharomyces*属と区別が可能であった。また、*Saccharomyces*属の種の同定に用いられるkey to speciesではビタミン欠培地での増殖が認められ*S. bayanus*、あるいは新種の*S. arboricolus*となるが、次試験のglycerol資化性は清酒酵母間で異なり、maltose発酵性はpositiveであった。また、全酵母のkey to speciesでは、ビタミン欠培地の次試験のmelezitose資化性において清酒酵母間で異なることから、2種の中間に位置することも考えられる。また、この指標の近隣にはかつての*S. delbrueckii*が存在する*Torulaspora*属があり、演者らの独自の指標においても*Torulaspora*属は清酒酵母と同じ性質が多く、関連性が伺われた。その他は検討中である。

1) T. Akao, et.al., DNA Res., 18, 423(2011).

sake yeast, *Saccharomyces*, taxonomy

講演番号：2C20p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ C校舎20会場

カメルーン熱帯地域における酒造好適酵母の探索と同定

Isolation and identification of high-quality yeasts for brewing in Cameroon

○太田 圭介[1,2]、久保 亮介[2,3]、井澤 真吾[2,4]、荒木 茂[1,2]、北畠 直文[1,2,5]（[1]京大・アジセ、[2]JST-JICA・SATREPS、[3]京大院・地球環境、[4]京工繊大院・応生、[5]ノートルダム清心女大・食品栄養）

○Keisuke Ohta[1,2], Ryosuke Kubo[2,3], Shingo Izawa[2,4], Shigeru Araki[1,2], Naofumi Kitabatake[1,2,5] ([1]CAAS, Kyoto Univ., [2]JST-JICA, SATREPS, [3]GSGES, Kyoto Univ., [4]Div. Appl. Biol., Kyoto Inst. Technol., [5]Dep. Foods and Human Nutrition, Notre Dame Seishin Univ.)

【目的】カメルーン東部の熱帯地域アンドン村では、ヤシあるいはキャッサバを原料とした酒造が行われている。その生産形態は非集約的であり、地元住民は伝統的・習慣的な方法で酒造を行っているため、その生産性は極めて低い。酒造効率化のためには、優良酵母株の単離とその活用が大いに役立つと考えられる。そこで本研究では、アンドン村からの酒造好適酵母の単離・同定を目的として解析をおこなった。

【方法】アンドン村内の酒造場などから多数のサンプルを採取し、酵母集積培地（最終濃度2%グルコース 1%ペプトン 5%エタノール 1%乳酸 0.1%プロピオン酸ナトリウム）を用いて28°Cで2日間振とう培養をおこなった。その後、YPDプレート培地でのシングルコロニーアイソレーションと顕微鏡観察を通じて複数の酵母株を単離した。各酵母株について、高浸透圧・エタノール・酸・熱などのストレスに対する感受性とアルコール発酵能を検討し、ワイン酵母や清酒酵母との比較を通じて酒類醸造やバイオエタノール製造に適した優良酵母株を選抜した。優良株については種の同定をおこなった。

【結果】採取した菌のなかから、ワイン酵母EC1118株や清酒酵母協会７号株と同等あるいはそれ以上の性質を持つ優良酵母を複数単離することに成功した。そのうちの一つyJC003株は、ITS領域塩基配列解析および系統解析の結果、*Saccharomyces cerevisiae*であることが明らかとなった。現在、キラー活性や皮膜形成能の有無などについて検討中である。

本研究は、JST-JICA地球規模課題対応国際科学技術協力事業(SATREPS)カメルーン森林-サバンナ持続性プロジェクトの一環として行われたものである。

Keywords: Cameroon, yeast, brewing

講演番号：2C20p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎20会場

タイトル　清酒酵母における葉酸高蓄積条件の検討

Title　Examination of high accumulation condition of folate in sake yeast

○金井宗良[1]、塚本香[1]、藤井力[1,2]、山田修[1]、浜田健一[3]、糟谷健二[3]、神前健[3]、福田央[1]、家藤治幸[1]（[1]酒総研、[2]広大院・生物圏、[3]オリエンタル酵母工業(株)）

○Muneyoshi Kanai[1], Kaori Tsukamoto[1], Tsutomu Fujii[1,2], Osamu Yamada[1], Kenichi Hamada[3], Kenji Kasuya[3], Ken Kanzaki[3], Hisashi Fukuda[1], Haruyuki Iefuji[1]（[1]Nat. Res. Inst. Brewing, [2]Grad. Sch. Biosph. Sci. Hiroshima Univ., [3]Oriental Yeast Co., ltd.）

【目的】我々はこれまでに、清酒酵母が人にとって重要な栄養機能性物質を多く含有する能力が高いことを示してきた。そのような物質の中でも、葉酸は一炭素代謝反応に重要な水溶性ビタミンで、近年様々な疾病に対して予防・治癒効果が明らかとなり、栄養機能食品として注目が高まっている。そこで、清酒酵母の葉酸（テトラヒドロ葉酸（THF）及び5-CH_3-THF）蓄積能を更に高めるため、清酒酵母における葉酸高蓄積培地の検討を行った。

【方法】YNB培地を基に、様々なアミノ酸、ビタミン等を添加した培地を用いて、清酒酵母協会9号を30℃にて振とう培養し、葉酸量をHPLCにて経時的に測定した。

【結果】培地に、葉酸生合成経路に関与している様々なアミノ酸を添加して清酒酵母を培養した結果、主にTHF、5-CH_3-THFのみがそれぞれ増加するアミノ酸が存在することが分かった。また、葉酸の構成成分であるパラアミノ安息香酸、葉酸代謝経路に重要な役割を果たしているビタミン類を単独で培地に添加しても、清酒酵母の葉酸量及び蓄積挙動に顕著な変化は見られなかった。一方、各種アミノ酸とビタミン類を同時に培地に添加したところ、葉酸量に相乗的な増加効果が観察された。

folate、sake yeast、amino acid

講演番号:2C20p13
講演日時、会場:3月23日16:21～ C校舎20会場

D-アスパラギン酸高含有日本酒の醸造工程におけるD-アミノ酸の定量的解析と生成機構の解明

Quanititative analysis of D-amino acids in fermentative process of high amount of D-aspartate-conaining sake

○斉藤 瑠実、岡田 かおり、郷上 佳孝、重藤 憲史[1]、老川 典夫（関大・化学生命工、[1]若戎酒造）
○Rumi Saito, Kaori Okada, Yoshitaka Gogami, Kenji Shigefuji[1], Tadao Oikawa (Kansai Univ, [1] Wakaebisu shuzou)

【目的】先にわれわれは日本酒中にはさまざまなD-アミノ酸が存在していることを明らかにした。本研究では、D-アスパラギン酸高含有日本酒の醸造工程におけるD-アミノ酸の定量的解析と微生物の単離と同定を行い、その生成機構を解明することを目的としている。
【方法】試料には、製品中のD-アスパラギン酸濃度の高い若戎酒造の真秀の仕込水、原料米(玄米)、原料米(白米)、酛麹（出麹後)、酛掛米（枯らし後）と酛、掛麹、醪（踊)、醪、原酒の各工程でサンプリングした液体及び固体画分中のD-及びL-アミノ酸含有量を定量した。D-及びL-アミノ酸の定量分析はキラル誘導体化法を用いたHPLC 法で実施した。また各試料をMRS寒天培地、ツァペック寒天培地、*Bacillus*寒天培地に塗布後25℃で培養し微生物を単離した。得られた微生物をそれぞれ同液体培地で25℃、24時間振盪培養後、各菌体からゲノムを抽出し決定した16SrDNAの配列に基づき単離微生物の同定を行った。また単離微生物のD-アミノ酸生産能を検討した。
【結果】原料米、酛麹、酛掛米、掛麹には、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-アラニン、D-セリン、D-バリン、D-アラニン、D-ヒスチジンが含まれていることが明らかとなった。原料米中のD-アミノ酸の濃度は全て1 μM以下であり、日本酒製品中のD-アミノ酸にはほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。また試料中のD-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-アラニン、D-セリン、D-チロシン、D-バリン、D-ロイシン、D-イソロイシン、D-フェニルアラニン、D-アルギニン、D-ヒスチジン、D-リシン、D-グルタミン、D-プロリン濃度はそれぞれ酛25日目、酛25日目、酛25日目、酛6日目、酛38日目、酛15日目、醪9日目、醪20日目、醪20日目、酛6日目、原酒、酛25日目、酛4日目、醪23日目に最大となった。このことから、各醸造工程により生産されるD-アミノ酸の種類が異なることが明らかとなった。さらに酛（4日目）以降には、*Leuconostoc citreum, Lactobacillus sakei, Lactobacillus paracasei, Leuconostoc* sp., *Lactobacillus casei*などの乳酸菌及び*Acetobacter* sp.などの酢酸菌が存在することが明らかとなった。単離微生物のD-アミノ酸生産能を検討したところ、D-アスパラギン酸濃度が最も高い酛（25日目）から単離した*Lactobacillus casei* M10-8が最も多量にD-アスパラギン酸を生産することが明らかとなり、本菌が製品中のD-アスパラギン酸の濃度の増加に関与していることが明らかとなった。
なお、本研究はイノベーション創出基礎的研究推進事業により実施したものである。

D-amino acid, sake, lactic acid bacteria

講演番号：2C20p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎20会場

清酒酵母と実験室酵母の交配によるS-アデノシルメチオニン及び葉酸蓄積能の解析

Analysis of accumulation of S-adenosylmethionine and folate by interbreeding between sake and laboratory yeast strains

○河田知子[1,2]、金井宗良[2]、藤井力[1,2]、山田修[2]、渡辺大輔[2]、赤尾健[2]、下飯仁[2]、家藤治幸[1,2]（1広大院・生物圏、2酒総研）

○Tomoko Kawata[1,2], Muneyoshi Kanai[2], Tsutomu Fujii[1,2], Osamu Yamada[2], Daisuke Watanabe[2], Takeshi Akao[2], Hitoshi Shimoi[2], Haruyuki Iefuji[1,2] ([1]Grad. Sch. Biosph. Hiroshima Univ, [2]Natl. Res. Inst. Brewing)

【目的】清酒酵母は、機能性成分であるS-アデノシルメチオニン（SAM）及び葉酸を高蓄積することが知られているが、その高蓄積機構は明らかになっていない。SAMや葉酸の蓄積といった量的形質の多くは複数の遺伝子によって支配されていると考えられることから、我々は、これら機能性物質を高含有する酵母の育種を目指し、塩基配列の多型アレルと形質（ここではSAM, 葉酸蓄積能）との連鎖解析を行う遺伝統計学的手法QTL（量的形質遺伝子座）解析を利用し、高蓄積に寄与している遺伝子群についてゲノムワイドに解析を行った。

【方法】実験室酵母一倍体X2180-1Bと清酒酵母一倍体K7H868aをかけ合わせて出来た交雑株25株から得られた四分子90株について、YPD培地を用いて30℃で振とう培養を行いSAM、葉酸それぞれの蓄積量を測定し、DNAマーカーとの連鎖解析を行うことで、SAMや葉酸の高蓄積に寄与するQTLの同定を行った。

【結果】SAM, 葉酸の高蓄積に寄与するQTLを同定するため、実験室酵母と清酒酵母におけるSAM, 葉酸の経時的挙動を調べ、SAM, 葉酸量に最も差が生じる培養条件を検討した結果、SAMに関しては本培養4時間（実験室酵母：0.52 mg/gDCW, 清酒酵母：5.1 mg/g DCW)、葉酸に関しては本培養12時間（実験室酵母：60.52μg/gDCW, 清酒酵母：119.3μg/gDCW）で蓄積量に最も差が生じた。そこで、四分子90株について、SAMに関しては4時間、葉酸に関しては12時間培養を行い、SAM, 葉酸をそれぞれ測定した結果、SAM, 葉酸ともに個々の株で大きな変動が見られ、連続的な分布を示した。また、実験室酵母一倍体と清酒酵母一倍体をかけ合わせることで、清酒酵母一倍体よりもSAM, 葉酸を多く生産する株がいくつか得られた。得られた結果を基にQTL解析を行った結果、SAMに関しては第8番染色体にQTLの存在が示唆され、清酒酵母型アレルで相加効果を示した。一方、葉酸に関しては第16番染色体にQTLの存在が示唆され、実験室酵母型アレルで相加効果を示した。

S-adenosylmethionine, folate, qtl

講演番号：2C20p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ C校舎20会場

清酒もろみ由来の酵母内容物が老香の主成分Dimethyl trisulfide生成に与える影響

Effect of sake yeast extract addition on production of Dimethyl trisulfide, that is the main contributor to *hineka* flavor

○沖森　祐太[1,2]、西堀　奈穂子[2]、藤井　力[1,2]、佐々木　慧[1,2]、金井　宗良[2]、磯谷　敦子[2]、神田　涼子[2]、後藤　奈美[1,2]、山田　修[2]（[1]広大院・生物圏、[2]酒総研）

○Yuta Okimori[1,2], Nahoko Nishibori[2], Tsutomu Fujii[1,2], Kei Sasaki[1,2], Muneyoshi Kanai[2], Atsuko Isogai[2], Ryoko Kanda[2], Nami Goto-Yamamoto[1,2], Osamu Yamada[2]（[1]Grad. Sch. Biosph. Sci. Hiroshima Univ., [2]Natl. Res. Inst. Brewing）

【背景】DMTS（**D**i**m**ethyl **t**ri**s**ulfide）は清酒の老香（熟成香ではなく、比較的短期間の貯蔵で生じる劣化臭）の主成分である。DMTS 生成を抑制できれば、国内外の消費者に老香のしない清酒を提供することができるとともに、貯蔵や流通における冷蔵コストが削減できると見込まれる。我々は、製造過程での DMTS 生成に与える要因を探索し、醸造中の酵母内容物の漏出が DMTS 生成を促進することを示唆する結果を得たので報告する。
【方法】もろみ由来の酵母を破砕・抽出した内容物を製成酒に添加し、DMTS生成ポテンシャル（70℃、1週間で生成されるDMTS濃度：老香の出やすさの指標）に与える影響を調べた。
【結果】酵母内容物を添加すると、DMTS 生成ポテンシャルは添加量や添加後 15℃での保存期間に依存して増大した。一方、煮沸した酵母内容物を添加した場合には、DMTS 生成ポテンシャルが増大しなかったことから酵母内容物に含まれる酵素が DMTS 生成ポテンシャルの増大に寄与する可能性が示唆された。また、酵母内容物を 20%エタノールの含む緩衝液（pH 4.2）に添加しても DMTS 生成ポテンシャルの増大は小さかったため、酵素反応の基質は製成酒中に含まれることが推測された。加えて、酵母を取得するもろみの時期を検討したところ、もろみ後期の
酵母由来の内容物ほどDMTS生成ポテンシャル増大効果が高いことも分かった。

yeast, sake, Dimethyl trisulfide

講演番号：2C20p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ C校舎20会場

低グルテリン米清酒の特異香

Characteristic odor of sake made from low-glutelin rice

○古川 幸子、磯谷 敦子[1]、須藤 茂俊[1]、松丸 克己[1]、若井 芳則（黄桜㈱、[1]酒類研）
○Sachiko Furukawa, Atsuko Isogai[1], Shigetoshi Sudo[1], Katsumi Matsumaru[1], Yoshinori Wakai (Kizakura, [1]NRIB)

【目的】タンパク質変異米の一種である低グルテリン米を掛米に用いた清酒は、アミノ酸度が低くすっきり爽やかな香味が特長であるが、一方で従来の清酒と異なる特有の香りも指摘されてきた。本研究は、この低グルテリン米清酒の特異香について原因物質を同定し、その形成機構を解明することを目的とする。

【方法と結果】低グルテリン米品種「みずほのか」を掛米とした総米1.2kgの清酒醸造試験により得た上槽酒から、Twister（Gerstel社製）を用いて香気成分を抽出し、においかぎGC(GC-O)分析を行った。低グルテリン米清酒の特異香に近いにおいはRetention time (RT)14min付近で検知された。GC-MS分析において、このにおいゾーンのマススペクトルは得られなかったが、リテンションインデックスとにおいの特徴から、チオールの4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP)と予測された。また、4MMP標品のRTとにおいの特徴も、特異香のにおいゾーンとほぼ一致した。そこで、Tominagaらの方法[*1]を参考に低グルテリン米清酒からチオールを選択的に抽出し、GC-OおよびGC-MS分析を行った。その結果、上記のRTに、特異香に近いにおいとともに、4MMPに特徴的なイオン（m/z 132、89、99）のピークが検出された。これらの結果から、低グルテリン米清酒には4MMPが含まれ、これが特異香に寄与する成分であると推定された。

次に「みずほのか」と対照品種「吟おうみ」を掛米とした総米150kgの清酒醸造試験を行い、4MMPの経時変化を比較した。その結果、以下のことが明らかとなった。

（１）4MMPは、みずほのかにも吟おうみにも、もろみ初期から存在するが、その量は発酵に伴い増加する。

（２）みずほのかのもろみ中の4MMPは、もろみ期間を通して吟おうみよりも終始多く存在し、上槽酒では、その量は2倍程度（みずほのか7.7ng/L、吟おうみ3.7ng/L）の差となった。

また、酒類総合研究所職員17名のパネルにより、清酒に添加した4MMPの閾値を求めたところ、検知閾値は1.2ng/Lであった。

4MMPは、ソーヴィニオンブランワインの特長香成分として知られ、猫尿臭、ツゲ、エニシダ、カシスの芽などと表現されるグリーン感のある清涼で爽やかな香りである。一方、清酒においてその存在および香りへの関与が報告されるのは、今回が初めてとなる。現在、この4MMPを主体とする香りの生成機構を解明する検討を行っているところである。

１）Tominaga, T. / Dubourdieu, D. (2006) J. Agric. Food Chem. 54, 29-33.

low-glutelin rice, 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, thiol

講演番号:2C20p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ C校舎20会場

ガスクロマトグラフィを用いた有機酸分析方法の開発

Analysis of organic acids in sake by gas chromatography

○高阪 千尋、廣岡 青央、山本 佳宏、市原 謙一[1]（京都市産技研、[1]京府大院・生命環境科学）
○Chihiro Kohsaka, Kiyoo Hirooka, Yoshihiro Yamamoto, Kenichi Ichihara[1] (KITC, [1]KPU)

【目的】

清酒に含まれる有機酸は、通常、リンゴ酸、乳酸、コハク酸が大部分を占めている。一般的に行われている分析方法としては、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）による一斉分析法や酵素による個別定量法が主流である。HPLC による分析法は分離や検出感度、前処理にコストがかかる点などに問題があり、また、酵素法は検体中の有機酸を一斉に分析するには適さない。

上記の問題点を改善し、検体中の有機酸を一斉に分析できる方法として、ガスクロマトグラフィ（GC）の利用を考えた。ただし、有機酸のような不揮発性物質を分析する場合は、揮発性誘導体に変換する必要がある。そこで、GCを用いて簡便、迅速に多種類の有機酸を定量できる分析方法の検討を行った。

【方法】

不揮発性物質をGCで分析可能な揮発性物質に変換するため、以下の誘導体化を行った。10 ml ねじ口試験管に0.5%(w/v)の有機酸溶液25 μlを採取し凍結乾燥したのち、塩酸／アルコール溶液1 mlを加え100℃で1時間加熱した。冷却後、t-ブチルメチルエーテル1 mlと内部標準、蒸留水1 mlを加え混和し、得られたエーテル層をGCにより分析した。

【結果】

誘導体化試薬として種々の塩酸／アルコール溶液を検討した。作製した誘導体の回収率が安定し、かつ分析時間の短かった塩酸／アルコール溶液を用いて誘導体化を行うことで、7種類の有機酸（ピルビン酸、乳酸、フマル酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸）の定量が可能になった。

今回の検討の結果、本法は酵素法と異なり一斉分析が可能であること、また、HPLCと比較して簡便な前処理で分離能が高いことが明らかになった。本法を簡便な一斉分析法として利用していくため、今後、より多くの有機酸を分析できるよう検討を進める予定である。

Organic acid, gas chromatography, sake

講演番号：2C20p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ C校舎20会場

酵素法による清酒のカプロン酸エチル簡易推定法

Estimation of Ethyl Caproate in Sake by Enzymatic Method

○栗林 喬、金桶 光起、平田 大[1]、渡邊 健一（新潟県醸造試験場、[1]広島大・先端研）
○ Takashi Kuribayashi, Mitsuoki Kaneoke, Dai Hirata[1], Ken-ichi Watanabe (Niigata Prefectural Sake Research Institute, [1]AdSM, Hiroshima Univ.)

【目的】カプロン酸エチルは、清酒の主要な香気成分で、その前駆体は、中鎖脂肪酸のカプロン酸である。実際、清酒中の両者の含有量には高い相関関係がある。通常、これらの成分は、ガスクロマトグラフ（GC）法によって測定されているが、装置が高価で、しかも分析操作が煩雑であることから、多くの清酒製造場では日常的な分析法とすることが難しい。一方、酵素（アシル-CoAシンテターゼ及びアシル-CoAオキシダーゼ）を用いた遊離脂肪酸の定量法（酵素法）は、GC法より簡便で、血液や食品等の脂肪酸分析に広く使用されているが、アルコール飲料への使用実績は少ない。そこで、本研究では、GC法と酵素法、両者により清酒中の遊離脂肪酸を分析し、その結果をもとに、酵素法による清酒中のカプロン酸エチル濃度の簡易推定法の確立を目指した。
【方法】分析試料：2010年～2011年に新潟県内の酒造場において、カプロン酸エチル高生産性酵母により製造された吟醸酒28点（精米歩合：40-53%）を用いた。分析方法：清酒中の炭素数6から18までの遊離脂肪酸を有機溶媒と固相抽出カラムにより精製し、GC法により分析した。また、酵素法による炭素数6以上の全遊離脂肪酸濃度をNEFA C-テストワコー（和光純薬工業）を用いて測定した。清酒中のカプロン酸エチル濃度をヘッドスペースガスクロマトグラフ（HSGC）法により測定した。
【結果】試料清酒中の遊離脂肪酸組成をGC法により分析した結果、カプロン酸(C6:0)とカプリル酸(C8:0)が主要な遊離脂肪酸であり、全遊離脂肪酸濃度がこれら二つの脂肪酸濃度の和に近似することが示唆された。実際、酵素法により測定した全遊離脂肪酸濃度は、GC法で測定したカプロン酸およびカプリル酸の和にほぼ一致した。さらに、酵素法による全遊離脂肪酸濃度は、HSGC法によるカプロン酸エチル濃度と、高い相関性を示した。なお、酵素法による脂肪酸濃度の測定は、通常の清酒成分（アルコール、pH、有機酸等）では、影響を受けないことを確認した。以上より、酵素法による試料清酒中の全遊離脂肪酸濃度の測定は、カプロン酸エチル濃度の簡易推定法として有効であり、さらに、カプロン酸エチル高生産性酵母の育種等、多方面に利用可能であることが示唆された。今後、本法を用いて、酒母や醪等の清酒製造工程での遊離脂肪酸とカプロン酸エチルの挙動を解析し、さらに、本法が、一般的な清酒酵母（カプロン酸エチル低生産性）により製造された清酒にも利用可能かどうかを検討する予定である。

sake, caproic acid, ethyl caproate

講演番号：2C20p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ C校舎20会場

GC-FID 直接注入法による酒類の中鎖脂肪酸とヘキサン酸エチルの同時定量方法

Simple method for the simultaneous quantification of medium-chain fatty acids and ethyl hexanoate in alcoholic beverages by gas chromatography-flame ionization detector: Development of a direct injection method

○髙橋　圭、後藤　奈美　（酒類研）
○Kei Takahashi, Nami Goto-Yamamoto (NRIB)

【目的】　清酒に含まれる吟醸香は発酵中に酵母が生産するヘキサン酸エチル等のエステル類である。エステルの前駆体であるヘキサン酸などの中鎖脂肪酸は、油様香や劣化臭をもたらすためにエステル／脂肪酸比を高く保つことが品質保持の観点から重要であると考えられている。中鎖脂肪酸の分析方法はこれまでにいくつか提案されているが、前処理工程が煩雑であることや高価な機器が必要であるなどの理由から精度や汎用性に問題があった。そこで、中鎖脂肪酸の精確で簡便な定量分析法を確立することを目的とした。
【方法および結果】　清酒には中鎖脂肪酸がサブ ppm 濃度以上含まれていることが想定されたことから、水素炎イオン化検出器を接続したガスクロマトグラフィー（GC–FID）による直接注入法の開発を試みた。清酒に対して、プロトン性有機溶媒（2-propanol）を一定の割合で添加し一部の高分子成分を除去したあと、ニトロテレフタル酸修飾ポリエチレングリコール(FFAP)カラムを使用したスプリットレス分析を行なった。プロトン性有機溶媒と水の２つの溶媒効果により、低沸点成分であるヘキサン酸エチルと高沸点成分である中鎖脂肪酸を再現性よく分離・検出することができた。さらに、前処理と分析条件の最適化を行ない、中鎖脂肪酸とそのエステルを同時に定量できるようにした。清酒を含む酒類のエチルエステル、高級アルコール、中鎖脂肪酸が高い精度で定量できることが明らかとなった。これらの定量値を用いて吟醸酒の品質管理の指標を提唱した。加えて、鑑評会出品酒の中鎖脂肪酸量の解析を行ない、中鎖脂肪酸濃度と品質に一定の関連性がある可能性を見出した。
Takahashi, K., et al. J. Chromatogr. A, 28, 1218, 7850-6 (2011)

Keywords, Japanese sake, medium-chain fatty acid, gas chromatography

講演番号：2C20p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ C校舎20会場

ゲノム構造多型に基づく清酒酵母の醸造特性関連遺伝子の解析

Analysis of brewing characteristics-related genes of sake yeast based on genome polymorphism

○岩田華苗[1,2]、赤尾健[1]、渡辺大輔[1]、下飯仁[1,2]（[1]酒総研、[2]広島大院・先端研）

○Kanae Iwata[1,2], Takeshi Akao[1,] Daisuke Watanabe[1], Hitoshi Shimoi[1,2] ([1] Natl. Res. Inst. Brewing, [2] Hiroshima Univ.)

【目的】清酒酵母は、高い発酵能や清酒らしい香味成分の生成などに特徴があるが、これらの遺伝的背景の多くは未解明のままである。これまでに、清酒酵母きょうかい 7 号（K7）と実験室酵母 S288C の比較ゲノム解析から、どちらか一方だけに存在する遺伝子約 100 個、オルソログ間で ORF 構造の多型（分断、末端不一致など）が見られるもの約 200 組が見出されている。本研究では、このような K7 と S288C 間で差のある遺伝子から、清酒酵母の醸造特性に影響を与えるものをスクリーニングし、影響について網羅的に検討し、これを通じて清酒酵母に特徴的な各種醸造特性の原因となる遺伝子を明らかにすることを目的とする。

【方法と結果】K7の欠失遺伝子11個について、実験室酵母二倍体での遺伝子破壊株を用いて清酒小仕込み試験を行った。その結果、親株と比較して、Δ*yfr057w*と*Δppt1*では発酵力およびアルコール濃度、日本酒度、香気成分濃度の値が上昇していた。Δ*ygl262w*では発酵力に若干の上昇が見られた。また両株ともにアミノ酸度が低下していた。現在、ORFの多型が見られる遺伝子についても、同様の解析を行っている。

[Keyword: sake yeast, comparative genomics, brewing characteristics]

講演番号:2C21a01
講演日時、会場:3月23日09:00～ C校舎21会場

ビーズディスプレイ法とクラスIリガーゼ・リボザイムを用いたハイスループットなin vitroプロモータースクリーニング法の確立

In vitro high-throughput promoter screening using a bead display and a class I ligase ribozyme

○伊藤 祐里恵、兒島 孝明、大内 将司[1]、中野 秀雄 (名大院・生命農・生命技術、[1]東大・医科研・基礎医)
○Yurie Ito, Takaaki Kojima, Shoji Ohuchi[1], Hideo Nakano (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [1]Dept. Basic Med. Sci., IMSUT)

【目的】

当研究グループは、DNAライブラリーをビーズライブラリーに変換する技術、エマルジョンPCRを応用し、RNAリガーゼ活性を保持するリボザイムを用いたプロモーター活性の新規in vitro選別法を確立している。本研究ではこの選別法のさらなる効率化を目指し、高活性型クラスIリガーゼ・リボザイム、Clone 23を用いたプロモーター活性の新規in vitroハイスループットスクリーニング法の開発を試みた。

【方法】

本手法では、まず、各種プロモーターからリボザイムClone 23が転写されるような鋳型DNAを、エマルジョンPCRによってビーズ上に固定化し、in vitro転写ライゲーション共役反応を行う。このマイクロビーズ上にRNA基質を固定化しておく事により、転写されたリボザイムは自身の活性によって、同一ビーズ上に提示される。このビーズに対してCy5標識プライマーを用いた逆転写反応によって蛍光標識を施し、フローサイトメトリーによる蛍光検出を行う事で、特定のRNAポリメラーゼ・プロモーターの組み合わせにおける転写活性を検出する事が可能となる。

【結果】

T7もしくはSP6 RNAポリメラーゼを用い、各種プロモーターを保持した鋳型DNA固定化ビーズに対して本手法を試みたところ、T7 RNAポリメラーゼを用いた場合はT7プロモーター、SP6 RNAポリメラーゼを用いた場合はSP6プロモーターを保持するビーズにおいてのみ、顕著な蛍光が検出された。またT7プロモーター:SP6プロモーター = 1:1000のモル比となるように混合したライブラリーを用いて、本スクリーニングを行い、T7RNAポリメラーゼに対して高い転写活性をもつビーズ-DNA複合体をFACSによって回収し、ライブラリーの濃縮率を検討した。その結果、2ラウンド後において、T7プロモーター配列が22クローン中3クローンという頻度で確認され、濃縮率136倍という値が得られた。現在、T7プロモーター中にランダム配列を保持するライブラリーを作製し、種々の転写活性を保持するプロモーター配列のスクリーニングを試みている。

promoter, emulsion PCR, Flow cytometry

講演番号:2C21a02
講演日時、会場:3月23日09:11～ C校舎21会場

麹菌の CreA および HECT ユビキチンリガーゼ HulA 条件的発現株を用いたグルコース抑制機構の解析

Analysis of carbon catabolite repression mechanism in *Aspergillus oryzae* using the conditional expression strains for CreA and HECT ubiquitin ligase HulA.

○田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農・生物産業創成）
○Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Tohoku Univ.)

【目的】麹菌は多様な多糖類分解酵素群を生産するものの、その発現はグルコースによるカタボライト抑制を受ける。そのため、グルコース抑制機構を解明し、グルコース抑制が解除された宿主株を育種することで多糖類分解酵素の高生産が可能となると期待される。グルコース抑制は広域制御型転写因子 CreA によって制御され、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、CreA の機能がユビキチン・脱ユビキチン化により制御されることが示唆されている。また、CreA のユビキチン化には HECT ユビキチンリガーゼ HulA が関与すると推定されているものの、詳細な解析は行われていない。出芽酵母において HulA オーソログである Rsp5 が生育必須因子であることが知られていることから、麹菌においても HulA が生育に必須な因子である可能性が考えられた。また、CreA は生育必須因子ではないものの、*creA* 破壊株の生育は野生株と比較して著しく抑制されることが明らかとなっている。そこで、本研究では麹菌における HulA および CreA の条件的発現株をそれぞれ作成し、グルコース抑制への影響を解析することを目的とした。

【方法・結果】麹菌の *hulA* および *creA* 上流領域を 5´-非翻訳領域にリボスイッチが存在する *nmtA* プロモーターに置換し、リボスイッチ依存的に HulA および CreA の発現が制御される条件的発現株をそれぞれ作成した。作成した条件的発現株の生育を観察した結果、HulA 条件的発現株では発現抑制条件であるチアミン添加条件下で生育が著しく抑制され、分生子形成能が完全に失われた。このことから、麹菌において HulA は生育または分生子形成に必須な因子であることが示唆された。一方、CreA 条件的発現株では、チアミン添加条件下での生育が野生株と比較して抑制されたものの、*creA* 破壊株と比較するとその生育抑制は限定的なものであった。デンプンとグルコースを混合した培地におけるハロー形成能を比較した結果、野生株ではデンプン分解により生じるハローが全く見られないのに対し、CreA 条件的発現株ではチアミンの有無にかかわらずハローの形成が観察された。ノーザン解析により α-アミラーゼ（*amyB*）の発現様式を調べた結果、CreA 条件的発現株ではチアミンの有無によらず *amyB* 発現のグルコース抑制が解除されていることが示唆された。一方、 HulA 条件的発現株については、チアミン存在条件下での *amyB* 発現様式に野生株との大きな違いは見られなかった。今後、CreA 条件的発現株におけるアミラーゼ生産性向上への効果を検証する予定である。

（本研究は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の支援を受けて行われた。）

Keyword1 *Aspergillus oryzae*, Keyword2 carbon catabolite repression, Keyword3 CreA

講演番号:2C21a03
講演日時、会場:3月23日09:22～ C校舎21会場

Characterization of *farA* and other zinc finger transcription factor genes for fatty acid metabolism in *Aspergillus oryzae*

○ Sharon Marie Garrido, Akira Watanabe, Takahiro Shintani and Katsuya Gomi
Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai City, Japan

Abstract:

The zinc finger transcription factor FarA in *Aspergillus nidulans* up-regulates genes required for growth on fatty acids (Hynes et al, 2006). Ctf1 and Por1, orthologs of FarA of *A. nidulans* are required for growth on fatty acids in *Candida albicans* and also for the essential transcriptional activation of genes involved in beta-oxidation and peroxisomal biogenesis in *Yarrowia lipolytica*, respectively (Ramirez and Lorenz, 2009; Poopanitpan et al, 2010). FarA transcriptional factor is also found in the *Aspergillus oryzae* which has 83% homology of all the amino acid sequences and 97.5% homology of Zn2Cys6 motifs with the *A. nidulans*. In this study, farA disruptant in *A. oryzae* was characterized and expression levels of genes for fatty acid metabolism were also determined. Interestingly, *A. oryzae* farA disruptants showed indistinguishable growth in fatty acid sources compared to the wild-type, inconsistent with the growth phenotype of the *A. nidulans* counterpart. In contrast, expressions of some genes for fatty acid metabolism were significantly reduced in the farA disruptants. These contradicting results suggested that FarA may act not only the primary transcriptional activator for fatty acid utilization in *A. oryzae* and that another transcriptional factor(s) may regulate other fatty acid metabolic genes which can be accounted to the differences on the number of genes between these two Aspergilli. We then proceeded to screen other zinc finger transcription factor gene disruptants from the disruptant library of *A.oryzae* for fatty acid metabolism. Characterization and implication of these disruptants in response to different fatty acid substrates and fatty acid gene expressions are currently underway.

Transcription factor, fatty acids, metabolism

講演番号:2C21a04
講演日時、会場:3月23日09:33～ C校舎21会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* セリンタイプカルボキシペプチダーゼ（ CPase ）遺伝子の破壊による CPase 遺伝子群の転写への影響

The transcriptional effects by serine-type carboxypeptidase gene disruptants of *Aspergillus oryzae*

○阿保　春花、森田　寛人、前田　浩、山形　洋平、竹内　道雄（東農工大院･応生化）
○Haruka Abo, Hiroto Morita, Hiroshi Maeda, Youhei Yamagata, Michio Takeuchi (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】麹菌ゲノム解析の結果、麹菌のゲノムにはセリンタイプカルボキシペプチダーゼ（ CPase ）の活性中心モチーフのセットをコードすると推定される遺伝子が 12 種類存在することが明らかとなった。これらの遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ酸配列に基づく系統樹から、CPase は液胞局在型、ゴルジ体局在型、菌体外分泌型 2 つの計 4 つのクラスターに分類されることが示唆された。これまでに、培養条件の異なる 11 種類の条件で培養した麹菌におけるこれら 12 種類の CPase 遺伝子の転写パターンについて解析をおこなった。その結果、12 種類の CPase 遺伝子のうち、 11 種類が転写されていることが明らかとなった。これら 12 種類の遺伝子のうち、常時強い転写が見られた菌体外分泌型の TA6 、*A. nidulans* で発現させた際に高い活性を示すことがわかっている菌体外分泌型の TA1 についてそれぞれ遺伝子破壊株を作製し、破壊による他の CPase 遺伝子の転写への影響を調べた。
【方法】*sC* 遺伝子をマーカーとした相同組換えにより TA1 遺伝子、 TA6 遺伝子それぞれの破壊株を作製した。タンパク質を N 源とした Czapeck-Dox 液体培地、 YPD 液体培地で破壊株、ホスト株を 24 時間培養し、RNA 抽出、cDNA 合成をおこなった。得られた cDNA をテンプレートに、遺伝子特異的なプライマーを用いて半定量的 PCR をおこない、 12 種の CPase 遺伝子群それぞれについて転写パターンの解析をおこなった。
【結果】高発現している遺伝子の破壊により、ホスト株で転写が弱い遺伝子の転写レベルが上昇する傾向が認められた。TA1 遺伝子破壊株については、窒素源をゼラチンとした CD 培地で培養した菌体で、ホスト株では転写が弱かった TA15 遺伝子の転写レベルが上昇していた。 TA6 遺伝子破壊株については、窒素源を大豆タンパク質とした CD 培地において、ホスト株では転写レベルが弱かった 3 つの CPase 遺伝子の転写が強くなっていた。さらに、窒素源がゼラチンの CD 培地でも、ホスト株では転写が見られなかった TA15 遺伝子の転写強度が TA1 遺伝子破壊株と同様に上がっていた。このことから、高発現している CPase 遺伝子の破壊により通常は比較的発現の低い CPase 遺伝子の転写レベルが上昇し、破壊を相補する可能性が示唆された。
なお、本研究は生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus oryzae, serine-type carboxypeptidase,　gene regulation

講演番号:2C21a05
講演日時、会場:3月23日09:44～ C校舎21会場

麹菌の薬剤排出 ABC トランスポーターを制御する転写因子 AtrR と相互作用する Hsp70 ファミリータンパク質 SsaA の機能解析

Functional analysis of Hsp70 family protein SsaA interacting with AtrR transcription factor involved in azole drug resistance in *Aspergillus oryzae*

○大場　歩, 田中 瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也（東北大院農・生物産業創成）
○Ayumi Ohba, Mizuki Tanaka, Shintani Takahiro, Katsuya Gomi
(Div.Biosci.Biotechnol.Future Bioind., Grad.Sch.Agric.Sci., Tohoku Univ.)

【目的, 方法】麹菌の転写因子AtrRは, アゾール系薬剤を排出する複数のABCトランスポーター遺伝子の発現を制御している. 出芽酵母では, 同様の薬剤排出ABCトランスポーター遺伝子の発現制御に関わる転写因子PDR1/PDR3の機能発現において, メディエーター活性化補助因子GAL11/MED15サブユニットが, 極めて重要で特異的な役割を果たしていることが明らかにされている. しかし, 麹菌ゲノム上にはGAL11と相同性の高いタンパク質が見出されておらず, 麹菌では出芽酵母と同じような転写制御機構が存在しない可能性がある. また, これまでに糸状菌の転写メディエーターに関連した知見もほとんどない. そこで, 本研究では, 麹菌においてABCトランスポーター遺伝子の発現に関与する転写メディエーターの役割を担うタンパク質を明らかにするために, アスペルギルス属用にコドンが最適化されたTAP (Tandem Affinity Purification)タグを融合したAtrRを発現させ,薬剤を加えて活性化させたAtrRと相互作用するタンパク質をプルダウン法によって単離を試みた.
【結果】単離したタンパク質をマススペクトロメトリー解析したところ,HSP70に分類されるタンパク質がAtrRと結合する可能性が示唆された. 出芽酵母において, HSP70であるSSZ1が多剤薬剤耐性に関与する転写因子PDR1と直接結合して薬剤耐性を付与していること,また同様に多剤薬剤耐性に関与する転写因子PDR3がHSP70のSSA1/SSA2により負に制御されていることが明らかになっている.今回同定されたHSP70はSSA1のオーソログであり,AtrRとこのSSA1オーソログ(SsaA)が相互作用していることが予想されたため, その可能性について詳細に解析を行った. まずはじめに, *ssaA*高発現株を作製し, アゾール系薬剤添加培地で生育試験を行ったところ, 野生株と比較してわずかながら薬剤に感受性を示した. 次に、定量RT-PCR解析を行ったところ, 野生株と比較して*ssaA*高発現株では転写因子*atrR*及び, その制御下にあると考えられる3つのABCトランスポーター遺伝子の発現量が減少していた. 以上のことから、麹菌においてもアゾール系薬剤耐性に関与する転写因子AtrRがSsaAによって負の制御を受けることが示唆された.

Aspergillus oryzae, drug resistance, transcription factor

講演番号:2C21a06
講演日時、会場:3月23日10:05～ C校舎21会場

ビーズディスプレーを用いたDNA-転写因子相互作用検出システムに関する研究

Detection of DNA-Transcription Factor Interactions using a bead Display System

○王　ハン輝、児島　孝明、中野　秀雄（名大院・生命農）
○Panhui Wang, Takaaki Kojima, Hideo Nakano (Meidaiin)

【目的】当研究室では、水／油相エマルジョン内でビーズ固定化プライマーを用いて行う一分子PCR（W/Oエマルジョン PCR）により、DNAライブラリーをビーズライブラリーに変換する技術を開発した。本研究では、糸状菌Aspergillus nidulans由来の転写因子AmyRを取り上げ、ビーズディスプレーを用いて構築したランダムライブラリーから転写因子AmyR結合サイトのハイスループット解析を目的としている。転写誘導因子AmyRは、Aspergillus属のアミラーゼ遺伝子群のプロモーター領域に結合し、転写を活性化する。
【方法】まず、W/OエマルジョンPCRによってランダムライブラリー(N x 22)一分子由来のDNAをマイクロビーズ上に増幅、固定化した。得られたビーズライブラリーに対し、大腸菌で発現したMalEタグ-AmyRタンパク質及び蛍光標識した抗MalEタグ抗体を加えた。この時、転写因子の認識するDNAが固定化されたビーズ上では、ビーズ-DNA-蛍光標識抗体の複合体が形成され、これらの蛍光を有する複合体はFluorescent cell-activated cell sorter（FACS）を用いて迅速に選択、分離した。得られたビーズからDNAを回収し、次ラウンドのスクリーニングや配列情報解析、もしくはAmyR-DNA結合親和性測定に用いられた。
【結果】ランダムライブラリーから5ラウンドの連続セレクションおよび親和性解析によって、転写因子AmyRの結合モチーフを二つ抽出しました。従って、本システムは強力なin vitro転写因子-DNA作用解析法であることが証明されました。将来、異なる転写制御ネットワークの解析への応用に期待できる。

Key words: AmyR, ePCR, Fluorescence-activated cell sorting.

講演番号：2C21a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ C校舎21会場

出芽酵母のエタノールストレス応答に関わるエピジェネティクス制御系の解析

Analysis of ethanol stress response mediated by epigenetic gene regulation in budding yeast

○須田　宙、松田　宇央、藤村　朱喜、中川　純一（東農大院、食品科学）
○Hiroshi Suda, Takao Matsuda, Syuki Fujimura, Junichi Nakagawa (Dept.Food Science graduate school, Tokyo university of Agriculture)

【目的】

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にとって環境ストレスの一つであるエタノールに対する応答機構の解明は、酒類、パンなどの発酵食品やバイオエタノールの生産効率の向上に寄与できると考えられる。

これまで、酵母のエタノールストレス応答制御に関しては、様々な転写因子による遺伝子発現調節が報告されている。一方で遺伝子発現は、クロマチンの化学的構造の変化による制御も深く関わることから、これらの制御系の一つであるヒストンアセチル化に注目した。これについて当研究室では、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）関連遺伝子の欠損により、酵母のエタノール耐性が変化することを報告してきた。そこで本研究では、ヒストンアセチル基転移酵素（HAT）関連遺伝子を中心に解析を行い、ヒストンアセチル化を介した遺伝子発現制御とエタノールストレス応答との関連について明らかにすることを目指した。

【方法・結果】

HAT を介したヒストンのアセチル化による遺伝子の発現制御とエタノールストレス応答との関係を明らかにするために、出芽酵母非必須遺伝子破壊株セットより抜粋した HAT 関連遺伝子欠損株 22 株について 8%エタノール存在下での生育を野生株と比較した。その結果、好気条件において*Δada2*、*Δhfi1*、*Δngg1* 株にエタノール感受性が見られた。嫌気条件においても、好気条件と同様の 3 株がエタノール感受性を示した。この結果より、エタノールストレス応答に HAT 複合体、及びその関連因子によるヒストンのアセチル化の制御が関与している可能性が示唆された。

次に、ヒストンのアセチル化レベルとエタノールストレス応答の関係を解析するためにアセチル化レベルについての解析を試みた。野生株及びエタノール感受性の見られた HAT 関連遺伝子欠損株3株をそれぞれ培養し、さらに野生株については、HDAC 阻害剤添加条件についても検討対象とした。それぞれ培養した菌体から核タンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングを行い、野生株と各菌株から抽出した核タンパク質のヒストンアセチル化レベルを比較した。その結果、HDAC 阻害剤の添加により、ヒストンアセチル化レベルが顕著に上昇していた。逆に、HAT 関連遺伝子の欠損株では、顕著にヒストンアセチル化レベルが低くなることが明らかになった。

Keywords : epigenetics, ethanol stress, histone acetylation

講演番号:2C21a08
講演日時、会場:3月23日10:27～ C校舎21会場

出芽酵母のRpd3／HDAC複合体による減数分裂中期遺伝子群の転写制御

Regulation of middle meiotic gene expression by the Rpd3/HDAC complex in *Saccharomyces cerevisiae*.

○湯川 格史、河村 浩、淺田 星太郎、今村 優子、土屋 英子（広島大院先端物質・分子生命）
○ Masashi Yukawa, Hiroshi Kawamura, Hoshitaro Asada, Yuko Imamura, Eiko Tsuchiya (Hiroshima Univ.)

【目的】真核生物のヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)は有糸分裂期においてクロマチンの構造形成に働き、複製・転写・修復・組換え等の多彩なゲノムの機能発現に関与することが知られている。一方、配偶子形成に重要な減数分裂期でもHDACの重要性が予想されるがその役割については不明な点が多い。そこで本研究では、減数分裂期のHDACの役割について出芽酵母を用いて調べることにした。
【方法・結果】出芽酵母のHDACは10種存在し、これらの各単独欠損株の胞子形成能を調べた結果、ヒトHDAC1ホモログである*RPD3*遺伝子の欠損株だけが胞子形成不能の表現型を示した。*rpd3*欠損株では、減数分裂前DNA複製は起こるが、減数分裂前中期に特異的に発現する*NDT80*遺伝子の転写がほとんど起こらず、第一減数分裂に進行できないことが報告されている（Hepworth *et al.*, 1998)。*NDT80*の転写誘導には、Hst1-Sum1複合体によるMSE配列を介した転写抑制の解除と、Ndt80自身によるこの配列を介したポジティブフィードバック制御が必要であることから、*rpd3*欠損株ではMSE配列を介した転写の切り換えに異常が生じている可能性が考えられた。そこで、*sum1rpd3*二重欠損株を作成して調べた結果、Sum1依存的な転写抑制が解除されたレベルの*NDT80*の転写は観察されたが、Ndt80依存的な転写誘導がほとんど起こらず、*NDT80*以外のMSE配列を持つ減数分裂中期遺伝子群の転写誘導も同様にほとんど観察されなかった。また、この二重欠損株では第一減数分裂への進行異常が部分的に抑圧されたが胞子形成には至らなかった。以上の結果から、*rpd3*欠損株では、MSE配列におけるSum1依存的な転写抑制の解除とNdt80による転写活性化の両方の制御に異常が生じている可能性が示唆された。この転写量低下が胞子形成不能の直接的な要因かどうかについて確認するため、*NDT80*自身のプロモーターを減数分裂初期で発現する*IME1*プロモーターに置換して*rpd3*破壊株で強制発現させた。その結果、二回の核分裂は起こるが成熟した胞子形成には至らなかった。従って、Rpd3はMSE配列を介した減数分裂中期遺伝子群の転写制御とそれ以降の胞子形成過程において重要な役割を果たし、複数の作用点を持つ可能性が示唆された。現在、Rpd3によるMSE配列を介した転写制御の詳しい分子機構について調べている。

transcription, meiosis, histone deacetylase

講演番号：2C21a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ C校舎21会場

出芽酵母の高温耐性能に関与する遺伝子の探索

Screening of genes related to thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*

○中村 敏英、山本 まみ、安藤 聡、渡邉 樹、島 純[1]（農研機構・食総研、[1]京都大・微生物科学）
○Toshihide Nakamura, Mami Yamamoto, Akira Ando, Itsuki Watanabe, Jun Shima[1] (Natl. Food Res. Inst., [1]Kyoto Univ.)

【目的】稲わら等のバイオマスを原料としたエタノール生産において、原料糖化および発酵工程の温度は、エタノール生産性に大きな影響を与える。発酵熱等による至適温度を超える温度の上昇は、酵母の生育を阻害し、発酵効率の低下の原因となる。そのためバイオエタノール生産においては、高温に耐えられる酵母が求められており、探索や育種が進められている。一方、酵母の高温耐性機構については、熱ショックタンパク質等の研究を中心に進んだが、不明な点が多く残されている。我々はこれまで当研究所保存菌株および自然界からの分離株を検索し、様々なレベルの高温耐性能を有する出芽酵母を得ている。これらの酵母株を活用した高温耐性機構の解明を目的として、高温耐性能に関連する遺伝子の同定を試みた。
【方法】高温に対する耐性が段階的に異なる出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）3株を対数増殖期中期まで培養し、39℃で30分処理した時に発現量が変化する遺伝子をDNAマイクロアレイにより解析した。遺伝子発現プロファイルの比較から高温処理により2倍以上発現量の変化した遺伝子を、データベースを用いて機能カテゴリーごとに分類し、解析を行った。また、高温環境下で耐性能に応じて発現量の変化する遺伝子を検索した。候補遺伝子についてはリアルタイムPCRで発現量の確認を行った。
【結果】高温耐性能の異なる出芽酵母を用いてDNAマイクロアレイ解析を行った結果、ストレス耐性に関与する遺伝子の発現が共通して上昇していた。また、高温耐性株で特異的に発現が変動する遺伝子も認められた。高温耐性能に関わる可能性が示された3遺伝子について、リアルタイムPCRで確認したところ、1遺伝子について耐性能に応じた発現量の変化が認められた。この遺伝子について、DNAマイクロアレイに使用した3株を含む計8株で高温耐性能と発現量変化を解析した結果、遺伝的バックグランドが異なるにも関わらず、37℃の培養においてはやや高い相関が見られた。この発現変動する遺伝子の機能は不明であるが、その発現量変化が高温耐性能の指標となる可能性がある。

thermotolerance, yeast, DNA microarray

講演番号：2C21a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ C校舎21会場

分裂酵母におけるグリセロール資化関連遺伝子のエタノールによる発現誘導機構の解析

Facilitation of glycerol assimilation-related genes by ethanol in fission yeast

○松沢智彦、竹川 薫（九大院・生資環）
○Tomohiko Matsuzawa, Kaoru Takegawa (Dept. of Biosci. and Biotechnol., Kyushu Univ.)

【目的】分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*はグリセロールを唯一の炭素源とする培地では生育できないが、エタノール存在下ではグリセロールを資化して生育できることが古くから知られている。本研究は、このエタノールによるグリセロール資化の誘導機構の解明を目的としている。

【方法・結果】我々はグリセロールの資化に必須なグリセロールデヒドロゲナーゼをコードする*gld1*$^+$遺伝子の発現に焦点を当て、エタノールが*gld1*$^+$の発現に及ぼす影響を解析した。

【結果】*gld1*$^+$はグルコース豊富な条件下では全く発現しておらず、グリセロールを唯一の炭素源とする培地でも僅かに発現する程度であった。しかし、グリセロール培地に0.1%程度の微量のエタノールを添加することによって*gld1*$^+$の発現が劇的に誘導された。グルコース豊富な条件下ではエタノールを添加しても*gld1*$^+$の発現誘導は起こらず、また、エタノールを唯一の炭素源とする培地ではグリセロールとエタノールを炭素源とした培地と同様に*gld1*$^+$の劇的な発現誘導が見られたことから、*gld1*$^+$の発現誘導には「グルコース飢餓」と「エタノール」の２つの条件が必須であり、*gld1*$^+$はグリセロールの資化に必須であるにも関わらず「グリセロール」はその発現誘導に必要でないことが示唆された。

これまでに、分裂酵母ではグルコース飢餓条件下において種々の遺伝子の発現を誘導する転写活性化因子としてRst2とAtf1の２つが報告されている。これら転写活性化因子の欠損株である*rst2*Δ株及び*atf1*Δ株の解析を行った結果、*rst2*Δ株ではグリセロール-エタノール培地において生育でき、またエタノールによって*gld1*$^+$の発現誘導が見られたのに対し、*atf1*Δ株はグリセロール-エタノール培地において生育できず、また*gld1*$^+$の発現誘導に欠損が生じることが明らかになった。このことから、２つの転写活性化因子のうち、Atf1がエタノールによる発現誘導に必須であることが示唆された。

次に、*gld1*$^+$プロモーターの下流にレポーター遺伝子*lacZ*を挿入したコンストラクトを分裂酵母野性株に形質転換し、様々なアルコールやストレスを加えたグリセロール培地における*lacZ*に由来するβ-ガラクトシダーゼ活性の有無を調べた。メタノールやブタノール、また種々のストレスではβ-ガラクトシダーゼ活性は見られなかったが、1-プロパノール存在下ではエタノール存在下と同様にβ-ガラクトシダーゼ活性の上昇が見られた。このことから、分裂酵母*gld1*$^+$の発現はエタノールだけでなく、1-プロパノールによっても誘導されることが明らかになり、また、分裂酵母はエタノールや1-プロパノールを認識する機構を有していることが示唆された。

fission yeast, glycerol, ethanol

講演番号:2C21a11
講演日時、会場:3月23日11:10～ C校舎21会場

嫌気性細菌*Clostridium paraputrificum* M21株のキチナーゼ遺伝子の発現とプロモーター解析

Expression and promoter analysis of chitinase genes of *Clostridium paraputrificum* M21

佐藤勇介、中村仁美、中西有斗、黒岩千智、粟冠真紀子、○木村哲哉、粟冠和郎[1]（三重大院・生物資源）

Yusuke Sato, Hitomi Nakamura, Yuto Nakanishi, Chisato Kuroiwa, Makiko Sakka, Tetsuya Kimura, Kazuo Sakka (Mie Univ)

【目的】海浜土壌中より単離した嫌気性細菌*Clostridium paraputrificum* M21株は、キチンを炭素源として水素を生産することから、未利用バイオマスからエネルギー生産への応用が期待される。すでに本菌は、唯一の炭素源としてキチンが培地中に存在する場合にキチン分解酵素を分泌するが、難分解性のキチンをどのようにして分解し資化する機構の全体像は不明である。そこで、すでに当研究室で単離しているキチン分解酵素群の遺伝子の発現誘導を調べるとともにこれらのプロモーター領域の解析を行うことでこれらの誘導発現のメカニズムを解明する。

【方法】*C. paraputrificum* M21株をキチンなどさまざまな炭素源で培養し、菌体からRNAを抽出してRT-PCR法によって各遺伝子の発現を調べた。さらに、発現に重要なシス領域を*in vivo*で解析するため、大腸菌GUSをもちいたレポーターアッセイベクターpKNT19-TGを構築し、キチン分解酵素遺伝子のうちもっとも発現量が多いキチナーゼAB(chiAB)遺伝子のプロモーター領域を解析した。

【結果】*C. paraputrificum* M21をグルコースを炭素源として前培養してから1%ボールミルキチンを炭素源としてGS改変培地で対数増殖期まで増殖させてからRNAを抽出した。比較としてグルコースとN-acetylgucosamine(GlcNAc)をそれぞれ炭素源として培養した菌体を使った。その結果、chiAB遺伝子をはじめ多くのキチナーゼ遺伝子群やN-acetylglucosaminidase遺伝子がキチンで発現誘導を受けていることがわかった。chiAB遺伝子については以前の報告でノーザンブロッティングの結果から*chiAB*のすぐ下流にあるトランスポーターをコードすると予測されたORFも同じオペロンとして転写されている可能性が示唆されていたが、RT-PCRの結果からは*chi*ABのみが強く転写されていた。*chiAB*遺伝子の5’上流域約300bpをプロモーター領域と予測してPCR法で増幅してGUS遺伝子と融合させた遺伝子を*C. paraputrificum* M21へ形質転換し、形質転換体をさまざまな培地で培養してGUS活性を測定したところ、キチンでのみGUSの強い誘導が起こった。そこで、さらにプロモーター領域を5’側から順次欠失させてGUS活性を測定したところ、転写開始点から150bp上流域があればキチンでの強い誘導が起こることが示されたことからこの領域にキチン誘導による高発現に機能しているシス領域が存在していることがわかった。この領域には、-35, -10など基本的なプロモーター配列が存在したが、-35を変異させてもGUS発現に大きな影響はなかった。また、基本的なプロモーター配列以外の特徴的な配列は見つかっていない。今後は、この上流域に結合する転写因子の解析が必要である。

Clostridium paraputrificum, chitinase, promoter

講演番号：2C21a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ C校舎21会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるセルラーゼおよびマンナナーゼ生産制御機構
Regulation of cellulase and mannanase synthesis in *Aspergillus nidulans*

○青山未来、金丸京子、小林哲夫（名大院生命農・生物機構）
○Miki Aoyama, Kyoko Kanamaru, Tetsuo Kobayashi (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】*Aspergillus oryzae* において同定された転写因子 ManR は、マンノビオースに応答してマンナナーゼ・セルラーゼの発現を誘導する。しかし、*A. oryzae* はセルラーゼ生産性が低く研究が困難であったため、本研究では *A. nidulans* における ManR 相同因子の解析を行った。

【方法】1．2つの ManR 相同因子 AnManR (AoManRとの相同性63 %)および AnManS (AoManRとの相同性44 %)の遺伝子破壊株を作成し、セルラーゼおよびマンナナーゼのプレートアッセイに供した。2．CMC および konjac glucomannan を単一炭素源としてWT 、AnManR 破壊株を液体培養し、その培養上清をザイモグラフィーにより解析した。3．0.1 % cellobioseを単一炭素源としてWT 、AnManR 破壊株を液体培養し、取得したcDNAをRT-PCRに供してセルラーゼ関連因子の転写量解析を行った。

【結果】1．AnManR 破壊株において、セルラーゼ生産性はほぼ失われたが、マンナナーゼ生産性に影響は見られなかった。また、AnManS 破壊株において、マンナナーゼ生産性はほぼ失われたが、セルラーゼ生産性に影響は見られなかった。2．AnManR 破壊株において、主要エンドグルカナーゼであるEglA、EglBの生産がほとんど見られず、一方、4-5種見られるマンナナーゼのうち2種の生産が著しく減少した。この2種のマンナナーゼはEglA、EglBと同様にマンノビオースではなく、セロビオースにより誘導された。3．セルラーゼ遺伝子として*eglA*、*eglB*、*cbhA*、*cbhC* の転写量解析を行ったところ、すべての遺伝子の転写量はAnManR 破壊株において大幅に減少した。
以上の結果より、AnManRはセロビオースに応答してセルラーゼと一部のマンナナーゼの生産を制御する因子であり、機能的にはManRと言うよりむしろCelRであると考えられる。また、AnManSはマンノビオースに応答してマンナナーゼ発現を制御する転写因子であると考えられる。

●本研究の一部は、生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われた。

Aspergillus, Mannanase, Cellulase

講演番号：2C21a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ C校舎21会場

糸状菌MADS box protein McmAによるセルラーゼ遺伝子群の発現制御

Involvement of the MADS box protein McmA in regulation of cellulase genes in filamentous fungi.

山川　陽平、○李　諾、遠藤　良知、宮本　健太郎、金丸　京子、小林　哲夫（名大院生命農・生物機構）

Yohei Yamakawa, ○Nuo Li, Yoshikazu Endo, Kentaro Miyamoto, Kyoko Kanamaru, Tetsuo Kobayashi (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

Exhaustive analysis of the promoter region of *eglA*, encoding endoglucanase A in *Aspergillus nidulans*, has revealed that the *cis*-element CeRE (Cellulose Responsive Element) is essential to inductive *eglA* expression in the presence of cellulose and cellobiose[1)]. However, transcription factors which bind to CeRE had not been identified. Based on the fact that CeRE contains a consensus sequence $CC(A/T)_6GG$ for binding of SRF-type MADS box proteins, we examined here whether such MADS proteins are involved in regulation of *eglA* and other cellulase genes in *A. nidulans*.

MADS box proteins are transcription factors widely distributed among eukaryotes and involved in regulation of a vast range of cellular functions. Searching for SRF-type MADS box proteins in the *A. nidulans* genome database led to identification of McmA, the homolog of Mcm1p in *Saccharomyces cerevisiae*, as the sole SRF-type MADS box protein. Considering that deletion of *MCM1* in *S. cerevisiae* is lethal, *A. nidulans* strain that expresses $McmA_{I70A}$ carrying I70A substitution was constructed. This strain showed a significant reduction in cellulase production. RT-qPCR analysis revealed that the I70A mutation led to reduction of not only expression of *eglA* but also *eglB* (endoglucanase B), *cbhA* (cellobiohydrolase A) and *cbhC* (cellobiohydrolase C). Furthermore, electrophoretic mobility shift assay indicated that McmA expressed in *Escherichia coli* specifically bound to CeRE. These results imply that McmA regulates expression of *eglA* and other cellulase genes by binding directly to their promoters, which is the first example showing participation of an SRF-MADS protein in cellulase regulation.

MADS proteins are known to regulate gene expression through interaction with other transcription factors, implying presence of additional factors that regulate cellulase gene expression in coordination with McmA. XlnR, SteA, and ManR are candidates of such interacting factors because their orthologues have been shown to be involved in cellulase regulation in other filamentous fungi. Gene disruption studies indicated that only ManR was essential to cellulase induction in *A. nidulans*, as will be reported in this meeting. Experiments aiming to analyze McmA-ManR interaction are currently underway.

This work was partially supported by the Programme for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry.

1) Endo et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72: 312-320 (2008).

Aspergillus, MADS protein, cellulase regulation

講演番号：2C21a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ C校舎21会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* 金属プロテアーゼ遺伝子の転写解析

Transcriptional analysis of metalloprotease genes in *Aspergillus oryzae*

○酒井 大介、竹内 道雄、山形 洋平（東農工大・院農・応生化）
○ Daisuke Sakai, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】

2005 年に我が国のグループにより麹菌 *Aspergillus oryzae* の全ゲノム配列の解析が終了した[1)]。その結果、*A. oryzae* は *A. fumigatus* や *A. nidulans* などの他の *Aspergillus* 属と比べてゲノムサイズが大きく、遺伝子数が多いことが明らかとなった。また、菌体内外で多くの重要な役割を担っているプロテアーゼをコードする遺伝子についてもこれらの *Aspergillus* 属と比べて約 3 割程度多く、*A. oryzae* のゲノム中にのみ認められるプロテアーゼ遺伝子が存在することも明らかとなった。しかし、これらのプロテアーゼの役割についてはほとんど解明されておらず、多くのプロテアーゼがどのような条件で発現するのかは、いまだ明らかではない。そこで、本研究では、*A. oryaze* がプロテアーゼ遺伝子を窒素源の変化や培養時間に応じてどのように使い分けているのか調べることを目的とし、様々な培養条件における金属プロテアーゼ遺伝子を中心とした複数のプロテアーゼ遺伝子の転写解析を行った。

【方法】

窒素源を様々に変化させた Czapeck-Dox 液体培地 50 mL に PD 寒天培地で培養した *A. oryzae* RIB40 株から回収した分生子を同量分注し、30℃ で振とう培養を行った。窒素源は、硝酸ナトリウム、スキムミルク、ゼラチン、大豆タンパク質とした。各窒素源を用いた条件において 24 時間毎に 96 時間まで菌体を回収して total RNA の抽出、mRNA の精製及びファーストストランド cDNA の合成を行った。得られた各 cDNA をテンプレートとし、目的遺伝子の 3’末端側付近、約 800 bp を増幅するプライマーを用いて半定量的 PCR を行い、遺伝子の転写量を解析した。各条件間の比較にはアクチンをコントロールとして用いた。

【結果】

プロテアーゼ遺伝子の転写解析の結果、培養条件によって各遺伝子の転写量に違いが見られた。菌体外酵素では窒素源の違いによって転写量が変化する可能性が示唆された。また、菌体内酵素では窒素源の違いよりも培養時間の違いによって転写量が変化する可能性が示唆された。

なお、本研究は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

1) Machida, M. *et al.* Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438, 1157-1161 (2005).

Aspergillus oryzae, protease, transcriptome

講演番号：2C21a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ C校舎21会場

Trichoderma reesei セルラーゼ高生産株における菌体内β-グルコシダーゼの解析

Analysis of intracellular β-glucosidase in hyper-cellulolytic mutant of *Trichoderma reesei*

○山口香織、新田美貴子、中澤　光、志田洋介、森川　康、森　一樹[1]、平川秀樹[1]、久原　哲[1]、小笠原渉(長岡技科大・生物、[1]九大院農院・生機科)

○Kaori Yamaguchi, Mikiko Nitta, Hikaru Nakazawa, Yosuke Shida, Yasushi Morikawa, Kazuki Mori[1], Hideki Hirakawa[1], Satoru Kuhara[1], Wataru Ogasawara (Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech., [1]Fac. Agri., Kyushu Univ.)

【目的】セルラーゼ高生産菌である糸状菌 *Trichoderma reesei* は、その産業上の有用性から突然変異導入によりセルラーゼ生産能が高められた数多くの変異株が造成されてきた。しかし、変異株においてどのような変異がセルラーゼ高生産化をもたらしているのか明らかとなっていない。本研究室では日本で開発された変異株系統樹について全ゲノムの塩基配列を次世代シーケンサーにより決定し、野生株 QM6a との比較ゲノム解析を一塩基多型(SNP)を対象として進めている 。変異株の中で PC-3-7 株はソルボースによるセルラーゼ誘導性およびセロビオース培養によるセルラーゼ生産性が向上した株である。この株で生じた複数の SNP のうち、ひとつが GH ファミリー1 β-グルコシダーゼ(Cel1A、BGLⅡ)をコードする遺伝子(*cel1a*、*bgl2*) 上に存在することが明らかとなった。BGLⅡは菌体内で最も発現しているため、*T. reesei* において重要な役割を果たしていると考えられた。本研究では *bgl2* の SNP が *T. reesei* のセルラーゼの生産性にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的としている。

【方法】　復帰型 *bgl2* 発現カセットおよび *bgl2* 破壊カセットを *pyr4* を選択マーカーとして構築した。これらをプロトプラスト-PEG 法にて PC-3-7 株に導入し、得られた *bgl2* 復帰株および *bgl2* 破壊株を以下の解析に用いた。無細胞抽出液のセロビオース分解活性は生じたグルコースをグルコース CII テストワコーを用いて測定した。培養上清の CMC 分解活性は生じた還元糖をソモジ-ネルソン法にて測定した。各セルラーゼ遺伝子の転写量は遺伝子特異的プライマー対を用い定量的リアルタイム PCR 法によって評価した。

【結果】*bgl2* 破壊株および PC-3-7 株のセロビアーゼ活性は *bgl2* 復帰株と比較して著しく低く、PC-3-7 株において BGLⅡはセロビオース分解活性を失っていることが強く示唆された。

これらの形質転換体についてセルラーゼ生産性を解析したところ、セロビオースを炭素源とした際特に *bgl2* 復帰株は PC-3-7 株および *bgl2* 破壊株と比較すると減少していた。休止菌体を用いた各種誘導物質に対するセルラーゼ遺伝子の転写についても *bgl2*復帰株では低下が観察された。このことから、PC-3-7 株においてセロビオースの蓄積がセルラーゼ生産を促す可能性があると推測された。さらに、*bgl2* 破壊株は実験条件によっては PC-3-7 株と異なるセルラーゼ生産挙動を示したことから、SNP によって変異した BGLⅡは何らかの機能（活性）を有している可能性が推測された。

Trichoderma reesei, comparative genome analysis, β-glucosidase

講演番号：2C21p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ C校舎21会場

*Streptomyces avermitilis*における異種由来テルペン合成酵素遺伝子発現システムの構築

Construction of expression system for exogenous terpene synthase genes in *Streptomyces avermitilis*.

○山田佑樹[1]、内山琢麻[1]、葛山智久[2]、池田治生[1]([1]北里大・生命研、[2]東大生物工学セ)

○Yuki Yamada[1], Takuma Uchiyama[1], Tomohisa Kuzuyama[2], Haruo Ikeda[1]([1]Kitasato University, Kitasato Institute for Life sciences, [2]The University of Tokyo, Biotechnology Research Center)

テルペン化合物はこれまでに植物や糸状菌から多数単離されている。一方、細菌においてテルペン化合物は極めて稀な代謝産物として理解されてきた。しかしながら、我々は2008年にテルペン合成酵素に対して「隠れマルコフモデル」を適用し、そのモチーフ配列およびそれらの配列間の距離等を統計学的に処理することにより、細菌のタンパク質データベース(約200万種のタンパク質)から効果的に細菌由来のテルペン合成酵素(遺伝子)を探索できることを示した。その結果、細菌においても極めて多様なテルペン合成酵素(遺伝子)が存在していることを明らかにし、さらに、アミノ酸配列に基づく系統解析よりそれらは、モノ、セスキ、ジテルペン合成酵素に分類できることを示した。これまでに、原核細胞生物から初めてとなるモノテルペン(2-methylisoborneol)合成酵素ならびに新規のセスキテルペン化合物およびその合成酵素(遺伝子)を発見するに至った[1,2]。

最新のNCBIデータベースに対して、新たに作製した「隠れマルコフモデル」を用いて同様の解析を行なった結果、120を越える細菌由来のテルペン合成酵素の候補が見出された。そこで、これら候補遺伝子を解析するため、*S. avermitilis*大規模染色体欠失体(SUKA17)を宿主としたテルペン合成酵素遺伝子の異種発現システムの構築を行なった。*Streptomyces avermitilis* SUKA17は、本菌野生株の主生産物であるavermectinやテルペン化合物などの内在性の二次代謝産物生合成遺伝子群を欠失している。そのためテルペン化合物の異種生産においては、前駆体であるイソペンテニル2リン酸やジメチルアリル2リン酸が導入した異種生物由来のテルペン化合物の生合成経路へ効果的に供給されるため、目的のテルペン化合物が効率良く生成する。本研究においては、テルペン化合物の前駆体であるポリプレニル2リン酸合成酵素遺伝子(ゲラニル2リン酸、ファルネシル2リン酸ならびにゲラニルゲラニル2リン酸)をテルペン合成酵素遺伝子と共発現させることにより目的のテルペン化合物の生産性の向上を図ると共に、その生成物の同定を行った。

1) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:7422-7427, 2008, 2) *J. Am. Chem. Soc.* **132**:8850-8851, 2010, 3) *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **107**:2646-2651, 2010

Terpene, streptomyces

講演番号：2C21p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ C校舎21会場

次世代シーケンサーによる放線菌*Streptomyces griseus*の転写産物の網羅的同定

Analysis of *Streptomyces griseus* transcriptome using a next generation sequencer

○手塚 武揚、大西 康夫（東大院農生科・応生工）
○Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi（Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. of Tokyo）

次世代シーケンサー（Illumina 社 Genome Analyzer IIx）を用いて放線菌 *S. griseus* 転写産物の網羅的な解析を行った。*S. griseus* 野生株を固体培地と液体培地の 2 通りで培養して total RNA を回収した後、rRNA と tRNA の除去を行った。cDNA ライブラリーは、（1）RNA をランダムに断片化して逆転写反応を行い 2 本鎖 DNA としたもの、（2）RNA を断片化せずに 2 本鎖 DNA とし制限酵素処理により 5’末端の 25 塩基のみを濃縮したもの、の 2 種類を作製した。それぞれの cDNA ライブラリーを解析した結果、遺伝子の発現量、転写開始点、転写単位が高解像度で明らかとなった。*S. griseus* における転写開始点、転写単位についての網羅的な情報は本解析で初めて得られたものであり、遺伝子発現制御機構を解析する基盤となるものである。

我々はこれまでに *S. griseus* の small RNA に注目して解析を行い、通常の培養条件で発現する 12 種の small RNA を同定している。[1] そこで網羅的解析により明らかとなった転写プロファイルにおいて遺伝子間領域の転写に注目したところ、既に報告した 12 の small RNA に加えて独立した転写単位として少なくとも 1,481 領域から短い転写産物が検出されていた。このうち発現量の多い 21 領域に対して S1 マッピング法による転写解析を行ったところ、すべての領域で転写が確認され、転写開始点もシークエンス解析で得られた位置とよく一致した。また、*S. griseus* の形態分化と二次代謝を制御する転写活性化因子 AdpA の遺伝子破壊株では、4 領域からの転写産物量が野生株と比較して顕著に減少していた。AdpA による転写制御下には形態分化、二次代謝に関与する数多くの遺伝子が存在することから、これら 4 つの短い転写産物も *S. griseus* の形態分化や二次代謝に関与することが期待された。そこで、これら 4 領域について遺伝子破壊株を作製したが、予想に反していずれの破壊株も形態分化、二次代謝に関して野生株と差異は観察されなかった。

1). Tezuka, T. *et al*., (2009) J. Bacteriol. 191, 4896-4904.

Streptomyces griseus, transcriptome, small RNA

講演番号：2C21p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ C校舎21会場

放線菌の定常期への移行と主要シグマ因子発現制御の調節

Entry into stationary phase and regulation of the principal sigma factor in *Streptomyces griseus*

○大谷啓志、大西康夫（東大院農生科・応生工）
○Hiroshi Otani, Yasuo Ohnishi (Tokyo Univ.)

【目的】多くの細菌において主要シグマ因子は自己制御されるが、放線菌*Streptomyces griseus* では主要シグマ因子σ^{HrdB}はECFシグマ因子σ^{D}によって生育を通して制御される[1)]。しかしながら*S. griseus* の主要シグマ因子遺伝子発現制御系が他の細菌と異なる理由については未解明であった。

【方法】*hrdB* の生育を通した詳細な転写制御パターンを調べるため、*sigD* mRNA量、σ^{D}タンパク質量、*hrdB* mRNA量、σ^{HrdB}タンパク質量を測定した。また他の細菌と同様に主要シグマ因子を自己制御する株（*hrdB* 自己制御株：σ^{D}依存の*rpoB* プロモーターの下流に*hrdB* を連結し、*sigD* 遺伝子破壊株のクロモソームに組み込んだ株）を作製し、本株における*hrdB* 発現量と生育様式を野生株と比較することで、ECFシグマ因子が主要シグマ因子を制御する意義について考察した。

【結果】定量PCR解析、ウェスタン解析を行ったところ、*sigD* mRNA量、σ^{D}タンパク質量は定常期で増加した。またσ^{D}タンパク質量が増加した結果、*hrdB* mRNA量も定常期で増加した。しかしながらσ^{HrdB}タンパク質量は培養を通して一定であった。これは定常期における細胞内プロテアーゼ活性の上昇や翻訳活性の低下に依るものであると考えられる。一方、*hrdB* 自己制御株では*hrdB* 転写はσ^{HrdB}によって制御されるため、*hrdB* mRNA量は生育を通して一定であり、その結果としてσ^{HrdB}タンパク質量は定常期で減少した。*hrdB* 自己制御株の生育速度を野生株と比較したところ、対数増殖期の生育速度は野生株とほぼ同程度であった。しかしながら*hrdB* 自己制御株は定常期への移行に異常が見られ、野生株では菌体量が維持されている培養時間でも溶菌のため菌体量が減少した。さらに定常期は抗生物質生産等の二次代謝を行う時期であるが、*hrdB* 自己制御株ではストレプトマイシン生産量が著しく低下していた。以上の結果より他の細菌とは異なり、*Streptomyces*属放線菌は*hrdB* をECFシグマ因子σ^{D}が生育を通して制御し、*hrdB* 転写量を適切に調節することによって定常期移行に備えるという新たな機構を有することが示唆された。

[1)]大谷ら、日本農芸化学会2011年度大会要旨集、p. 255

Streptomyces, sigma factor, stationary phase

講演番号：2C21p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ C校舎21会場

放線菌*Streptomyces griseus*の気中菌糸表層タンパク質遺伝子群の転写調節機構に関する解析

Transcriptional regulation of aerial mycelium coat protein genes in *Streptomyces griseus*

○山本祐梨子、平野節、肥後明佳、堀之内末治、大西康夫（東大院農生科･応生工）
○Yuriko Yamamoto, Setsu Hirano, Akiyoshi Higo, Sueharu Horinouchi, Yasuo Ohnishi (Tokyo Univ.)

【背景・目的】*Streptomyces*属放線菌では、栄養増殖細胞である基底菌糸から空中に向かって気中菌糸が伸長し、その先端部分が胞子に分化する。ChaplinやRodlinは気中菌糸の表層を覆う疎水性タンパク質であり、Chaplinは気中菌糸形成に必須であることが示されている。*Streptomyces coelicolor* A3(2)では、気中菌糸形成に必須なECFシグマ因子σ^{BldN}の制御下にある転写因子BldMの遺伝子破壊によって、一部のChaplin遺伝子の転写がなくなることが報告されているが、その転写制御機構の詳細は不明であった。我々の研究グループは、*Streptomyces griseus*の形態分化・二次代謝を誘導する微生物ホルモンA-ファクターに関する研究を長年行っており、A-ファクター依存性の転写因子AdpAの標的遺伝子として、σ^{BldN}のオルソログ（σ^{AdsA}）をコードする*adsA*を同定していた。また、*S. griseus*でもBldMオルソログ遺伝子（*SGR2759*）がσ^{AdsA}の標的であることを明らかにしていた。気中菌糸形成に関わる遺伝子発現制御カスケードにおいて、σ^{AdsA}およびBldMの下流にどのような遺伝子があるかに興味をもって実験を行ってきたところ、σ^{AdsA}とBldMの両者がChaplin遺伝子とRodlin遺伝子の転写に直接必要であることがわかったので発表する。
【方法・結果】*adsA*破壊株および*bldM*破壊株では気中菌糸が形成されないが、これらの株ではChaplin遺伝子とRodlin遺伝子の転写が大幅に減少していることがトランスクリプトーム解析によって示された。両破壊株で*chpA*、*chpD*、*chpE*、*chpG*、*chpH-chpC*、*rdlA*、*SGR1374-rdlB*の各プロモーターからの転写が減少していることがS1マッピングにより確認された。さらに、組換えBldMが*chpG*プロモーター以外のプロモーターの上流領域に結合することがゲルシフトアッセイにより示され、BldMが（*chpG* を除く）Chaplin、Rodlin遺伝子の転写を直接制御していることが強く示唆された。σ^{AdsA}の標的遺伝子が*bldM*だけであるなら、*adsA*破壊株において*bldM*を強制発現することで、気中菌糸形成が引き起こされると考えられるが、実際は気中菌糸が形成されず、*chpD*プロモーター以外のプロモーターからの転写も回復しなかった。そこで、これらのプロモーターの転写にσ^{AdsA}が直接関与している可能性を考え、*chpA*プロモーターについて、in vitro転写アッセイを行った。その結果、*chpA*プロモーターはσ^{AdsA}によって認識されること、またBldMの存在下において転写量が著しく増大することが示された。

以上の結果より、大部分のChaplinおよびRodlin遺伝子の転写には、転写活性化因子BldMだけでなく、ECFシグマ因子σ^{AdsA}が直接関与していることが示された。転写活性化因子とシグマ因子の両方が必要な転写活性化機構はこれまで知られていない。この機構によって、ChaplinおよびRodlin遺伝子の転写活性化が厳重に制御されているものと考えられる。

Streptomyces griseus, sigma factor, response regulator

講演番号:2C21p06
講演日時、会場:3月23日14:44～ C校舎21会場

土壌中で生育している放線菌*Streptomyces coelicolor*のキチン代謝における転写因子DasRの役割

The role of DasR in regulation of chitin metabolism of *Streptomyces coelicolor* grown in soil

○ナザリ ベナム[1,2]、小林 達彦[1]、藤井 毅[2]（[1]筑波大院・生命環境、[2]農環研）
○Behnam Nazari[1,2], Michihiko Kobayashi[1], Takeshi Fujii[2] ([1] Univ. Tsukuba, [2] NIAES Tsukuba)

【Introduction】The DasR regulator has been reported to be involved in regulation of numerous gene expressions in *Streptomyces coelicolor*. The major target genes are related to chitin metabolism. So far, however, the role of DasR in regulation of chitin metabolism in soil ecosystem is not clear. The purpose of this study is to assess the role of this regulatory gene in chitin metabolism in *S. coelicolor* grown in soil, where high level of induction of *dasR* is observed in comparison with liquid culture upon addition of chitin.

【Methods】Genome-wide microarray analysis was done using RNA extracted from a wild type strain or a *dasR* mutant strain of *S. coelicolor* grown in autoclaved soil amended with chitin. The high-density whole genome microarray of *S. coelicolor* designed and manufactured by Roche (Roche, Tokyo, Japan) was used. The RNA extracted from the soil culture was reverse transcribed, and the obtained cDNA was labeled and hybridized to the microarray according to the instruction of Roche-Nimblegen.

【Results】Addition of chitin into soil dramatically enhanced the induction of chitin and central metabolic pathways in the wild type strain. In the *dasR*-deletion mutant, on the other hand, the induction levels of all chitinase genes were reduced. Especially, disruption of *dasR* abolished the expression of *chiH*, demonstrating that the expression of *chiH* completely depends on DasR regulator. On the contrary, the induction of genes involved in the transport and metabolism of *N*-acetylglucosamine was enhanced in the *dasR* mutant.

chitin, DasR regulator, *Streptomyces coelicolor*

講演番号：2C21p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ C校舎21会場

o

放線菌*Streptomyces avermitilis*におけるDeoR型転写制御因子の機能解析

Comprehensive analysis of DeoR-family transcriptional regulators in *Streptomyces avermitilis*

○Ulanova Dana[1,2]、木谷 茂[1]、仁平 卓也[1]（[1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]高知大・総合研究セ）
○Dana Ulanova[1,2], Shigeru Kitani[1], Takuya Nihira[1] ([1]Osaka University, [2]Kochi University)

【Aim】

Streptomyces are soil-dwelling bacteria with complex life cycle and morphological differentiation. Morphological development is tightly linked with onset of secondary metabolism, which is important from the viewpoint of the medicine production. Transition between different developmental phases is controlled by complicated regulatory pathways involving many transcriptional regulators. The genome of *Streptomyces avermitilis*, a producer of anthelmintic compound avermectin, codes for more than 400 transcriptional regulatory proteins, among which functions of DeoR-family regulators remains unexplored. The aim of this study is to analyze a role of the DeoR-family regulators on morphological development and antibiotic production in *S. avermitilis*.

【Methods】

Ten putative DeoR-family regulatory genes are assigned in the genome of *S. avermitilis*. After strains harbouring an additional copy of each *deoR*-like gene under the *ermE* promoter were constructed, antibiotic production of the strains was assessed on complex and minimal media. Phenotypic changes thus observed was further analysed by gene disruption of the selected genes.

【Results】

Overexpression of eight DeoR-family transcriptional regulators did not significantly influence antibiotic production and morphology of *S. avermitilis* under the tested conditions. In the case of SAV3339 and SAV6536 genes, no transformants containing the additional gene copy were obtained, suggesting that overexpression of these genes may affect the growth on solid medium.

To elucidate the role of SAV3339 and SAV6536 genes, the respective mutant strains were constructed and analysed. The deletion of SAV3339 showed negative effect on growth of *S. avermitilis* on solid medium, which indicated the importance of SAV3339 in morphological differentiation. To our best knowledge, this is the first report of the DeoR-family regulator involved in *Streptomyces* morphological development.

Streptomyces, morphology, DeoR-family

講演番号：2C21p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎21会場

放線菌*Streptomyces avermitilis*の抗生物質生産を誘発する新型放線菌ホルモン

Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*

○木谷 茂、宮本聖子、高松 智[1]、Elisa Herawati、内田美帆[2]、長光 亨[2]、池田治生[1]、仁平卓也
（阪大・生物工学国際交流セ、[1]北里大・生命研、[2]北里大・薬学部）
○Shigeru Kitani, Kiyoko Miyamoto, Satoshi Takamatsu[1], Miho Uchida[1], Tohru Nagamitsu[1], Haruo Ikeda[1], Takuya Nihira (Osaka University, [1,2]Kitasato University)

【目的】

放線菌ホルモンは、抗生物質の生産を極低濃度で誘発するシグナル分子である。抗寄生虫薬エバーメクチン生産菌*S. avermitilis*のゲノムには、放線菌ホルモン受容体様遺伝子が存在するため、エバーメクチン生産を制御する放線菌ホルモンの存在が予想される。しかし、産業上重要な放線菌であるにも関わらず、*S. avermitilis*における放線菌ホルモンの化学構造は不明のままであった。

本研究では、*S. avermitilis*が産生する放線菌ホルモンの単離と構造決定を目指した。

【方法・結果】

ホルモン受容体様遺伝子*avaR1*（*sav3705*）に隣接して、アシルCoA酸化酵素遺伝子（*sav3706*; *aco*）が位置する。*aco*破壊株では、エバーメクチン生産が減少すると共に、AvaR1に結合してDNA結合能を失わせる物質の生産も大きく減少した。また、このエバーメクチン生産減少は、野生型株の培養抽出液添加により回復したのに対し、*aco*破壊株の培養抽出液、またはγ-ブチロラクトン型放線菌ホルモンの添加では回復しなかった。したがって、γ-ブチロラクトン型とは異なるタイプの放線菌ホルモンがエバーメクチン生産に関わることが予想された。そこで、1 トン培養液から、合成吸着剤、シリカゲルおよび逆相クロマトグラフィーにより、AvaR1リガンド（1.2 mg）を精製した。

高分解能質量分析により、AvaR1リガンドの分子式は$C_{13}H_{20}O_4$であり、各種NMR解析により、その平面構造を10-hydroxy-10-methyl-9-oxo-dodec-2-en-1,4-olideと決定した。このAvaR1リガンドは、ブテノライド骨格を有する新規化合物であった。４位の立体構造はCDスペクトルにより、4*S*と決定し、10位の立体構造は化学合成により、10*R*と決定した。4*S*,10*R*体（エバノライド）を*aco*破壊株の培養液に添加したところ、エバーメクチン生産を4 nMの濃度で誘発したことから、エバノライドがこれまでに報告のない新規な放線菌ホルモンであることが明らかとなった。

【文献】*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2011) 108:16410-5. *J. Antibiot.* (2011) doi: 10.1038/ja.2011.90.

Streptomyces hormone, autoregulator, avermectin

講演番号：2C21p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎21会場

Streptomyces avermitilis における放線菌ホルモン受容体様タンパク質 AvaL1 による二次代謝産物生合成遺伝子群の転写制御

The autoregulator-receptor homologue, AvaL1, controls expression of biosynthetic genes for secondary metabolite in *Streptomyces avermitilis*

○宮本 聖子[1,2]、木谷 茂[1]、池田 治生[2]、仁平 卓也[1]
（[1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]北里大・生命研）
○Kiyoko Miyamoto[1,2], Shigeru Kitani[1], Haruo Ikeda[2], Takuya Nihira[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kitasato Univ.)

【目的】

放線菌では、低分子シグナル物質である放線菌ホルモンを介した二次代謝制御機構が広く分布する。この制御系では、放線菌ホルモンとその受容体の相互作用が引き金となり、二次代謝関連遺伝子の発現が調節される。これまでに我々は、*S. avermitilis*より新規放線菌ホルモンであるエバノライドとその受容体タンパク質AvaR1を同定し、これらが本菌の代表的二次代謝産物エバーメクチンの生産を制御していることを明らかにした。しかし、本菌にはさらに2つの受容体様遺伝子（*avaL1*と*avaL2*）がコードされていることが、ゲノム情報により明らかとなった。

本研究では、AvaL1およびAvaL2の二次代謝への関与および制御下にある遺伝子を明らかにすることを目的とした。

【結果】

AvaL1またはAvaL2の二次代謝制御への関与を検討するため、*avaL1*および*avaL2*破壊株の表現型を解析した。*S. avermitilis*が有する32個の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの転写パターンを野生型株と比較した結果、*avaL1*破壊株では２つのクラスター（*sav2272-sav2304*と*sav7183-sav7187*）の転写量が増加していた。前者のクラスターには、同クラスター内遺伝子の転写調節に関わると予想されるSARP型転写制御遺伝子（*sav2301*）が存在した。また、SAV_2301が結合認識すると考えられるDNA配列を上記の２つのクラスターから見出したため、SAV_2301が両クラスターの発現を正に制御するのではないかと考えた。そこで、*sav2301*変異を*avaL1*破壊株に導入したところ、両クラスターの転写量増加は*sav2301*の機能破壊により抑圧された。また、*in vitro*実験において、AvaL1タンパク質が*sav2301*のプロモーター領域に結合したことから、AvaL1はSAV_2301の発現を調節して、ゲノム上の5.8 Mb離れた２つの遺伝子クラスターを同時に制御することが示唆された。*avaL2*破壊株では*avaL1*破壊株で見られた表現型が観察されなかったこと、AvaL1はAvaR1の発現制御に関与しないこと、エバノライドとは異なる物質がAvaL1のDNA結合能に影響を与えることから、AvaL1はAvaL2を経ずに２つの遺伝子クラスターを制御するとともに、エバノライド/AvaR1制御系とは独立した制御系を形成していると考えられる。

autoregulator, secondary metabolism, *Streptomyces avermitilis*

講演番号：2C21p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎21会場

放線菌*Streptomyces lavendulae* FRI-5におけるSARP型制御因子の二次代謝における役割

Functional analysis of three SARP-family regulators in secondary metabolism of *Streptomyces lavendulae* FRI-5

○Yohanes Novi KURNIAWAN, 木谷 茂、前田 亜紗、仁平 卓也（阪大・生物工学国際交流セ）
○Yohanes Novi KURNIAWAN, Shigeru Kitani, Asa Maeda, Takuya Nihira (Osaka University)

SARP (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein)-family proteins distributed widely among streptomycetes, and act as a pathway-specific regulator that activates a biosynthetic gene cluster for secondary metabolite at the bottom of the regulatory cascade. Typically, a SARP-family gene, often accompanied by other type of regulatory genes, is found within a biosynthetic gene cluster. *Streptomyces lavendulae* FRI-5 produces blue pigment (indigoidine), D-cycloserine, and nucleoside antibiotics as secondary metabolites. These productions are tightly regulated by the excellent signaling system with γ-butyrolactone autoregulator IM-2 and its cognate receptor FarA. The *farA*-flanking regions have many transcriptional regulatory genes and putative biosynthetic genes for secondary metabolites together with multiple SARP-family genes. Here, we characterized three SARP-family genes (*orfR*, *farR3*, and *farR4*) within the *far*-regulatory gene cluster and putative biosynthetic gene clusters.

Transcriptional analysis demonstrated that the three SARP-family genes are under the transcriptional control of IM-2, suggesting the possibility that they might be involved in regulatory mechanism for controlling production of secondary metabolites. As *orfR* is situated at the adjacent region of *lbpA*, which probably encodes an indigoidine biosynthetic gene, we assumed that *orfR* positively controls indigoidine production. However, disruption of *orfR* had no effect on production of indigoidine, D-cycloserine, and nucleoside antibiotics. *farR3* and *farR4* are divergently situated at the *farA*-upstream region in the *far*-regulatory gene cluster. A *farR3*/*farR4* double disruptant showed delayed and reduced production of indigoidine in comparison to those of the wild-type strain, indicating that either or both *farR3* and *farR4* genes are necessary for proper production of indigoidine. These results demonstrated that FarR3 and/or FarR4 at least function as an activator for indigoidine production.

SARP-family gene, indigoidine, *Streptomyces*

講演番号：2C21p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ C校舎21会場

メチロトローフ酵母のメタノール誘導性遺伝子発現における CbHap5p の分子特性

Molecular characterization of CbHap5p in methanol-inducible gene expression in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*

○小田沙織、新田暢久、ZHAI Zhenyu、由里本博也、阪井康能（京大院農・応用生命）
○Saori ODA, Nobuhisa NITTA, Zhenyu ZHAI, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI
(Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】メチロトローフ酵母 *Candida boidinii* は、メタノールを単一炭素源・エネルギー源として生育できる酵母であり、その強力なメタノール誘導性プロモーターを利用した異種遺伝子発現系が開発されている。メタノール誘導性遺伝子発現は、グルコース脱抑制とメタノール特異的誘導の２段階の制御を受けると考えられ、我々はこれまでに、*C. boidinii* におけるメタノール誘導性プロモーターの転写活性化に関わる転写因子として、グルコース脱抑制に関わる CbTrm2p、メタノール特異的誘導に関わる CbTrm1p, CbMpp1p および CbHap3p を同定してきた。この内 CbHap3p は、出芽酵母において呼吸代謝に必須な遺伝子の発現を制御することが知られている Hap2p/3p/4p/5p 複合体の構成因子 ScHap3p のホモログである。本研究では、*C. boidinii* における Hap 複合体の役割を解明するため、ScHap5p と高い相同性を示す転写因子 CbHap5p を同定し、その分子特性を解析した。
【方法と結果】*C. boidinii* のドラフトゲノム情報を基に CbHap5p を同定し、遺伝子破壊株（*Cbhap5Δ* 株）を作成した。*Cbhap5Δ* 株は、グルコースやグリセロールを炭素源とした場合、野生株と同様の生育を示したが、メタノールを単一炭素源とした場合のみに生育できないことが分かった。また、*Cbhap5Δ* 株では、複数のメタノール誘導性プロモーターの転写活性が野生株に比べて顕著に低下していた。一方、黄色蛍光タンパク質（YFP）を付加した CbHap5p の細胞内局在を観察したところ、CbHap5p は炭素源に関わらず核に局在していた。これらの結果は、*Cbhap3Δ* 株で見られた結果と概ね一致していた。以上の結果から、CbHap3p, CbHap5p を始めとする Hap 複合体は、メタノール誘導性遺伝子発現を正に制御する転写因子として重要な機能を果たしていることが示唆された。

Hap complex, methylotrophic yeast, *Candida boidinii*

講演番号：2C21p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎21会場

メチロトローフ酵母におけるメタノール応答性転写活性化因子 CbMpp1p の発現制御と核局在
Regulation of gene expression and nuclear localization of CbMpp1p in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*

○田畑一巌、辻貴大、ZHAI Zhenyu、由里本博也、阪井康能（京大院農・応用生命）
○Kazuyoshi TABATA, Takahiro TSUJI, Zhenyu ZHAI, Hiroya YURIMOTO, Yasuyosi SAKAI (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】メチロトローフ酵母では、メタノール培養時にメタノール代謝関連酵素が大量に誘導され、強力なメタノール誘導性遺伝子プロモーターは、本酵母を宿主とする異種遺伝子大量発現系に利用されている。我々はこれまでにメチロトローフ酵母 *Candida boidinii* において、メタノール誘導性遺伝子発現に関わる転写活性化因子 CbTrm1p、CbTrm2p、CbHap3p、CbMpp1p を取得してきた。この内 CbMpp1p は、自身の発現がグルコース抑制を受け、CbTrm1p 依存的にメタノールにより特異的に誘導され、核に局在することを明らかにした [1)]。本研究では、CbMpp1 自身のメタノール誘導性発現と核局在に、CbTrm1p、CbTrm2p および CbHap3p がどのように関与するかを調べた。
【方法と結果】メタノール培養時における CbTrm2p、CbHap3p の遺伝子破壊株（*Cbtrm2Δ*, *Cbhap3Δ*）での *CbMPP1* プロモーター活性を、酸性ホスファターゼをレポーターとして測定したところ、レポーター活性が両遺伝子破壊株において野生株と比較して大幅に低下していたことから、CbMpp1p の発現制御には CbTrm1p だけでなく、CbTrm2p、CbHap3p も関与することを明らかにした。次に、構成的に発現する *ACT1* プロモーター支配下に CbMpp1p と蛍光タンパク質 YFP の融合タンパク質を発現するプラスミドを作製し、*Cbtrm1Δ*株、*Cbtrm2Δ*株、*Cbhap3Δ* 株にそれぞれ導入した。核株のメタノール培養時における CbMpp1p の細胞内局在を観察した結果、CbMpp1p の核局在には、CbTrm1p、CbTrm2p が必要であるが、CbHap3p は関与しないことを明らかにした。逆に、*CbMPP1* 遺伝子破壊株のメタノール培養時における CbTrm1p および CbTrm2p の細胞内局在観察したところ、CbTrm1p は核に局在するのに対し、CbTrm2p は細胞質に拡散したことから、CbMpp1p と CbTrm2p が相互依存的に核局在することが分かった。

1）日本農芸化学会関西支部第 469 回講演会講演要旨集

transcriptional regulator, methylotrophic yeast, *Candida boidinii*

講演番号:2C21p13
講演日時、会場:3月23日16:21～ C校舎21会場

アルカン資化性酵母*Yarrowia lipolytica*のn-アルカン応答に関わる転写制御因子Yas3とリン脂質の結合に関する解析

Yas3, a transcription factor involved in *n*-alkane response, binds to phospholipids in the alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*

○小林　哲、福田　良一、太田　明徳（東大院・農生科・応生工）
○ Satoshi Kobayashi, Ryouichi Fukuda, Akinori Ohta (The University of Tokyo)

アルカン資化性酵母*Yarrowia lipolytica*においてn-アルカンの資化に関わるチトクロムP450をコードする*ALK1*の発現はn-アルカンにより誘導される。しかし疎水性物質であるn-アルカンがどのような機構で特定の遺伝子の発現に関与するかは不明である。我々はこれまでに、n-アルカンによる転写誘導には*ALK1*のプロモーター中の配列Alkane Responsive Element-1 (ARE1)およびARE1に結合する転写活性化因子であるYas1とYas2が関与すること、負の転写制御因子であるYas3がYas2と結合し、ARE1を介して*ALK1*の転写を抑制することを明らかにした。さらに、Yas3がn-アルカン存在時に核から小胞体へ局在を変化させることで標的遺伝子の転写が活性化されることを示唆した。しかしYas3の局在がどのような機構で制御されるのか、またn-アルカンがYas3の局在にどのように関わるのかについては不明であった。

そこでYas3がn-アルカン存在時に何らかのリガンドを認識して小胞体に局在する可能性を考え、現在Yas3のリガンドの探索をおこなっており、これまでにリン脂質であるホスファチジン酸がYas3と結合することを示していた。今回、Yas3がホスファチジン酸以外にホスフォイノシチドとも結合することが明らかとなったので報告する。

Yarrowia lipolytica, *n*-alkane, transcriptional regulation

講演番号：2C21p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎21会場

酵母シグナルペプチドライブラリーを用いたシグナルペプチド最適化ツールの開発

Development of signal peptide optimization tool using yeast signal peptide library

○原　翔一、菅原　知宏、佐原　健彦[1]、扇谷　悟[1]、河原崎　泰昌[2]、兒島　孝明、中野　秀雄　（名大院・生命農・生命技術、[1]産総研、[2]静岡県大院生活健康・食栄）

○Shoichi Hara, Tomohiro Sugahara, Takehiko Sahara[1], Satoru Ohgiya[1], Yasuaki Kawarasaki[2], Takaaki Kojima, Hideo Nakano （Dept. Bioeng , Grad. Sch. Bioagr. Sci.,Nagoya Univ. 、[1]AIST、[2]Grad. Sch. Nutri. Environ Sci. Univ. Shizuoka）

【目的】

酵母における異種タンパク質の分泌発現量・細胞表層提示量を向上させる手段として、シグナルペプチド配列を*Saccharomyces cerevisiae*由来のそれに置換する手法がしばしば用いられる。しかしながら、酵母における異種タンパク質の分泌発現レベルは、用いるシグナルペプチド配列と標的タンパク質の組み合わせによって変化し、両者の間には適合性が存在する。この適合性を網羅的に解析し、標的タンパク質に付加するシグナルペプチド配列を最適化するシステムの確立は、酵母による異種タンパク質発現をより有用なものにすると考えられる。

【方法】

本研究では、糸状菌*Aspergillus oryzae*由来β-ガラクトシダーゼをモデルタンパク質として、*S. cerevisiae*の分泌タンパク質・膜タンパク質由来のシグナルペプチド配列60種類を用いて、自身の目的とするタンパク質に対して最適なシグナルペプチド配列を網羅的に解析するシステムの確立を試みた。

【結果】

60 種類のシグナルペプチド配列をリモートカッター制限酵素で切断したのち、β-ガラクトシダーゼ遺伝子と介在配列なしでそれぞれ酵母発現ベクターに組み込み、酵母シグナルペプチドライブラリーを調製した。このライブラリーを酵母に形質転換したところ、種々のβ-ガラクトシダーゼの分泌能を保持するクローンを獲得した。現在、β-ガラクトシダーゼに対する最適なシグナルペプチドのスクリーニングを行っている。

yeast, signal peptide ,beta-galactosidase

講演番号：2C21p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ C校舎21会場

出芽酵母の遺伝子発現を高める*TPS1*ターミネーター

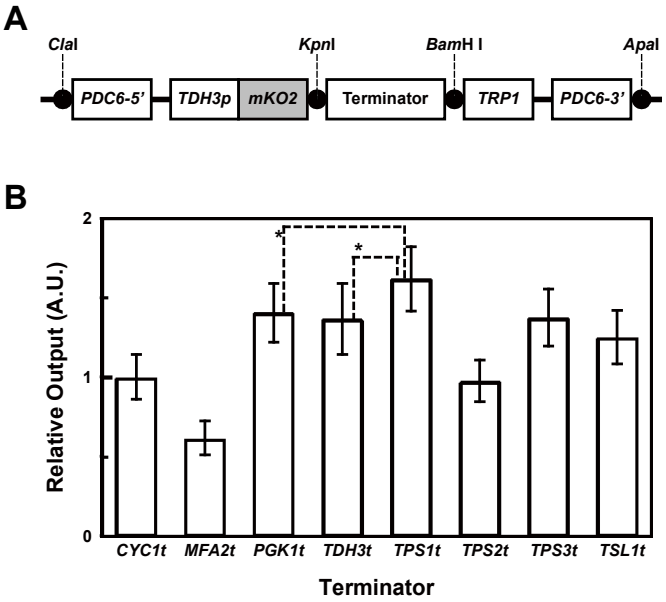
TPS1 terminator increases mRNA and protein yield in a *Saccharomyces cerevisiae* expression system

○山西 守、片平悟史、松山 崇（豊田中研）
○Mamoru Yamanishi, Satoshi Katahira, Takashi Matsuyama (TCRDL)

【目的】　遺伝子のターミネーターは、転写終了やpolyA付加などの役割に加え、3’-UTRとして、mRNA半減期・翻訳効率・細胞内局在などを介して遺伝子発現を調節している。出芽酵母において外来遺伝子の発現を高めるターミネーターを取得するために、長いmRNA半減期を持つことが判明している４種類のトレハロース合成経路遺伝子のターミネーター活性を評価した。

【方法】　出芽酵母において外来遺伝子の発現に常用される*TDH3*プロモーターの下流にmKO2蛍光遺伝子と８種類のターミネーターをそれぞれ配置したコンストラクト（*CYC1t*, *MFA2t*, *PGK1t*, *TDH3t*, *TPS1t*, *TPS2t*, *TPS3t*, *TSL1t*）を作製した（図１A）。これらのコンストラクトを表現型に影響しない*PDC6*遺伝子座に導入し、蛍光強度を指標としてターミネーター活性を評価した。続いて、定量PCRを行い、発現とmRNAの相関を検討した。最も高い活性を示した*TPS1*ターミネーターについては、*ADH1*プロモーターとGFP蛍光遺伝子を用い、汎用性を検討した。

【結果】　*TPS1*ターミネーターは、常用されている*CYC1*, *PGK1*, *TDH3*ターミネーターと比較して、タンパク質レベル（図１B）でもmRNAレベルでも高い活性を示した。また、プロモーターや蛍光遺伝子を置き換えても同様の結果を得た。これらの結果から、*TPS1*ターミネーターは出芽酵母の分子育種に広く有用と考えられた[1)]。



【参考文献】
1) M. Yamanishi, S. Katahira, T. Matsuyama*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(11), 2234-2236, 2011
*:corresponding author
e-mail:e1215@mosk.tytlabs.co.jp

図１．蛍光強度を指標としたターミネーター活性の比較。A, コンストラクト作製に用いた遺伝子カセット。B, 相対蛍光強度の比較。誤差範囲は、ウェルチのt検定の標準偏差を示す（P<0.05）。

Gene expression, Terminator, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：2C21p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ C校舎21会場

麹菌*Aspergillus oryzae*における染色体大領域重複技術の開発

Construction of large chromosomal duplications in *Aspergillus oryzae*

○高橋　理、佐藤敦史、半谷吉識、小熊哲哉（キッコーマン・研究開発本部）
○Tadashi Takahashi, Atsushi Sato, Yoshiki Hanya, Tetsuya Oguma (Kikkoman R&D Division)

麹菌の染色体を任意の領域で広範囲に渡ってタンデムに重複させる方法を開発した。これまでに変異により得られた麹菌株の解析結果から、染色体上の大きな領域の重複が、麹菌の醸造特性の向上に重要な役割を果たすことが明らかとなっている[1)]。また、γ線照射処理を行なった２倍体酵母株では、染色体上で重複や転座が起きた領域の境界付近に、共通の繰り返し配列が存在することが報告されている[2)]。そこで、染色体上の重複させたい領域の両端に共通の配列を配置し、共通配列内に切断を導入すれば、麹菌において、任意の領域でタンデムに目的領域が重複した株が得られるのではないかと考えた。染色体への重複の導入は、重複させたい領域の上流側および下流側の隣接領域にそれぞれ５‘側あるいは３’側を欠失させ、共通領域を残した *pyrG* マーカーを配置し、染色体への人為的な切断を導入した後に、最小培地で生育する株を選択することにより行なった。麹菌染色体への切断の導入はプロトプラスト-PEG 法と I-SceI を用いて行なった。この方法を用いて麹菌 *Aspergillus oryzae* を親株とし、8 番染色体のタンナーゼ遺伝子を含む約 200 kb 領域の重複株の取得を試みた。PCR、サザンハイブリダイゼーション、リアルタイム PCR 等による解析の結果、この株では約 200 kb に渡る領域が重複していることが確認された。続いて麹菌 *A. oryzae* の 2 番染色体上のアルカリプロテアーゼを含む領域を対象として重複実験を行った。その結果、2 番染色体上の約 700 kb の領域を重複した株の取得に成功した。この株では固体培養でのプロテアーゼ活性およびアミラーゼ活性の上昇が見られた。

引用文献

１）特許第4469014号　大規模ゲノム重複を保持する麹菌
２）Argueso et al. 2008　PNAS **105**: 11845―11850

Aspergillus oryzae, chromosome, duplication

講演番号：2C21p17
講演日時、会場：3月23日17:15～ C校舎21会場

麹菌酸性プロテアーゼ遺伝子のイントロンスプライシングに関する研究

The study of intron splicing of acid protease genes in *Aspergillus oryzae*

○石田　健、久保島　恵、宮本　雅史、森田　寛人、前田　浩、岡本　綾子、
山形　洋平、竹内　道雄（東農工大院・農）

○Ken Ishida, Megumi Kuboshima, Masashi Miyamoto, Hiroto Morita, Hiroshi Maeda, Ayako Okamoto, Youhei Yamagata, Michio Takeuchi (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】　麹菌ゲノム解析を行なった結果、麹菌ゲノムには126個のプロテアーゼ遺伝子が存在することが明らかになった。このうち酸性で作用するアスパルティックプロテアーゼ（APase）、ペプスタチン非感受性プロテアーゼ（PIP）、セリンタイプカルボキシペプチダーゼ（CPase）はそれぞれ11、3、12個存在し、酵素の活性中心モチーフも保存されていた。これらの遺伝子の発現について調べたところ、mRNAとして発現が確認されている遺伝子でもタンパク質として発現しないものも存在することが明らかになった。タンパク質として発現しない遺伝子については、イントロンのスプライシング異常が考えられたので、本研究ではゲノム解析で予測されたプロテアーゼ遺伝子のイントロンのスプライシングが正確に行なわれているかどうかについて検討した。

【方法】　麹菌酸性プロテアーゼの発現を調べるため、*A.oryzae* RIB40株をCzapek-Dox培地の窒素源を変えた各条件で培養し、得られた菌体からmRNAを精製して、ゲノムDNAが含まれないことを確認した後、Takara RNA PCR Kitを用いてcDNA合成を行なった。得られた cDNAを鋳型として、各プロテアーゼ遺伝子の特異的プライマーを用いてPCRを行なった。これらのPCR産物をプラスミドに挿入してライブラリーを作製し、イントロン中に含まれる制限酵素サイトを利用した制限酵素処理またはcDNAのシーケンスを行なった。これらの配列とアノテーションで予測された配列を比較することによりイントロンのスプライシングについて解析した。

【結果】　CPase遺伝子 AOEXE103のスプライシングは培地依存的にそのパターンが変化し、成熟mRNAの他、部分的にイントロンを含むmRNAも合成されることが明らかとなった。また、APase遺伝子AOEXE011はアノテーションで予測したものとは異なる位置でスプライスされており、これにより完全な活性中心モチーフを構成できるようになることが明らかになった。APase遺伝子AOEXE007は、ゲノム解析の結果から導かれたアノテーションからは活性中心モチーフは存在することが予測されたが、それとは異なった位置でスプライスが起こることにより翻訳が途中で終了し、全長の酵素タンパク質が合成されないために酵素活性を失っている可能性が示唆された。さらにPIP遺伝子AOEXE013はアノテーションのイントロン予測が異なることが明らかになった。

なお、本研究は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

keyword:*Aspergillus oryzae*, splicing, protease

講演番号：2C21p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ C校舎21会場

Aspergillus nidulans AmyR の誘導物質依存的なリン酸化と分解

Inducer-dependent phosphorylation and degradation of AmyR in *Aspergillus nidulans*

○森本翔太、大崎陽央、金丸京子、加藤雅士[1]、小林哲夫（名大院生命農学・生物機構、[1]名城大農・応生化）

○Shota Morimoto, Akio Osaki, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato[1], Tetsuo Kobayashi (Graduate Sch.of Bioagric.Sci, Nagoya Univ., [1]Sch. Agri. Sci., Meijo Univ.)

Aspergillus 属に普遍的に存在する転写因子 AmyR はデンプン分解酵素遺伝子群の転写を正に制御している。これまでに， AmyR は生理的誘導物質である isomaltose (IM)に応答して核移行し、転写を活性化することが明らかにされた。また, AmyR が他のタンパク質との複合体として存在すること、IM 依存的に複合体サブユニットの解離が起こること、核内でリン酸化を受けること、その後分解されることなども示されている。AmyR のIM依存的分解は、誘導条件から非誘導条件への移行の際、標的遺伝子の転写の停止が AmyR の分解により行われることを示唆している。このIM依存的リン酸化と分解のメカニズムを明らかにするため、本報告では各種 AmyR 変異体を用い解析した。

GFP-AmyR は野生型 AmyR と同等の性質を持ち、IM 依存的に核移行・分解される。核移行せずに細胞質に局在化する誘導体、常に核に局在化する誘導体を用いてIM 添加，非添加条件で経時的に GFP-AmyR の細胞内存在量の推移を測定したところ、 IM 依存的な AmyR の分解は IM 依存的な構造変化と核局在という二つの要因により引き起こされることが示された。核局在による不安定化はリン酸化が引き金となっている可能性があるため、6箇所の推定リン酸化部位を Ala 置換した変異体を作製した。その結果、T441A , S465A , S492A 変異はリン酸化に影響を与えず、また、変異 AmyR 導入株における生育、アミラーゼ生産、AmyR の安定性もWTと同等であった。一方、T424A, S436A, S445A 変異は著しい不安定化を引き起こし、変異の位置により分解パターンが異なっていた。この不安定性のためにこれら変異 AmyRのリン酸化については解析が不可能であったが、少なくともこの3箇所のアミノ酸残基は AmyR の構造維持に重要であると考えられた。これら3箇所の推定リン酸化部位を Glu 置換した変異体においては、WT 同様の安定性を示し, S445E については WT より高い転写活性化能を示した。今後、Glu 置換変異体のリン酸化や経時的な分解プロファイルの解析を行い、リン酸化と分解との関係を明らかにしていく予定である。

本研究の一部は、生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われたものである。

Aspergillus , AmyR, degradation

講演番号：2C21p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ C校舎21会場

*Aspergillus oryzae*の転写因子AraRの結合配列の決定

○川瀬　智美、今枝　美奈、加藤　雅士[1]、金丸　京子、小林　哲夫（名大院生命農・生物機構、[1]名城大・農）

○Tomomi Kawase, Mina Imaeda, Masashi Kato[1], Kyoko Kanamaru, Tetsuo Kobayashi (Graduate school of Bioagricultural Sciences, Nagoya University,[1]Meijo University)

【目的】麹菌*Aspergillus oryzae*の転写因子AraR(AoXlnR2)はZn2Cys6型のDNA結合タンパク質であり、キシラン・セルロース代謝を正に制御する転写因子であるXlnRのホモログである。DNAマイクロアレイ解析によると、AraRは誘導物質であるL-アラビノース に応答して50以上の遺伝子群の発現を正に制御する因子であり、制御下にはα-アラビノフラノシダーゼ、α-, β-ガラクトシダーゼなどを含む16種のグリコシドハイドロラーゼ遺伝子やL-アラビノース代謝系酵素遺伝子などが含まれる。また、AraRの標的遺伝子の一部はXlnRと重複している。これらから、AraRはXlnRと協調してヘミセルロース分解とペントース代謝に関与すると考えられる。本研究では、AraR、XlnRによるヘミセルロース分解・代謝系遺伝子群発現制御機構の詳細解明の一助とするため、現在まで明らかとなっていないAraRのDNA結合配列の決定を目指した。
【方法と結果】DNAマイクロアレイにより決定されたAraR制御下遺伝子のうち、発現誘導比が高い遺伝子としてL-アラビノースレダクターゼを選択し、本遺伝子のプロモーター領域断片をプローブとして、AraRのDNA結合ドメインとDNAとの結合をEMSAにより解析した。解析に用いたAraRのDNA結合ドメインは、Strep-tag IIをN末に付加した１から84アミノ酸までの領域であり、大腸菌を用いて生産・精製した。その結果、AraRは-295 ~-181と-192~-80の断片に結合することが明らかとなり、前者には5’-TTACCCG-3’ (アンチセンス鎖5’-CGGGTAA-3’)、後者には5’-CGGATAA-3’と5’-TTTTCCG-3’ (5’-CGGAAAA-3’)という類似配列が存在していた。また、これらの配列はAraR制御下遺伝子のプロモーター領域を用いて行ったMEME解析による推定配列5’-CGGA(G/A)AA-3’と類似していた。そこで、前者について推定配列に変異を導入したところ、AraRの結合が完全に消失した。本配列の前後を含む24 bpのDNA断片を用いて連続した3塩基ずつ変異を導入してEMSA解析を行った結果、5’-GAATTACCCGAA-3’ (5’-TTCGGGTAATTC-3’)の領域への変異導入でAraRの結合が完全に失われた。以上の結果と他のAraR制御下遺伝子プロモーターとの比較から、AraRの結合配列は5’-CGGNNAATT-3’ (5’-AATTNNCCG-3’)と考えられる。

本研究の一部は、生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われた。

Aspergillus oryzae, AraR, Binding sequence

講演番号：2C21p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ C校舎21会場

タイトル *Fusariumu aciaticum* のトリコテセン系かび毒生合成調節に関与する遺伝子の解明

Title Regulation of genes related to type B trichothecene biosynthesis in *Fusarium aciaticum*.

○岩橋 由美子、鈴木 忠宏（食総研）
○Yumiko Iwahashi, Tadahiro Suzuki(NFRI)

【目的】近年穀物等への汚染が懸念されるフザリウム属かびの生産するかび毒の量や生産の有無は、かびの生育環境によって大きく異なる事が知られている。本研究課題では、フザリウム属かび遺伝子の変動を検出する DNA マイクロアレイを作成し、環境によって変動するかび毒生産に関与する遺伝子を特定し、かび毒生産制御メカニズムの解明を目指す。本研究により、フザリウム属かびが万一生育しても、かび毒を生産しない条件を設定することで穀物類のかび毒汚染リスクの低減を図る。

【方法】1)使用菌株：*Fusarium asiaticum*(mo285)を用いた。

2)菌体の増殖率は一定であるが、トリコテセン系かび毒の一つであるデオキシニバレノール(DON)を生産しない培地の選択を行った。

3)選択した培地中で DON の生産が増大するような物質を検索した。

4)MIPS *F. graminearum* genome database(FGDB)を用いて *F. graminearum* 全遺伝子を搭載した DNA マイクロアレイ（Agilent4×44k ）を製作した。このマイクロアレイを用い、60mer のオリゴヌクレオチドをプローブとして、2 色法で検出・解析した。

【結果】*F.asiaticum* の DON 生産能について、培地及び添加物の影響を調べた。Modified CZAPEK 液体培地では DON の生産は抑制され、本培地にアグマチンを添加すると、DON の生産量が増加した。アグマチンを添加して培養した *F.asiaticum* から mRNA を調製し、無添加培養菌体からの mRNA をコントロールとして、製作した DNA マイクロアレイ上でハイブリダイズを行い、遺伝子の発現量の解析を行った。アグマチン添加によって誘導された遺伝子の多くは、DON 生産関連遺伝子の他には脂肪酸合成関連遺伝子、その他各種脱水素酵素、トランスポーター等であった。トランスポーター群は、添加したアグマチンの排出に関わるともに、DON の菌体外への放出に関与しているものと考えられた。

Fusarium, trichothecene,　DNAmicroarry

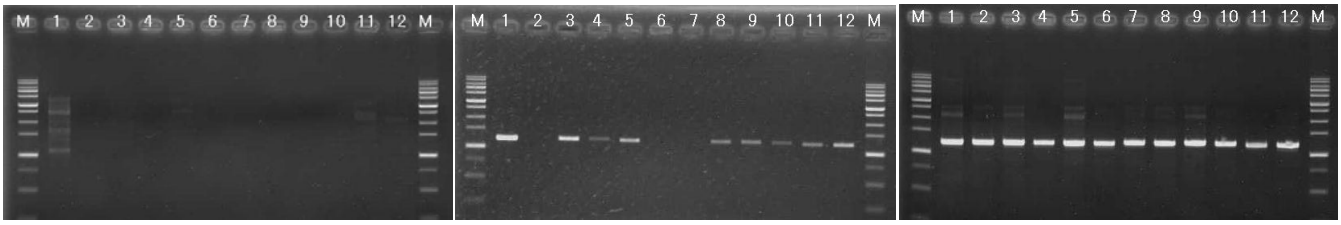
講演番号:2C22a01
講演日時、会場:3月23日09:00～ C校舎22会場

*Trichoderma*属のRPB2遺伝子解析におけるPCR条件最適化

Optimization of PCR conditions on RPB2 gene analysis of genus *Trichoderma*

○鈴木 里江子、鶴海 泰久、安藤 勝彦（NITE-BRC）
○Rieko SUZUKI, Yasuhisa TSURUMI, Katsuhiko ANDO (NITE-BRC)

【目的】*Trichoderma*属（有性世代*Hypocrea*属）は、酵素や二次代謝産物の生産、生物農薬、あるいは栽培キノコの病害菌として重要な糸状菌である。形態による種同定は困難で、リボゾームDNAのITS領域、翻訳伸長因子（TEF)、RNAポリメラーゼサブユニット2（RPB2）など複数の遺伝子配列をもとに再分類が進められている。遺伝子解析に使われるツールはISTH（International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy）がWebサイトで公開している。しかし、既存のプロトコルではRPB2遺伝子のPCR増幅に失敗する場合が多かったため、その改良を試みた。
【方法】NBRC株から*Trichoderma*属の主要クレードより12株を選別し、Chaverri *et al.*（2003）のプロトコルをもとに、PCR酵素や温度条件の変更、さらにnested PCRの導入を検討した。プライマーは、RPB2遺伝子で子嚢菌類の系統解析を行ったLiu *et al.*（1999）に従った。
【結果】Chaverri法（fRPB2-5F、fRPB2-7cR、鎖長約1,200bp）では増幅しない菌株が多く、増幅したバンドも不明瞭であった。そこで、fRPB2-7cRよりも下流のfRPB2-11aR（fRPB2-5Fからの鎖長が約2,000bp）を用いて1st PCRを試みた。電気泳動写真では増幅バンドを認められなかったが、PCR産物のDNA量を測定すると増幅が確認できた。次に2nd PCRとして、5’側は1st PCRと同じfRPB2-5Fで、3’側をfRPB2-7cRにしたsemi-nested PCRを行ったところ、12株すべてでクリアな増幅が得られた。一方、Komon-Zelazowska & Druzhinina が2009年にISTH webサイトで公開した推奨プロトコルでは、サイクル数を増やす改変によって半数以上の株で増幅を確認できたが、すべての株の増幅には至らず、抽出DNAを変えることによる再現性も高くなかった。用いた3つのプライマーは混合塩基を含んでおり、アニール・伸長がしづらい可能性がある。Semi-nested PCRを組み込んだ改良法では、1st PCRでわずかに増幅したDNA断片が2ndプライマーと特異的にアニールし、明瞭なバンドが得られたと推察された。



Chaverri法　　Komon-Zelazowska法　　改良法

【引用文献】

Liu YL, Whelen S, Hall BD. 1999. Mol Biol Evol 16:1799-1808.
Chaverri P, Castlebury LA, Overton BE, Samuels GJ. 2003. Mycologia 95:1100-1140.
Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS. 2009. PCR primers and protocols, ISTH website.

Taxonomy, PCR protocol, Trichoderma

講演番号：2C22a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ C校舎22会場

SINE型レトロトランスポゾン解析に基づくマツタケ類の分子進化の解明

SINE-based evolutionary analysis of *'matsutake'* mushrooms

○ 村田仁、太田祐子、根田仁、山口宗義、馬場崎勝彦、山田明義[1]（森林総研、[1]信大）
H. Murata, Y. Ota, H. Neda, M. Yamaguchi, A. Yamada[1], K. Babasaki (FFPRI, [1]Shinshu U)

【目的】マツタケ *Tricholoma matsutake* 及びその近縁種（=マツタケ類）は、樹木と「菌根」と呼ばれる器官を形成して共生する担子菌きのこで、北半球に広く分布するが、地域ごとに種や共生樹種が異なる。私達は、担子菌で初めて SINE 型レトロトランスポゾンを単離した。本研究では、生態を反映する指標としてレトロトランスポゾンに着目し、マツタケ類の分子進化を解析した。
【方法】担子菌門が特異的に有するSINE 2量体「*AbaMEG1-AbaMEG2*」をマーカーに用いた。: (1) マツタケ類を含むキシメジ属*Tricholoma* 18種81菌株を対象に、中立変異を指標にした系統解析を行うと共に、(2) *AbaMEG1-AbaMEG2*の局在部位の構造解析を解析した。これらの結果を、(3) マツタケ類が特異的に有するLTR型レトロトランスポゾン「*marY1*」とLINE型「*marY2N*」の一ゲノム中に在るコピー数定量解析結果と照らし合わせて考察した。
【結果】*AbaMEG1-AbaMEG2*の中立変異解析の結果、針葉樹に共生するマツタケ類*T. matsutake*（極東、北欧）、*T. magnivelare*（北米西海岸）、*T. anatolicum*（地中海沿岸地域）、及び*Tricholoma* sp.（メキシコ）が互いに近縁であることが明らかになった。特に、*T. matsutake*、*T. anatolicum*、*Tricholoma* sp.（メキシコ）は互いにきわめて近縁である。一方、*T. magnivelare*は上記針葉樹型とは若干距離をおく。広葉樹共生型の*T. fulvocastaneum*と*T. bakamatsutake*は共に極東に生息し、針葉樹・広葉樹からなる混合林地ではしばしば*T. matsutake*とともに生息するが、*T. magnivelare*など世界に分布する針葉樹共生型マツタケ類と比較すると*T. matsutake*とは遠縁に位置づけられた。ところで、マツタケ類では、*AbaMEG1-AbaMEG2*は共通にrDNA外のゲノム領域に1コピーのみ存在する。この局在プロフィールは、rDNA内に多コピー有するシイタケ・ヒラタケ・マイタケ・エノキタケなど多くのきのこ類のそれと相反する。マツタケ類における*AbaMEG1-AbaMEG2*の局在部位を構造解析した結果、本SINE2量体はSINEクラスターに位置した。そして、このクラスターに在る様々なSINEの配置が、針葉樹共生型と広葉樹共生型マツタケ類で明確に異なる。また、針葉樹型マツタケ類の中でも、*T. matsutake*、*T. anatolicum*、及び*Tricholoma* sp.（メキシコ）はSINEクラスターを保存し共有するが、北米西海岸だけに生息する*T. magnivelare*は種特異的なSINEsをクラスターに有する。同様に広葉樹共生型の*T. fulvocastaneum*と*T. bakamatsutake*間でも軽微な配置特性の違いがあった。以上の結果は、翻訳領域を有するマツタケ類特異的レトロトランスポゾン*marY1*及び*marY2N*の1ゲノム当たりのコピー数定量解析結果とも相関する。つまり、試験した全ての針葉樹共生型マツタケ類は共通に、広葉樹共生型よりも*marY1*を約10^3多く有した。また、*marY2N*は*T. matsutake*に種特異的にコピー数が高かった。本結果から、我々は、針葉樹共生型と広葉樹共生型マツタケ類には、それぞれ「最も近い共通祖先種」が存在し、これら祖先種が生息域を広げた後、特定の生態・生息地域で現有の個々の種に進化したと考察した。

Fungi, Transposons, Evolution

講演番号：2C22a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ C校舎22会場

一細胞レベルの解析によるプラスミドの土壌細菌集団中における真の宿主域の決定

True host ranges of plasmids determined by a single cell analysis in soil microbial community.

○新谷 政己[1,2]，松井 一泰[2]，井上 潤一[1]，野尻 秀昭[2]，大熊 盛也[1]（[1]理研・BRC-JCM, [2]東大・生物工学セ）

○Masaki Shintani[1,2], Kazuhiro Matsui[2], Jun-ichi Inoue[1], Hideaki Nojiri[2], Moriya Ohkuma[1] ([1]Riken, BRC-JCM, [2]Univ Tokyo, BRC)

【目的】プラスミドは様々な細菌間を接合伝達によって移動する遺伝因子である．プラスミドが宿主とできる細菌の種類（＝宿主域）については，古くより重要な性質として調べられており，細菌の門・網を越えて接合伝達可能な「広宿主域」プラスミドと，同一の属・種細菌間のみを接合伝達可能な「狭宿主域」プラスミドとに大別されてきた．しかしこれらの宿主域は，培養法に依存した接合実験によって決定されたため，未培養・難培養性細菌を多数含む実環境中の宿主域を必ずしも正確に反映していない可能性が高い．本研究では，供与菌と土壌細菌集団とを混合し，培養を介さずに一細胞レベルで接合伝達体を検出・分離することで，プラスミドの真の宿主域の解明を目指した．

【方法】「広宿主域」プラスミドのグループとして知られる不和合性（Inc）P-1 群に属する pBP136 と，「狭宿主域」プラスミドグループとして知られる IncP-7 群に属する pCAR1 を解析対象とし，GFP を接合伝達体でのみ発現するシステムを導入した．その後，*Pseudomonas putida* KT2440 派生株を供与菌として土壌細菌集団と混合し，出現した接合伝達体を，緑色蛍光を指標にしたフローサイトメトリーによって一細胞ずつ検出・分離した．分離後の接合伝達体一細胞を，①培養せずに Phi29 ポリメラーゼによって直接全ゲノムを増幅後遺伝子解析，②培養後にゲノムを抽出して遺伝子解析（対照実験），を行った．遺伝子解析は，各プラスミド上の複数の領域を PCR で増幅することでプラスミドの有無を確認し，別箇に 16S rRNA 遺伝子を増幅して，その一部の塩基配列を決定することで接合伝達体の属種の同定を行った．

【結果】pBP136 については，①②双方から *Proteobacteria* 門に属する様々な接合伝達体が得られたが，①の手法からは *Bacteroidetes* 門，*Firmicutes* 門に属する細菌も得られた．一方，pCAR1 は *γ-Proteobacteria* 綱の *Pseudomonas* 属細菌を宿主とすることが従来知られており，①②双方の手法から得られた多くの接合伝達体も *Pseudomonas* 属細菌であった．興味深いことに①の手法から *β-Proteobacteria* 綱に属する *Defltia* 属細菌と推定される宿主を得ることに成功した．以前の研究で pCAR1 や類似のプラスミドが *β-Proteobacteria* 綱の細菌を宿主とできなかったことを考慮する[1, 2)]と，このような接合伝達体は，従来の手法では得られない可能性が高い．本研究の結果は，土壌由来の細菌集団内におけるプラスミドの接合伝達現象を一細胞レベルで解析することによって，いわゆる「狭宿主域」プラスミドが，網の異なる細菌に接合伝達しうる可能性を示す初めての例と考えている．

(1) Shintani et al., 2006, Appl. Environ. Microbiol. 72:3206, (2) Yano et al., 2010. J. Bacteriol. 192:4337.

plasmid, horizontal gene transfer, single-cell analysis

講演番号：2C22a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ C校舎22会場

鍾乳洞より分離した新種細菌*Jeongeupia* sp. HS-3 の分類同定

Identification of a novel bacterium *Jeongeupia* sp. HS-3 isolated from a limestone cave

○中ノ森 慧子、福本 圭、大田 彩、水野 康平、古川 壮一[1]、深瀬 栄[1]、平山 悟[1]、荻原 博和[1]、森永 康[1]、柘植 丈治[2]、田中 賢二[3]（北九州高専・物化，[1]日大・生物資，[2]東工大・総理工，[3]近大・産理工）

○Satoko Nakanomori, Kei Fukumoto, Aya Ohta, Kouhei Mizuno, Soichi Furukawa[1], Sakae Fukase[1], Satoru Hirayama[1], Hirokazu Ogiwara[1], Yasushi Morinaga[1], Takeharu Tsuge[2], Kenji Tanaka[3] (Kitakyushu National College of Technology, [1]Nihon University, [2]Tokyo Institute of Technology, [3] Kinki University)

【目的】石灰岩（$CaCO_3$）が浸食されて作られた、カルスト台地の鍾乳洞より分離したHS-3は、16S rDNA 全長解析の結果、*Betaproteobacteria*目*Neisseriaceae*科に属する新規細菌であることがわかった。HS-3を含むグループの性状は未知な点が多く、分離環境に適応した特徴や、産業上有用な脂質蓄積などに興味が持たれる。本研究では、HS-3と最近縁種であり、山の土壌よりセルロース分解菌として分離された*Jeongeupia naejangsanensis* KCTC 22633^{T}と比較をしながら分類研究を行った。

【方法・結果】Nile-Red染色による脂質蓄積菌として鍾乳洞より分離されたHS-3は、16S rRNA遺伝子全長解析の結果、*J. naejangsanensis* KCTC 22633^{T}との相同性が98%と最も高く、近年発見された*Neisseriaceae*科の新しいグループに属していた。HS-3はグラム陰性絶対好気性桿菌であった。生育至適温度は他の近縁種より低い24℃で、40℃での生育はなく、至適pHは8.5であった。また、固体培養時にのみ独立栄養代謝が確認された。分離源の鍾乳洞は気温16.5℃、壁面の浸透水のpHは8.3であり、有機炭素源が少なく$CaCO_3$ が豊富であるなどの条件に適応している可能性が示唆される。GC含量は61.3%、キノンタイプQ-8であった。*J. naejangsanensis* KCTC 22633^{T}は通性嫌気性桿菌で、生育至適温度は30℃、pH6.0～9.0であった。両菌株のDNA-DNA hybridizationの相同性は42.5%であった。API kitを用いた66種類の炭素源資化性試験により、HS-3はグループ共通の性質であるN-Acetylglucosamineを資化したが、最近縁種の*J. naejangsanensis*のようにセルロースは資化しなかった。また、酵素活性試験（API ZYM kit）においても強いN-acetyl-ß-glucosaminidaseを示した。抗生物質耐性の比較においても両菌株の感受性に違いが見られた。HS-3の主な細胞脂肪酸成分は$C_{16:0}$と（$C_{16:1}\omega7c$ and/or iso-$C_{15:0}$ 2-OH）であったが、少なからず奇数系脂肪酸も検出された（$C_{15:0}$、$C_{15:1}\omega6c$、Cyclo $C_{17:0}$）。以上の結果より、HS-3は*Jeongeupia*属の新種であると言える。16S rRNA遺伝子配列はGenbank に登録（No. AB626974）、本株を日本と韓国の菌株保存機関に寄託した(NBRC 108274^T= KCTC 23748^T)。

Neisseriaceae, *Jeongeupia*, 16S rDNA

講演番号：2C22a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ C校舎22会場

カブトムシ幼虫の腸内に特異的な細菌の探索

Search of *T.dichotoma* specific bacteria in digestive tract of larva

和田 典子，竹石 英伯[1]，岩淵 範之[1]，砂入 道夫[1]，中嶋 睦安[1]，○安齋 寛（日大・短生，[1]日大生資科・応生科）

Noriko Wada, Hidetaka Takeishi[1], Noriyuki Iwabuchi[1], Michio Sunairi[1], Mutsuyasu Nakajima[1], ○Hirosi Anzai（Bio sci. Jun., Nihon Univ., [1]Dept. Appl. Bio Sci., Nihon Univ.）

【目的】森林性昆虫は，森林生態系の中で，消費者および分解者として森林バイオマスの循環に大きな役割を果たしていると考えられている。しかし，その機能が昆虫自身の能力か，共生する微生物に依存しているのか，またはその両方であるか，その解析はあまり行われていない。
本研究グループでは，雑木林に生息し，植物遺体などを摂食する腐食性のカブトムシ幼虫を用い，幼虫腸内の生理・生化学的特性や消化吸収に関与しているだろう腸内微生物を様々な手法を用いて検討を重ねてきた。現在までの結果としては，カブトムシ幼虫の腸内はアルカリ性で多糖類を分解する酵素があり，中腸，後腸共に低酸素濃度で酢酸が検出され，さらに後腸では，メタンと水素が存在する環境であった。本研究では,このようなカブトムシ幼虫の腸内環境で特異的に存在する細菌について腸管部位別に分析を行い，その特定を試みた。

【方法】腐葉土を餌として飼育した 3 齢幼虫の腸管を 10 分割(中腸 7 分割・後腸 3 分割)し，各部位から内容物と腸管壁に分離して DNA を抽出した。また 1 齢から 3 齢幼虫の比較のため，腸管を中腸・後腸に 2 分割し，DNA 抽出操作を行った。次に 16S rDNA の V3 領域を用い PCR-DGGE を行った。さらに，16S rDNA を T-RFLP 用蛍光プライマーを用いてPCR増幅し，1000bp の増幅断片を精製後，再PCRを行ってから制限酵素 *Bsl* I で消化し，その断片のプロファイルから含まれる細菌の分類群を推定した。さらに PCR-DGGE 法と T-RFLP 法での解析結果に共通する 16S rDNA 断片を検出するため，双方のプライマーを組み合わせた PCR を行った。

【結果】PCR-DGGE 法と T-RFLP 法共に，中腸にのみ特異的に存在する 16S rDNA 断片が検出された。そこで，PCR-DGGE の Forward プライマーと T-RFLP の Reverse プライマーを使用して増幅した DNA を *Bsl* I で制限酵素処理したところ，特徴的な 1 本の断片が得られ，両方の塩基配列が含まれていることが明らかになった。この 16S rDNA の断片を持つ細菌は，カブトムシ幼虫腸内において重要な働きをしていると考えられるが，既知の配列との相同性が極めて低く現在検討を進めている。

beetle , bacteria , digestive tract

講演番号:2C22a06
講演日時、会場:3月23日10:05～ C校舎22会場

津波で被災した海洋微生物コレクションの復旧と再構築

Recovery and reconstruction of marine microbial collection damaged by Tsunami

○笠井宏朗、中島琢自、勝田麻津子、松本厚子、野中健一、相澤好治、[1]紙野圭、[1]関口弘志 [1]藤田信之（北里大、[1]製品評価技術基盤機構）

○Hiroaki Kasai, Takuji Nakashima, Atsuko Katsuta, Atsuko Matsumoto, Ken-ichi Nonaka, Yoshiharu Aizawa, Kei Kamino[1], Hiroshi Sekiguchi[1], Nobuyuki Fujita[1] (Kitasato Univ, [1]NITE)

【目的】北里大学海洋バイオテクノロジー釜石研究所は、2011年3月11日の東日本大震災に伴う津波によって甚大な被害を受けた。特に、海洋微生物コレクションは、ほとんどが超低温フリーザーで凍結保存されていたため、津波による全電源の喪失に伴い、全滅の危機に瀕した。海洋微生物のコレクションは、旧海洋バイオ研による約20年及びその後の収集活動によって海洋試料から採集保存された糸状菌、酵母、放線菌、細菌など多様な菌種からなり、分類学的に希少な株のみならず、物質生産株、難分解性物質分解株などをふくむ、約5万株の海洋微生物で構成されていた。本報告は、広域に及んだ震災被害で、極めて困難な状況下、海洋微生物を、迅速に再培養、再保存が可能な場所に移送し、一株でも多くの菌株を復旧し、利用可能な形に再構成するために行われた救済活動についての報告である。

【方法】研究所へのアクセス道路の回復、輸送手段の確保、移送菌株リストの作成を待って、3月25日に約4万株の菌株を、(独）製品評価技術基盤機構（NITE、東京都渋谷区）に、トラック輸送した。ドライアイスの手配が困難であったため、東京には約12時間をかけて、常温輸送となった。到着後、全ての試料は、再培養するまで、4度で保存した。NITEの実験室、培養装置、オートクレーブ及び菌株保存用のフリーザーなど微生物の培養保存に関わる実験機器を拝借し、重要度の高い株から順に、再培養し、生存が確認できた株について、凍結保存を行った。再培養については、菌株データーベースを参照し、できるだけ適した培地を用いた。培養は、融解したグリセロール懸濁菌体を寒天培地上にスポットし、保存に十分な生育に達するまで27度で培養した。生育したコロニーをかきとって、グリセール溶液に懸濁し、-80度のフリーザーで凍結保存した。

【結果】3月25日に震災後初めて超低温フリーザーを開けた時点で、凍結バイアルは、一部を除いてほぼ全てが融けた状態であった。再培養後、生存が確認されたのは、全体の約7割の株であった。生存率は、菌種によって異なっており、放線菌類は8割以上が生存していたが、乳酸菌の生存率は6割弱に留まった。現在、さらに詳細に生存情報を分析している。生存が確認された菌株については、利活用に向けて、データーベースを再構築している。また、救済した菌株の一部は被災地支援活動に活用されている。

Marine microbial resources, Freezing preservation, Tsunami disaster reconstruction

講演番号：2C22a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ C校舎22会場

Stenotrophomonas maltophilia の Biovar Ⅱ 群の分類学的研究

Taxonomic study of *Stneotrophomonas maltophilia* Biovar Ⅱ

○黒川　祐菜、田中　尚人[1]、飯野　隆夫[2]、小迫　芳正[2]、大熊　盛也[2]、佐藤　英一、岡田　早苗（東農大応生科・化学、[1]東農大・菌株、[2]理研BRC・JCM）

○Yuna Kurokawa, Naoto Tanaka[1], Takao Iino[2], Yoshimasa Kosako[2], Moriya Ohkuma[2], Eiichi Satoh, Sanae Okada (Dept. Appl. Biol. Chem, Tokyo Univ. Agr., [1]NRIC, Tokyo Univ. Agr., [2]JCM, RIKEN BRC)

【目的】*Stenotrophomonas maltophilia* は 1993 年に *Xanthomonas* 属から新属提唱されたグラム陰性、好気性の桿菌である。特徴のひとつとして臨床・自然環境における広範囲の分布が挙げられることから、1999 年 Hauben らは *S. maltophilia* 108 株を AFLP 法にて解析し、分離源と同様に遺伝子パターンも多様であることを報告した。

しかし近年 *Stenotrophomonas* 属は新種提唱が相次いでおり、属内に新たな分類体系が構築されている。これを受け、筆者らは *S. maltophilia* およびその synonym の計 106 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析を行った。その結果、*S. maltophilia* の 14 株が基準株よりも他種に近縁であることが明らかになった。そして、そのうち 7 株は過去 *S. maltophilia* とは別種の可能性があると報告された Biovar Ⅱ[1)]群の株であった。Biovar Ⅱ 群は *S. maltophilia* の特徴であるメチオニン要求性を持たない株の暫定的な分類群として提唱されたが、いまだ検討はされていない。そこで、*S. maltophilia* の Biovar Ⅱ 群の分類学的位置について明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】Biovar Ⅱ 群 7 株とその近縁種および *S. maltophilia* 基準株を用いて表現型・化学分類学的試験を行った。その結果、Biovar Ⅱ 群は表現型においては D-sucrose や inulin など 11 種の糖類発酵性および α-glucosidase 活性がないこと、菌体脂肪酸においては iso-C16:0 や iso-C15:0、iso-C12:0 3-OH が存在することなど、*S. maltophilia* 基準株と異なる性質であることが明らかになった。そして、表現型は Simple matching 法、化学分類学的試験は Euclid 法にてクラスター解析したところ、Biovar Ⅱ 株は両試験とも 16S rRNA 遺伝子系統解析と同様に他種とクラスターを形成することが確認された。

次に、Biovar Ⅱ 株と *S. maltophilia* 基準株および近縁種との DNA-DNA hybridization を行った。その結果、JCM 1981 は近縁種である *S. terrae* DSM 18941^T と、現在同種の指標とされる 70 %を超える相同性を示した。さらに IAM 12672 は試験を行ったすべての株との相同性が 30 ～ 59 %と低かったことから、新種の可能性が高いことが確認された。これにより、Biovar Ⅱ 内には複数種が混在することが示唆された。

1) Ikemoto *et al.*, Int. J. Syst. Bacteriol. 30:437-447.

Stenotrophomonas maltophilia, Biovar Ⅱ, Taxonomic study

講演番号：2C22a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ C校舎22会場

好酸性硝化リアクターからの従属栄養細菌の分離および系統解析

Isolation and phylogenetic analysis of heterotrophic bacteria from an acidophilic nitrifying bioreactor

○大石 健太郎、花田晶子、山田 剛史、平石 明（豊橋技科大・環境生命工学）
○Kentarou Oishi, Akiko Hanada, Takeshi Yamada, Akira Hiraishi (Dept. Environ. Life Sci., Toyohashi Univ. of Tech.)

【目的】硝化反応は一般に pH が中性の条件下で起こるが、本研究室では pH 2.7-4.0 の酸性条件下でアンモニア酸化活性を有する好酸性硝化リアクターを構築した。硝化反応に関わるアンモニア酸化微生物は、一般に CO_2 を唯一の炭素源とする独立栄養性であるが、空気中の CO_2 の水中への溶け込みは酸性条件では悪いため、酸性硝化反応においては共存する従属栄養細菌が CO_2 供給の役割を担っていることが考えられる。したがって、酸性硝化リアクター内の従属栄養細菌の特性を明らかにすることは酸性硝化プロセスを理解する上で重要であると思われる。本研究では、貧栄養培地を用いて好酸性硝化リアクター中の従属栄養細菌を分離し、系統・分類学的解析を行った。
【方法】好酸性硝化リアクターから採取した汚泥を植種源として、無機栄養培地に 0.01 %酵母エキスを添加したゲランガム平板培地 (pH 4.0) を用いて、25 ℃、1 ヶ月間の培養を行った。その後、生育したコロニーを常法に従って純粋分離操作を行い、PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅と RFLP 解析および塩基配列に基づく系統解析を行った。
【結果】好酸性硝化リアクターから貧栄養培地用いて分離された 60 菌株を試験した。16S rRNA 遺伝子の RFLP 解析を行ったところ OTU-1 (59 株) 、OTU-2 (1 株) の 2 群に分類された。OTU-1 の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の最類縁配列は *Frankia alni* ACN14a (CT573213) であり、相同性は 94.0 %であった。OTU-2 の分離株における最類縁配列は *Leifsonia xyli subsp cynodontis* JCM 9733^T (AB016985) であり、相同性は 97.4%であった。別途行った好酸性硝化リアクターの 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリーの結果から、*Frankia* 属の細菌が全クローンの 4 %を占めることが示されたが、この *Frankia* クローンと OTU-1 の 16S rRNA 遺伝子における相同性は 99.3%であった。顕微鏡による形態観察を行ったところ、OTU-1 の菌株は非運動性の桿菌であった。

Acidfilic nitrifying, *Frankia*, *Leifsonia*

講演番号：2C22a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ C校舎22会場

タイトル：脱窒細菌の細胞レベルにおける簡易生菌数計測法の開発

Title: Development of a simple method for counting viable cells of denitrifying bacteria at single cell resolution

○川島 淳一、山田剛史、平石明（豊橋技科大・環境生命工学）

○Jyunichi Kawashima, Takeshi Yamada, Akira Hiraishi (Dept. Environ. Life Sci., Toyohashi Univ. of Tech.)

【目的】現在、生物学的脱窒プロセスは水質指標のみで管理されており、ひとたび処理効率が悪化した場合、回復に多大な労力を必要する。この問題を回避するためには、プロセス内で硝酸除去を担う脱窒細菌の生菌数も指標化し、水質と微生物の両輪で行う相互補完的な管理体制が望ましい。しかしながら、現在のところ、簡便・安価に脱窒細菌の生菌数を細胞レベルで計測する技術は知られていない。そこで我々は、好気性細菌の呼吸活性菌計測方法で用いられる5-cyano-2,3-ditolyl-2-tetrazolium chloride（CTC）染色法を脱窒細菌の生菌数計測に応用することを考案した。本研究では、脱窒細菌の数種の純粋株および生物学的脱窒プロセス内の汚泥を用いて、硝酸呼吸由来のCTC還元反応の最適条件の検討を行ったので報告する。

【方法】数種の脱窒細菌および脱窒汚泥を用いて、硝酸呼吸由来のCTC還元反応の最適条件を評価した。CTC反応の最適条件を検討するために、CTC濃度、反応時間および呼吸阻害剤の種類や濃度をそれぞれ操作した。硝酸呼吸下のCTC反応は、アルゴンガスを封入した密栓バイアル内で行った。CTC染色率は、蛍光顕微鏡下で計測したCTC染色数を全菌染色数で除して算出した。

【結果】数種の脱窒細菌および脱窒汚泥を用いてCTC法の最適化を行った。その結果、CTC濃度を上げることによって、脱窒細菌の純粋株および活性汚泥ともに、80%以上の染色率で硝酸呼吸由来の脱窒細菌のCTCフォルマザンの蛍光を得ることができた。短時間で安価に活性汚泥内の脱窒細菌の生菌数を計測するには、diethyldithio carbamate （0.5 mM）を添加することにより、CTC濃度（0.1 mM）、CTC反応時間（1時間）で60～80 %以上の脱窒細菌の生菌数を測定できることが分かった。

Keyword1, Keyword2, Keyword3 CTC、denitrifying bacterium、biological denitrification processes

講演番号:2C22a10
講演日時、会場:3月23日10:49～ C校舎22会場

タイトル　好気的条件下で脱窒を行う能力を有する堆肥由来細菌の単離と同定

Title　Isolation and identification of compost -dwelling bacteria capable of denitrification under aerobic conditions

○大坪和香子、尾形裕明、宮内啓介、遠藤銀朗（東北学院大・工）

○Wakako Ikeda-Ohtsubo, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo (Tohoku Gakuin Univ.)

【目的】堆肥化過程では、硝化・脱窒細菌の作用によりアンモニウム態窒素の硝酸態および亜硝酸態窒素への変換および硝酸態、亜硝酸態窒素の窒素ガスへの還元が起こる。家畜糞尿等の窒素含量の多い原料を使用した際に、微好気状態の堆肥中では脱窒反応の阻害による N_2O 発生が懸念される。本研究では、堆肥中に存在する培養可能な脱窒細菌に関する知見を得るために、微好気条件においても脱窒を行う細菌株を、養豚場廃棄物由来の堆肥サンプルから単離スクリーニングした。

【方法と結果】コハク酸およびクエン酸を炭素源として加えたブロモチモールブルー(BTB)プレート上に堆肥懸濁液を段階希釈したものを塗布し、26℃でインキュベートした。青いコロニーを形成するために要する日数を基に、グループF（Fast)、M（Moderate)、S（Slow）として分類し、16S rRNA遺伝子の塩基配列決定により細菌種を同定したところ、各グループ間および堆肥化過程の前半と後半において優勢種は大きく異なっていた。好熱条件の堆肥化過程初期ではグループFに分類されるアルファプロテオバクテリアおよびガンマプロテオバクテリアに属す脱窒細菌が優勢的であったのに対し、冷温条件の堆肥化過程後期では、グループSに分類されるベータプロテオバクテリアに属する脱窒細菌が優勢的であった。この結果は堆肥DNAを用いた非培養アプローチにおける16S rRNA遺伝子の解析結果とも一致していた。

Keyword1, Keyword2, Keyword3

講演番号：2C22a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ C校舎22会場

ポリ乳酸添加固相脱窒リアクター内の脱窒細菌群集の動態と多様性

Biodiversity and population dynamics of denitrifying bacteria in PLLA-using solid-phase denitrification processes

○松岡宏行、山田剛史、辻秀人、平石明（豊橋技科大・工）
○Hiroyuki Matsuoka, Takeshi Yamada, Hideto Tsuji and Akira Hiraishi (Toyohashi Univ. of Tech.)

【目的】ポリ(L-乳酸) (PLLA)およびその廃材は、脱窒リアクターにおいて不足しがちな電子供与体を簡便・低コストで供給する外部電子供給材として利用できる。我々はPLLAの物性の最適化と添加量を調整することにより、PLLAを用いた固相脱窒リアクターを構築することには成功した。しかし、リアクター内における脱窒細菌を含む微生物の動態や多様性については分かっていない。そこで本研究では、バクテリアの16S rRNAおよび脱窒細菌が持つ2種の亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirS* および*nirK*)から転写されるmRNAを標的として、リアクター内で活性化している脱窒細菌群の動態や多様性を明らかにすることを目的とした。
【方法】本研究では、活性汚泥を接種源として、重量平均分子量 (約1万g/mol)、結晶化度 (40 %)に改質したPLLAを唯一の電子供給源として添加（反応槽容積当たり1, 3, 5%）した固相脱窒リアクターを運転した。それぞれのリアクター内汚泥より全RNAを抽出し、バクテリアの16S rRNA、*nirS*および*nirK*-mRNAを標的としたリアルタイム定量PCR、T-RFLP法を基にした多次元尺度分析、およびクローンライブラリー解析を行った。
【結果】PLLA添加固相脱窒リアクターでは、*nirS*および*nirK*両遺伝子の転写産物が確認された。*nirS*および*nirK*両遺伝子の転写量は、硝酸除去速度に関連した増減が認められた。クローンライブラリー解析を行った結果、*nirS*型脱窒細菌として、コマモナス属やタウエラ属細菌が優占化していた。この結果は、バクテリアを標的としたクローンライブラリー解析からも支持された。さらに、*nirK*型脱窒細菌として、アルカリジェネス属やカステルラニエラ属細菌などがリアクター内で主たる脱窒反応を行っていることが示された。これらの結果は、PLLAから放出される乳酸を巡って*nirS*または*nirK*を持つ細菌がともに脱窒反応を担っていることが明らかとなった。

講演番号：2C22a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ C校舎22会場

真核生物における鉄呼吸

Ferric iron reduction by eucaryote

○上杉正樹、斎木博、鈴木義規（工科大　バイオ）
○Masaki Uesugi , Hiroshi Saiki , Yoshinori Suzuki(Tokyo univ.technol. , Bio)

【目的】近年、無酸素条件下で酸素の変わりに鉄を使って呼吸をし、生育に必要なエネルギーを獲得するという原始呼吸法の一つである嫌気的鉄呼吸能が、古細菌を含む多くの細菌において発見された。本研究ではコウジカビと、嫌気呼吸が示唆されている Fusarium oxysporum についての鉄呼吸を精査した。

【方法】使用菌株は、F.oxysporum f. sp. cucumerinum , F. oxysporum f. sp. momordicae , F.oxysporum f. sp.cubense 及び Aspergillus oryzae RIB40 を用いた。植菌には胞子を 10^6spoler/ml 使用した。培地には電子供与体にｸﾞﾙｺｰｽまたは酢酸ナトリウムを用いて、電子受容体に Fe(Ⅲ)-EDTA または $NaNO_3$ を用いた。

N_2 または H_2 により気相を置換し嫌気的培養を試みた。電子受容体となる Fe(Ⅲ)-EDTA の濃度を 5,20,40mM として培養を行うことで F.oxysporum の増殖と二価鉄濃度の変化を評価した。呼吸産物である二価鉄濃度と亜硝酸濃度の測定は、フェナントロリン吸光光度法とナフチルエチレンジアミン吸光光度法において測定した。増殖の程度は、Lowry 法において、総タンパク質濃度を測定した。

【結果】電子供与体としてグルコースを用いて Fusarium を培養したとき若干の増殖がみられ、10 日後の蛋白質濃度は約 5μg/ml であった。F. oxy f. sp. momordicae は最も増殖し、蛋白質量が 30μg/ml であった。しかし Fe(Ⅱ)還元量は全ての増殖において 1 割以下の還元量であった。電子受容体として酢酸ナトリウムを用いた場合も若干の増殖が確認されたが、いずれの増殖においてFe(Ⅱ)濃度は 1 割以下の還元量であった。また酸化還元電位が鉄よりも高い硝酸においても同様の結果となった。したがって、今回用いたFusariumは嫌気条件下では鉄呼吸は行わず、発芽のみが行われると結論付けた。

電子供与体として酢酸ナトリウムを用いてAsperguillusを培養したとき、10日後の蛋白質濃度は約0.6μg/mlと殆ど増殖が確認されず、Fe(Ⅱ)還元量は1割以下であった。また培地中に酢酸ナトリウムを入れず、気相を水素と二酸化炭素にして電子受容体に硝酸を用いた場合、蛋白質濃度が約4μg/mlであった。しかし亜硝酸濃度は1割以下の還元量であった。

以上の結果から鉄呼吸が示唆されていたFusarium及びAsperguillusは鉄呼吸を行わないと結論付けた。

Fusarium　Aspergillus　iron-reduction

講演番号：2C22a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ C校舎22会場

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の植物関連物質に対する走化性の解析

Chemotaxis toward plant-associated compounds in *Ralstonia solanacearum*

○奥 正太、中里 憲司、田島 誉久、中島田 豊、加藤 純一（広島大院先端物質・分子生命）
○ Shota Oku, Kenji Nakazato, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato (Hiroshimadaiin)

【目的】*Ralstonia solanacearum* はトマト、ナス等の経済的に重要な作物に青枯病を引き起こす運動性の植物病害細菌である。運動性細菌が化学物質の濃度勾配を感知し、誘引もしくは忌避を示す行動を走化性という。*R. solanacearum* が植物に感染する初期段階において走化性が関与している可能性が示唆されているが、感染に関わる物質や走化性センサータンパク（MCP）など具体的な機構についてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、走化性モデル株として *R. solanacearum* Ps29 を用い、植物関連物質に対する走化性機構の解析を行った。
【方法及び結果】トマト（*Solanum lycopersicum*. CV. Oogatahukuju）から採取した根滲出液に対する Ps29 の走化性応答を Computer-assisted capillary assay 法により検出した。Ps29 はトマト根滲出液に対して非常に強い誘引応答を示した。これまでの報告から、植物根滲出液は主要な画分として「アミノ酸」「有機酸」「糖」「植物ホルモン」を含むことが知られている。そこで、Ps29 のこれら植物関連物質に対する走化性応答を評価した。Ps29 は植物関連物質のなかでも量的に主要な画分と予想されるアミノ酸や有機酸に対して強い誘引応答を示した。また、特にリンゴ酸に対しては極めて強い誘引応答を示した。一方で、糖に対しては誘引応答がほとんど検出されなかった。植物ホルモンでは、傷害応答に関係する植物ホルモンであるジャスモン酸に対して特に強い誘引応答を示した。これまでの報告から、一般に、*R. solanacearum* は根の傷口から内部へと侵入し、植物萎凋を引き起こすことが知られている。この感染メカニズムと環境中における植物関連物質の量的関係から考えて、*R. solanacearum* は根から分泌されるリンゴ酸をはじめとした有機酸やアミノ酸を感知し根圏土壌及び根面へと集積し、更に、植物根傷口から分泌されるジャスモン酸を感知することで傷害部分へ接近、内部へ侵入するという走化性を介した感染モデルが予想される。また、近縁種であり、ゲノム情報が公開されている *R. solanacearum* GMI1000 について BLAST 解析を行ったところ、GMI1000 は 22 個の MCP を有していることが予想された。しかしながら、これらの 22 MCPs のうち機能が明らかにされているのは走気性のセンサータンパクである Aer のみであり、その他の MCP 機能の解析はほとんど行われていない。現在、我々は、*Pseudomonas-Escherichia* shuttle vector pUCP18 へ Ps29 の 22 MCPs 遺伝子をそれぞれクローニングした Ps29 MCPs 発現プラスミドライブラリーを構築し、当研究室における走化性モデル細菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 へ異種相補させることで、Ps29 の植物関連物質に対する走化性に関与する MCP の特定を行っている。

Ralstonia solanacearum, chemotaxis, plant pathogens

講演番号：2C22p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ C校舎22会場

細胞性粘菌の柄細胞に存在する天然化合物の探索

Exploring natural products from the stalk cells in the cellular slime mold

○品川 知則、臼杵 豊展[1]、齊藤 玉緒[1]（上智大院・理工、[1]上智大・理工）
○Tomonori Shinagawa, Toyonobu Usuki, Tamao Saito (Sophia University)

【目的】細胞性粘菌は特徴的な生活環を持った土壌に住む真核微生物である。細胞性粘菌は多くの生物活性を有する化合物を産出している事が知られており、新しい微生物資源としても期待されている。その中でも、細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum* から単離されたDIF-1は塩素を含む独特な構造を持ち、細胞性粘菌だけでなく哺乳類の腫瘍細胞にも活性を持つことが知られている。そこで、我々は塩素化合物に着目し、*D. discoideum*の塩素付加酵素ChlAの発現解析を行った。発現解析の結果に基づき、さらなる新規化合物を探索することを目指して、*D. discoideum* の子実体の柄細胞から化合物を単離・精製し構造決定する事を試みた。
【方法】*D. discoideum*の野生株V12M2株を寒天培地上で発生させ子実体を回収した。回収した子実体から柄細胞のみを濾過によって分離し、その柄細胞からエタノールによって有機化合物を抽出した。また、残った柄細胞を超音波で破砕し、エタノールを用いてさらに化合物を抽出した。得られた抽出物を、シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーによって分離し、それぞれの化合物について詳細な構造解析を行った。
【結果】塩素付加酵素ChlAの発現解析の結果、ChlAは形態形成の後期に柄細胞で発現していることがわかった。このことから、柄細胞には塩素化合物が多く存在していると考え、柄細胞抽出物からいくつかの化合物を分離した。このうち最も収量が多い化合物について、まず構造解析を行ったところ、Dictyosterolと呼ばれるステロールである事がわかった。このDictyosterolは植物性ステロールの一種で、その有用性が検討されている。*D. discoideum* は培養が容易であり、生育時間も極めて短いことから、これを生物資源として用いることによって、Dictyosterolを効率的に生産することができるのではないかと考えている。
また、その他の化合物についても解析を試みたので併せて検討したい。

Dictyostelium, natural product,

講演番号：2C22p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ C校舎22会場

細胞性粘菌における新規柄細胞分化誘導因子の検索

The stalk cell inducing factor hunting in the cellular slime mould

○佐藤 有紀江、齊藤 玉緒[1]（上智大院・理工、[1]上智大・理工）
○Yukie Sato, Tamao Saito[1]（Sophia University. , [1]Sophia University.）

【目的】土壌微生物の細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*は、その最終形態である子実体が柄と胞子のわずか２種類の細胞からなるため、細胞分化・パターン形成モデル生物として研究が進められてきた。（予定）柄細胞の分化はDIF-1（Differentiation Inducing Factor-1）と呼ばれるポリケタイドによって誘導され、分化誘導に関するバイオアッセイから複数存在する予定柄細胞のサブセルタイプの主要な部分は、このDIF-1が誘導すると考えられてきた。しかし、DIF-1生合成を司るポリケタイド合成酵素(PKS)の遺伝子破壊株の解析から、DIF-1はpstB細胞と呼ばれるサブセルタイプの分化誘導を行うだけで、主要な予定柄細胞の分化誘導は他のポリケタイドが司っていることがわかった。そこで、ゲノム情報に基づき新たな予定柄細胞の分化誘導をおこなうポリケタイドの検索を試みた。
【方法】ゲノム情報から*D. discoideum*には45個のPKS遺伝子が存在しており、そのうちの２つはSteelyと呼ばれるI型PKSとIII型PKSが融合した構造を持つハイブリッド型PKSであることが知られている。これまでゲノム情報が報告されている細胞性粘菌のいくつかの種でも２つSteely酵素遺伝子（*stlA*,*stlB*）は保存されていること、Steely酵素だけがIII型PKSで、しかも他の生物には存在しないハイブリッド型酵素であること、SteelyB がDIF-1合成を司っていることから、*stlA*と*stlB*に着目して両遺伝子を破壊した二重変異株（*stlA-*/*stlB-*）を作製し、その表現型の解析を行った。
【結果】*stlA-*/*stlB-*株は、形態形成に大きな欠損を示した。特に移動体期には、予定胞子領域が細かく切れるなど表現型を示した。移動体の移動には協調的な細胞運動が必要であり、予定柄細胞が主要な役割を持つ。移動体の７割を占める予定胞子領域では前部様細胞と呼ばれる予定柄細胞のサブセルタイプが全体に分布し協調的運動を制御している。*stlA-*/*stlB-*株の移動体が示す欠損は*stlA*と*stlB*の産物が予定柄細胞（前部様細胞）の分化を誘導し、移動体の運動および形態維持を制御している可能性を示すものと考えられる。しかし、*stlA-*/*stlB-*株の子実体は不完全ではあるが柄細胞を形成していたことから、柄細胞分化は細胞性粘菌にとって生存に関わる重要な機構であり、さらに複数のポリケタイドが分化誘導をしている可能性があると結論づけた。

Dictyostelium, Steely, polyketide

講演番号：2C22p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ C校舎22会場

枯草菌胞子の最外層形成に関与するタンパク質の相互作用の解析

Analysis of interaction of proteins involved in formation of the outermost layer in *Bacillus subtilis* spores

○宮部 泰輔、大竹 つかさ, 柏元 良介、島 祐一郎、新穂 淳子、西川 恭平、今村 大輔、桑名 利津子、高松 宏治、渡部 一仁(摂南大・ 薬)
○Taisuke Miyabe, Tsukasa Ohtake, Ryosuke Kasimoto, Yuitiro Shima, Junko Niibo, Kyohei Nishikawa, Daisuke Imamura, Ritsuko Kuwana, Hiromu Takamatsu, Kazuhito Watabe (Setsunan Univ.)

[目的]枯草菌の胞子はスポアコートと呼ばれるタンパク質性の殻に覆われており、様々な耐性を有している。私たちは最近、枯草菌胞子にクラストと名付けられた最外層を発見した。そこで、クラスト形成機構を明らかにするため、クラストに局在しているタンパク質の相互作用ネットワークについて解析した。
[方法]Bacterial Two-Hybrid System を用いてクラストタンパク質の相互作用を調べた。本システムではタンパク質の直接的な相互作用をβガラクトシダーゼ活性を指標に検出することができる。
[結果]解析の結果、クラストに局在していることが明らかになっている3つのタンパク質 CgeA, CotY, CotZ は全てオリゴマーまたはポリマーを形成していることが明らかになった。そのため、これらのタンパク質がポリマーとなってクラストを構成している可能性が示唆された。また、CgeA は CotY との弱い結合が検出されたが、CotZ との結合は見られなかった。さらに、CotY と CotZ は相互作用していることが判明した。以前に私たちは CotY と CotZ はクラスト形成に必須であり、互いに依存していることを発見した。これらの結果はクラスト内で CotY と CotZ は複合体を作り、クラスト形成に必須の役割を果たしている事を示している。また、CgeA の局在は CotY と CotZ に依存していたため、本結果から CgeA は CotY を介してクラストに結合している事が示唆された。

Bacillus subtilis　　Spore

講演番号：2C22p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ C校舎22会場

ヒトfALS SOD1の異常化を促進する酸化剤の探索

Exploring oxidants that promote formation of abnormal human fALS SOD1 mutants.

○黒川洋一、松井義隆[1]、桜田真一[1]（福井県大・生物、[1]福井県大院・生物）

○Yoichi KUROKAWA, Yoshitaka MATSUI[1], Shin’ichi SAKURADA[1] (Fac. Biotech., FPU, [1] Grad. Sch.Biosci, FPU)

【目的】昨年度の本大会では、大腸菌における異常蛋白質ストレス応答が、fALSの原因物質であるヒトSOD1変異体の異常化をモニターする簡便な方法になりうること、金属イオン存在下で応答が上昇することを見いだしたことを報告した。本研究では、fALS SOD1の異常化を促進するとされるいくつかの条件が、このストレス応答を引き起こすか検討するとともに、金属イオン存在下での応答を増強する化合物を探索することとした。

【方法】ヒトSOD1点変異体（A4V、G93A、G85R、H46Rなど）をOmpTシグナルとの融合体として発現させることのできるプラスミドを、ストレス応答モニター細胞*SR1458*に形質転換し、種々の薬剤存在下で各変異体の発現を誘導させ、応答レベルを*LacZ*活性として測定した。一方、野生型SOD1を各種カラムにより電気泳動上ほぼ均一になるよう精製した標品を、薬剤存在下でインキュベートし、SDS-PAGEおよびイムノブロットにより、異常化の指標である高分子化が起こるか解析した。

【結果】野生型を含む各変異体のストレス応答レベルは、塩化銅(II)濃度に応じて上昇したが、SOD1を酸化すると報告されていた過酸化水素存在下では上昇は見られなかった。また、アスコルビン酸には、単独ではストレス応答を促進する効果はなかったが、塩化銅(II)存在下でのストレス応答を増強する効果を持つことが分かっていた（昨年度本大会）が、アスコルビン酸より負の酸化還元電位を持つグルタチオンには、そのような効果は見られなかった。一方、低濃度の塩化銅(II)存在下でストレス応答が顕著に誘導される「高感受性型」SOD1変異体と、低濃度では応答レベルが低く高濃度で活性化される「低感受性型」変異体のうち、後者の応答レベルはアスコルビン酸存在下で有意に増強されることが分かった。すなわち、銅(II)イオンとアスコルビン酸が共存すると「低感受性型」の異常蛋白質形成を促進すると示唆された。
また、精製したSOD1 標品を銅(II)イオン等の存在下でインキュベートしたところ、高分子化した分子種がイムノブロット上で検出された。この分子種の形成は、炭素ラジカル捕捉剤存在下で抑制されたことから、炭酸アニオンおよび過酸化水素存在下でのSOD1の異常化（Zhang et al. *JBC* 278(26)(2003)）に伴って生じる分子種と同等の物ではないかと考えられた。これらの結果は、SOD1 が銅(II)イオン等の酸化剤存在下で異常化し、炭素ラジカルがこの反応に関与することを支持すると思われる。

SOD1, oxidants, unfolded protein response

講演番号：2C22p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ C校舎22会場

Aspergillus oryzae 菌体外分泌型アスパルティックプロテアーゼの発現解析

Expression analysis of secreted aspartic protease in *Aspergillus oryzae*

○渡邉 格、岡本 綾子、竹内 道雄、山形 洋平（東農工大院・応生化）
○Kaku Watanabe, Ayako Okamoto, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata （Tokyo Univ. of Agriculture and Technology）

【目的】

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 の全ゲノム解析により、黄麹菌ゲノムにはアスパルティックプロテアーゼ（ APase ）をコードすると推定される遺伝子が 11 種類存在することが明らかになった。その塩基配列から推定されるアミノ酸配列情報から 5 種類の菌体外分泌型 APase を持つと予測された。一方、APase は 2 つの D（ T , S ）G という活性中心モチーフを有し、放線菌の生産するペプスタチンにより、その活性が強く阻害されることが知られている。本研究では 5 種類の菌体外分泌型と推定される APase の分泌が、培地組成の異なる培養条件でどのように変化するかを明らかにすることを目的とし、タンパク質レベルでの発現解析を行った。

【方法】

小麦フスマを用いた固体培地及び、異なる窒素源を含む Czapek-Dox 液体培地、米ぬか液体培地等を用いて *A. oryzae* を 30℃で培養し、得られた固体培養抽出物、液体培養上清から Immobilized Pepstatin Gel （ Thermo Fisher Scientific ）を用いたアフィニティーカラムに特異的に結合する APase を単離した。APase の同定はトリプシンを用いた In-gel digestion 及び MALDI TOF-MS、MASCOT を用いた Peptide Mass Finger Printing （ PMF法 ）によって行った。

【結果】

Immobilized Pepstatin Gel に特異的に結合した APase を SDS 電気泳動用サンプル緩衝液で溶出後、SDS-PAGE によって確認した。CBB 染色によって検出されたタンパク質バンドはシングルバンドを示した。検出されたバンドを In-gel digestion し、生じたペプチドフラグメントを MALDI TOF-MS により同定したところ、すべての培養抽出物及び培養上清から分子量 1382.67、1430.79、1616.74 のペプチドフラグメントが検出され、MASCOT により AO090120000474（ pep0 ）であると同定された。しかし、その他 4 種類の APase と考えられるペプチドフラグメントは検出されなかった。

このことから *A. oryzae* は固体培養及び、培地組成の異なる液体培養などの培養条件の違いに左右されず常に AO090120000474（ pep0 ）のみを主な APase として菌体外に分泌していることが明らかとなった。

尚、本研究は生研センター基礎研究推進事業の一環として行れたものである。

Aspergillus oryzae, aspartic protease, Peptide Mass Finger Printing

講演番号：2C22p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ C校舎22会場

誘導プロモーターを用いたオートファジー制御による麹菌からの実用的異種タンパク質高生産宿主の造成

Construction of practical strains for heterologous protein production by regulation of autophagy using an inducible promoter from *Aspergillus oryzae*

○菊間 隆志、尹 載宇[1]、丸山 潤一、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工、[1]啓明大学校・薬）
○Takashi Kikuma, Jaewoo Yoon, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto（Dept of Biotechnol, Univ of Tokyo, [1]College of Pharmacy, Keimyung Univ.）

【目的】麹菌*Aspergillus oryzae*は高いタンパク質分泌能力を有し、異種タンパク質生産の宿主として利用されている。我々は以前*A. oryzae*において変異型分泌タンパク質としてS-S結合を欠損させたα-アミラーゼを発現させると、細胞内自食作用であるオートファジー依存的に液胞へ取り込まれることを明らかにした[1)]。これは、オートファジーが異種タンパク質生産におけるボトルネックのひとつである可能性を示唆しており、実際にオートファジー関連遺伝子破壊株においてウシ・キモシンの分泌生産量の増加が観察された[2)] *A. oryzae*におけるオートファジー欠損株は、通常の培地での増殖は野生株と差はないものの、分生子をほとんど形成しない[3)]。このため、これらの株を工業的な規模で異種タンパク質生産に用いる場合、植菌に十分量の分生子を得ることが困難である。そこで本研究は、オートファジー関連遺伝子を発現制御可能なプロモーター下で発現し、分生子形成時には発現をオンにし、異種タンパク質生産時はオフにすることが可能な実用的異種タンパク質高生産株の育種を目的とした。

【方法・結果】オートファジーの誘導に関与する*Aoatg1*，オートファゴソームの形成に必須な*Aoatg4*および*Aoatg8*などのオートファジー関連遺伝子[3)]のプロモーター領域を、チアミンにより制御可能な*thiA*プロモーターに置換し、さらにウシ・キモシン発現プラスミドを導入した株を作製した。これらのオートファジー遺伝子条件発現株を、チアミンを添加しないPD培地において生育させたところ、十分量の分生子を得ることに成功した。また、得られた分生子をチアミン添加したPD培地で生育させた場合、オートファジー遺伝子破壊株と同様に分生子の形成阻害が見られたことから、チアミン存在下ではオートファジー機能が抑制されていることが示唆された。そこで、回収した分生子をチアミン添加した5×DPYで30°C、4日間培養後、培地上清のキモシン活性を測定したところ、上記遺伝子破壊株[2)]と同様にウシ・キモシン生産量の増加が見られた。本研究により、十分量の分生子を得ることが可能な、オートファジー欠損による異種タンパク質高生産株の育種に成功した。

1)Kimura *et al*., Biochem. Biophys. Res. Commun., 406: 464-470 (2011)
2)尹ら、平成２３年度　日本生物工学会大会講演要旨集 p230
3)Kikuma *et al*., FEMS Microbiol. Lett., 316: 61-9 (2010)

Aspergillus oryzae, autophagy, *thiA* promoter

講演番号：2C22p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎22会場

ペプチド性培養基材は酵母指数増殖期における組換えタンパク質生産性を向上する

Peptides-based medium enhances protein productivity of yeast at exponential phase

疋田礼,○伊藤圭祐, 河原崎泰昌（静岡県大院生活健康・食栄）
Aya HIKIDA, ○Keisuke ITO, Yasuaki KAWARASAKI (Grad. Sch. Nutri. Environ. Sci., Univ. Shizuoka)

【目的】酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いた組換え膜タンパク質の調製は、細胞壁が薄く、破砕が比較的容易な指数増殖期に行うことが望ましい。そのため、この時期でのタンパク質生産性は各種解析への膜タンパク質の調製に重要である。指数増殖期は活発に細胞が増殖し、栄養要求性が高い時期である。ヒトにおけるアミノ酸源の吸収はアミノ酸形態よりもペプチド形態の方が高効率であることが知られているため、大豆ペプチド（SP、ジ・トリペプチド含量65%）を用いて、酵母指数増殖期におけるタンパク質生産性の向上効果を検討した。
【方法】7種のGPCRをモデルタンパク質として、C末端にGFPを融合したコンストラクトを*S. cerevisiae* BY2777株により発現させた。SP培地、 及びSPと同様のアミノ酸組成の培地（FAA）で培養し、菌体の世代時間を算出した。また、GFP蛍光を指標に融合タンパク質の発現解析を行った。さらに、SP培地によるタンパク質生産性の向上メカニズムを明らかとするため、酵母内在のペプチドトランスポーターPTR2の欠損株を用い、SP培地、FAA培地による生育解析を行った。
【結果】タンパク質発現に伴い酵母の生育阻害が観察されたが、SP培地では全ての形質転換体でFAA培地と比較して0.8倍の世代時間の短縮が見られ、指数増殖期における生育が優れていた。また、SP培地での指数増殖期におけるタンパク質発現量は、FAA培地と比較して同等から最大で2.5倍高かった。一方、定常期におけるタンパク質発現量には両培地間で大きな差は見られなかった。これらの結果から、SP培地は指数増殖期における生育阻害ストレスを緩和し、タンパク質生産性を向上することが示された。PTR2欠損株のSP培地での生育はFAA培地と比較して顕著に悪化したことから、SP培地による生育改善およびタンパク質生産性の向上効果には、PTR2を介したジ・トリペプチドの吸収が大きく寄与していることが示唆された。

Soy peptides, protein expression, yeast

講演番号：2C22p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎22会場

麹菌*Aspergillus oryzae*を用いたラクダ科動物由来一本鎖抗体可変部位V_{HH}分泌生産系の構築

Efficient heterologous expression and secretion in *Aspergillus oryzae* of a llama variable heavy-chain antibody fragment V_{HH}

○吉栄 俊秀、青木 淳一、田淵 聡一郎、岡﨑 文美[1]、荻野 千秋、田中 勉、久田 博元[2]、秦 洋二[2]、近藤 昭彦（神戸大院・工、[1]神戸大・自、[2]月桂冠・総研）

○Toshihide Yoshie, Jun-ichi Aoki, Soichiro Tabuchi, Fumiyoshi Okazaki[1], Chiaki Ogino, Tsutomu Tanaka, Hiromoto Hisada[2], Yoji Hata[2], Akihiko Kondo (Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., [1]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., [2]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co.)

【目的】医療分野において、癌などの重篤な病気に対する治療薬として抗体医薬が注目されているが、生産コストが高いという問題がある。また、抗体は重鎖および軽鎖の二本のポリペプチド鎖が正しい立体構造を形成しなければならず、微生物での生産が困難とされている。一方、ラクダ科動物は、重鎖のみで抗体結合能を有する一本鎖抗体を産生することが知られている。その可変部位（V_{HH}）は、従来型の抗体に比べ、シンプルな構造を有していることから、微生物を用いた大量生産に適していると考えられる。さらに、高い熱安定性および水溶性を有することから、次世代型抗体としてターゲッティング治療薬などへの応用が期待されている。そこで、本研究では、安全性が広く認知され、高いタンパク質生産能力を有する麹菌*Aspergillus oryzae*を用いたV_{HH}分泌生産系の構築を試みた。

【方法】癌細胞に過剰発現している上皮増殖因子受容体（EGFR）に対して、特異的結合能を有する抗EGFR-V_{HH}をコードする遺伝子を、麹菌由来タカアミラーゼAのシグナルペプチド(sTAA)遺伝子の下流に連結した。さらに、麹菌においてタンパク質分泌促進効果が報告されている*Rhizopus oryzae*由来リパーゼのプロ領域（N28配列）遺伝子を、sTAA遺伝子と抗EGFR-V_{HH}遺伝子の間に挿入した遺伝子カセットも構築した。構築した2種類の遺伝子カセットを相同組換えにより麹菌のゲノム中に組み込み、*sodM*プロモータ制御下で発現させた。GPY液体培地中、30 ℃、150 rpmで10日間培養を行い、抗EGFR-V_{HH}の分泌生産量の経時変化を解析した。培養上清中から各種クロマトグラフィーを用いて抗EGFR-V_{HH}を精製した。EGFR結合能は、ELISA法およびヒト扁平上皮癌A431細胞への結合性により評価した。

【結果】N28配列により抗EGFR-V_{HH}の培地中へ分泌が促進されることが示され、その分泌生産量は培養10日目に最大で約 80 mg/Lに達した。その局在性を解析したところ、菌体内への蓄積は認められず、菌体外に高効率に分泌生産されることが明らかになった。培養上清中から精製した抗EGFR-V_{HH}は、ゲル濾過クロマトグラフィーで単一のピークを示し、さらにV_{HH}に特有の遠紫外円偏光二色性（CD）スペクトルを示したことから、会合体を形成しておらず、正しい二次構造を有する事が推察された。また、糖鎖付加は認められず、EGFR特異的な結合能を示し、さらにEGFRを高発現しているA431細胞への結合性を有した。以上の結果から、組換え麹菌により機能を有するV_{HH}が分泌生産されたことが明らかとなった。

V_{HH}, antibody, *Aspergillus oryzae*

講演番号：2C22p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎22会場

大腸菌を宿主とするA型インフルエンザウイルス核タンパク質の組換え生産技術の構築

Cloning and expression of influenza A virus nucleoprotein in *Escherichia coli*

○室伏 敬太、松野 正幸、太田 俊也（静工技研沼津）
○Keita Murofushi, Masayuki Matsuno, Toshiya Ohta (Shizuoka Industrial Research Institute)

【目的】インフルエンザウイルスの核タンパク質（nucleoprotein）は、ウイルス粒子表面の糖タンパク質に比べて変異が起きにくいことから、インフルエンザウイルス検査薬用の抗体のエピトープとして有効な部位である。核タンパク質を組換えタンパク質として調製することは、検査薬用抗体の作製および評価に重要であり、特に新型ウイルス発生時には迅速な調製が求められる。一般に核タンパク質の組換え生産にはバキュロウイルス－昆虫細胞系が用いられることが多いが、発現株の樹立やタンパク質生産に長期を要する。本研究では、核タンパク質の迅速な調製を目的として、大腸菌を宿主とする核タンパク質の効率的な組換え生産手法を検討した。
【方法】3種類のA型インフルエンザウイルスのRNAに対して逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を行い、それぞれ増幅された核タンパク質遺伝子の塩基配列をシーケンス解析によって決定した。核タンパク質遺伝子の全長を、pETベクター系またはpColdベクター系（コールドショックベクター）へ導入して、可溶化タグ配列、宿主とする大腸菌株、培養条件（培養温度・時間）等を変更して、核タンパク質の発現量の変化を調べた。
【結果】pETベクター系を用いた場合は発現がほとんど確認できなかったが、pColdベクター系に可溶化タグを付加した条件において、3種類の核タンパク質全てにおいて可溶性タンパク質として高い発現量が確認された。また、6×His-tagおよびStrep(Ⅱ)-tag遺伝子配列を核タンパク質遺伝子の末端に付加することで、大腸菌破砕液より2段階のアフィニティー精製を経て、核タンパク質を高い純度で精製できることが確認された。精製した核タンパク質をイムノクロマト法インフルエンザ検出キットに供したところ、抗原性が確認されたことから、大腸菌由来の核タンパク質が抗原として有効に機能することが示唆された。

Influenza A virus, Nucleoprotein, *E.coli* expression

講演番号：2C22p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ C校舎22会場

大腸菌発現系のレアコドン補充による *Thermus thermophilus* タンパク質発現レベルの向上

Rare codon supplementation: The way to improve heterologous expression of *Thermus thermophillus gene* in *E. coli*

◯シングカラバニット　スティター，　半田　智大, 廣田　隆一, 池田　丈, 黒田　章夫
(広島大院　・　先端研)
◯Suthitar SINGKARAVANIT, Tomohiro HANDA, Ryuichi HIROTA, Takeshi IKEDA, Akio KURODA (Hiroshima University)

[Introduction**]**　Previously, we developed a simplified method to make a biocatalyst suitable for industrial application. This method involves a brief heat treatment (70°C) of recombinant *Escherichia coli* cells that express thermophilic enzymes catalyzing desired reactions. Such heat treatment results in inactivation of native enzymes and partial permeabilization of cell membranes, so that the cells could be used as a whole cell catalyst without enzyme purification. Since the biocatalyst efficiency is mainly dependent on the amount of recombinant enzymes, high protein expression levels are usually required. However, recombinant systems often suffer from poor efficiency in expression due to the difference of codon usage between target genes and host cells. In such cases, tRNA gene supplementation has been frequently employed to achieve sufficient levels of protein expression. For example, Rosetta^{TM}2 (Novagen) was designed to enhance protein expression by supplying seven rare *E.* coli codons using pRARE2 plasmid. However, we found that the level of heterologous expression of *T. thermophilus* genes was still poor since *Thermus* genes highly contain GGG (glycine) and CTC (leucine) codons that are rare in *E. coli*.

[Method and Results**]**　Firstly, we constructed the rare codon tRNA plasmid (ptRNA) carrying the original rare tRNA gene cluster from pRARE2, with two additional tRNA genes (GGG and CTC). An *E. coli* BL21 (DE3) carrying ptRNA was used for the heterologous expression of *Thermus* genes. The protein expression in the new strain was increased by up to 12% compared with Rosetta™2, suggesting that a more comprehensive tRNA supplementation approach would be necessary for further improvements in heterologous gene expression. With further optimization of tRNA gene supplementation, the new strain could become an attractive host for heterologous expression of *T. thermophilus* gene in *E. coli*.

This work was supported by advanced low carbon technology research and development program (ALCA) in JST.

tRNA supplementation, rare codon, heterologous expression

講演番号：2C22p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎22会場

好熱菌*Geobacillus kaustophilus* HTA426における異種耐熱性酵素遺伝子の発現

Functional expression of heterologous genes in *Geobacillus kaustophilus* HTA426

○鈴木 宏和，大島 敏久，河原林 裕（九大院農院）
○Hirokazu Suzuki, Toshihisa Ohshima, Yutaka Kawarabayasi (Faculty of Agric., Kyushu Univ.)

【目的】耐熱性酵素遺伝子の探索や解析ならびに高温バイオプロセスにおける好熱性グラム陽性桿菌の高度活用を目指し，我々は*G. kaustophilus* HTA426の分子育種技術の開発に取り組んでいる．本菌はマリアナ海溝深海から単離された好熱性のグラム陽性桿菌で，中等度の高温領域で迅速に増殖する点（生育可能温度，42ºC-74ºC；生育至適温度，60ºC；好気的LB培養における倍化時間，約20 min），生物学的知見が蓄積されている枯草菌と近縁である点，およびゲノム配列が公開されている点など，好熱性桿菌のモデル生物として有利な要素を多く備えている．本大会では，*G. kaustophilus*を宿主とする異種耐熱性酵素遺伝子の発現系の構築について報告する．

【方法と結果】枯草菌に関する知見を利用しながら，HTA426株に内在する糖質誘導型発現プロモーター領域を予想した．各プロモーター領域と*G. kaustophilus* ATCC 8005株由来の耐熱性*β*-galactosidase遺伝子*bgaB*を連結したレポーター遺伝子を構築し，MK72株（HTA426株のゲノム改変株）の*GK0707* locusに挿入した．得られた変異株を炭素源が異なる様々な最少培地中で培養し，それらの細胞抽出液中の*β*-galactosidase（BgaB）比活性を測定したところ，推定マルトース代謝遺伝子群上流の*gk704*プロモーターがマルトース存在下で高発現することがわかった．その際のBgaB比活性（5.5 nmol s^{-1} mg-$protein^{-1}$）は，マルトース非含有培地で培養した場合のものより10倍以上高かった．さらに培養方法を検討したところ，BgaB比活性は32 nmol s^{-1} mg-$protein^{-1}$に上昇した（生産量，約2 mg/L culture）．同手法を用いて様々な耐熱性酵素遺伝子を発現させたところ，*G. stearothermophilus*由来*α*-amylase遺伝子，超好熱性アーキア*Pyrococcus horikoshii*由来cellulase遺伝子，および超好熱性アーキア*Pyrobaculum calidifontis*由来esterase遺伝子が機能的に発現し，各遺伝子によってデンプン分解能，カルボキシセルロース分解能，およびトリブチリン分解能がMK72株に付与された．好熱好酸性アーキア*Sulfolobus tokodaii*由来lactate dehydrogenase遺伝子の発現も確認された．*α*-Amylaseは細胞外に生産された．これら異種タンパク質の生産量は高くなかったが（0.2 mg/L culture以下），以上の結果は*G. kaustophilus*において様々な異種遺伝子を発現させられることを示している．さらに生産された多くの異種タンパク質が*G. kaustophilus*の培養過程において活性を示した点は，耐熱性酵素遺伝子の探索，解析，および応用利用において*G. kaustophilus*が広く活用できる可能性を示唆している．高コピープラスミドpSTE33Tを用いて*gk704*プロモーター制御下の*bgaB*遺伝子を発現させたところ，BgaB生産量が更に高くなったことから（比活性，430 nmol s^{-1} mg-$protein^{-1}$；生産量，28 mg/L culture），現在，pSTE33Tを用いた異種遺伝子の高発現を検討している．

Geobacillus, thermostable, gene expression

講演番号:2C22p13
講演日時、会場:3月23日16:21～ C校舎22会場

タイトル： *Oceanobacillus iheyensis*由来プロテアーゼの新規BIC法を用いた*Brevibacillus choshinensis*での発現系の構築

Title : Cloning of *Oceanobacillus* protease with new BIC method in *Brevibacillus choshinensis*.

○松崎 竜也、山口　類、石橋 松二郎、追立 尚樹、徳永 廣子、徳永 正雄（鹿児島大農・生資化）

○Tatsuya Matsusaki, Rui Yamaguchi,Matsujiro Ishibashi, Naoki Oitate, Hiroko Tokunaga, Masao Tokunaga （Kagoshima Univ.）

【目的】好アルカリ性・耐塩性の深海細菌*Oceanobacillus iheyensis*由来Subtilisinホモログの性質検討を目的とした。*Oceanobacillus iheyensis*（以下*O. iheyensis*）は高見ら[1)]によって東シナ海にある伊平屋海嶺の水深1050mの海底から分離された菌であり、3.4M NaCl存在下でも生育可能な、アルカリ性環境を好む高度耐塩性のグラム陽性菌である。この菌のゲノム情報は既に解読されており、DNAのGC含量は35.8%である。SubtilisinはSerine proteaseの一種で、工業的にはタンパク質の加工などに用いられている。*O. iheyensis*はSubtilisinに似たSerine protease（以下Oi.Sub）を産生し、Oi.Subはゲノム情報からPre-Pro領域を含む404アミノ酸残基から成るタンパク質であると推定される。GluやAspといった酸性アミノ酸に富むという好塩性酵素に似た特徴を持ち、*Bacillus subtilis*が作るSubtilisin E との相同性が、45.1%と高い。これらのことから好塩性酵素と耐塩性酵素の違いの検討に有益なものとなりえる。

【方法】大腸菌による菌体内発現と、*Brevibacillus choshinensis*（以下*B. choshinensis*）による分泌型発現を行った。菌体内発現では、成熟型のpET15b-Oi.Mature-Sub、プロ型のpET15b-Oi.Pro-Sub、全長のpET15b-Oi.PrePro-Sub（以下それぞれOMS、OPS、OPPS）を構築し、菌株BL21(DE3）に形質転換し、発現・性質検討を行った。分泌型発現では、全長のpNY326-OPPSを構築し、*B. choshinensis*に形質転換し、発現・性質検討を行った。形質転換にはBIC法（BIC method = Brevibacillus In vivo Cloning method）を用いた。

【結果】大腸菌による菌体内発現では、OPPS及びOPSは、SDS-PAGEでは発現が確認できなかった。また、OMSは、発現は確認できたが、不溶性画分への発現が多く、活性は示さなかった。尚、活性はOPSにのみ確認できた。結果として発現量が少ないことなどから、大腸菌による菌体内発現は困難であることが示唆された。*B. choshinensis*による分泌型発現では、OPSが培地中に発現され、それがOMSへと活性化されていた。大腸菌による菌体内発現に比べて発現量も多く、活性も確認できたことから、BIC法と分泌発現の有用性が示された。

[1)] Jie Lu, Yuichi Nogi, Hideto Takami (2001) *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. FEMS Microbiol. Lett. 205, 291-297.

Oceanobacillus iheyensis, *Brevibacillus choshinensis*, BIC method

講演番号：2C22p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎22会場

Brevibacillus 菌体内発現系による大腸菌で封入体化する蛋白質の可溶性高生産

Efficient production of recombinant proteins in soluble form by *Brevibacillus* intracellular expression system while as inclusion body by *E. coli*

○大西 廣優、水上 誠、花方 寛、宮内 明（ヒゲタ醤油・研）
○Hiromasa Onishi, Makoto Mizukami, Hiroshi Hanagata, Akira Miyauchi
（Higeta shoyu, R & D Dpt.）

B. choshinensis は、グラム陽性細菌の一種であり、その高い蛋白質分泌能と菌体外プロテアーゼ活性がほとんど検出されないという特徴から、これまで数多くの異種蛋白質生産の宿主として用いられた実績がある。その分泌生産量は高く、中には 10 g/L 以上の成績を示した例もある。一方、本来細胞内に局在する蛋白質を分泌生産させようとした場合は、意図した発現ができないことが多かった。細胞内蛋白質の異種蛋白質発現については、大腸菌を用いることが一般的であるが、封入体を形成して活性型の蛋白質が容易には得られない場合がある。今回試験を試みた蛋白質も同様に大腸菌では封入体を形成した。*B. choshinensis* については、菌体内発現の実績こそ少ないが、その高い蛋白質発現能から菌体内発現でも高生産が期待される。そこで、*B. choshinensis* を用いた菌体内発現系を構築し、大腸菌の代替として細胞内蛋白質の菌体内高生産が可能か、検証を行った。

発現試験として、分子量 50kDa の真核生物由来デヒドロゲナーゼ（以下、DH）を用いた。まず大腸菌で汎用される pET システムを用いて発現試験を実施した。その結果、DH のほとんどは封入体として生産された。一方、*B. choshinensis* を用いた発現試験では、菌体内発現用ベクターpNI を新たに構築し試験を行った。その結果、蛋白質量としては大腸菌とほぼ同量であったが、可溶性蛋白質の割合が多く、大腸菌に比べて約 20 倍の酵素活性を確認できた。次に、生産量の向上を目指し、3L スケールのジャーファメンターを用いて培養試験を行った。発現ベクターの改良や回転数、培地組成等の培養条件を検討した結果、最終的に 7 g/L と非常に高い生産量を達成することができた。また、生産した DH のほとんどが活性型の可溶性蛋白質として得られることが確認された。

これらの結果から、*B. choshinensis* は、分泌生産だけでなく、菌体内生産においても高い蛋白質生産能力を持ち、活性型で生産させられる可能性があることが実証された。大腸菌で封入体化し、活性型蛋白質が容易に得られない場合の選択肢として、*B. choshinensis* 発現システムが有効であることが示された。

Brevibacillus, recombinant protein, *Escherichia coli*

講演番号：2C22p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ C校舎22会場

Corynebacterium glutamicum を用いたタンパク質分泌発現系（CORYNEX®）における分泌向上検討－Ser/Thrプロテインキナーゼ/フォスファターゼの高発現が異種タンパク質分泌生産に与える影響－

Improvement of secretion efficiency in a protein secretion system by using *Corynebacterium glutamicum* (CORYNEX®). －Effect of Ser/Thr protein kinase/phosphatase overexpression on heterologous protein secretion－

○松田 吉彦、菊池 慶実（味の素㈱・イノベーション研）
○Yoshihiko Matsuda, Yoshimi Kikuchi (Institute for Innovation, Ajinomoto CO., Inc.)

【目的】味の素㈱では、グルタミン酸生産菌をベースとした*Corynebacterium glutamicum* によるタンパク質分泌発現系（CORYNEX®）を開発し、あらゆるタンパク質生産への応用展開を図ると共に、更なる分泌量向上を目指している。本研究では、高発現によりタンパク質分泌に影響を与える遺伝子の単離を検討した。

【方法と結果】放線菌*Streptomyces mobaraensis* 由来のトランスグルタミナーゼ（TG）の分泌量変化を指標に、*C. glutamicum* ゲノムライブラリーから異種タンパク質分泌量に影響を与える遺伝子の単離を検討した。ゲノムライブラリーのショットガンスクリーニングの結果、TGの分泌量が大きく減少したクローンが取得された。クローン化された挿入ゲノム断片を解析した結果、Ser/Thrプロテインキナーゼ遺伝子*pknA*、*pknB*、および機能未知遺伝子*NCg10039*が含まれていた。各々の遺伝子に関してTG分泌量への影響を検証した結果、*pknAB*の同時高発現がTG分泌量減少の原因であることが明らかとなった。そこで、*pknA*、*pknB*各欠損株を取得したが、TG分泌量は増加しなかった。一方、*pknAB*と共にオペロンを形成し、PknABによってリン酸化されたタンパク質の脱リン酸化を担うSer/Thrプロテインフォスファターゼ遺伝子*ppp*を増幅した結果、TG分泌量が増加することを見出した。これらの結果から、*C. glutamicum* においてリン酸化/脱リン酸化酵素遺伝子の発現レベルを変化させることで、異種タンパク質の分泌生産量に影響を及ぼすことが分かった。

CORYNEX®, protein secretion, Ser/Thr protein kinase/phosphatase

講演番号：2C22p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ C校舎22会場

耐熱性ベンズアミド資化性菌に関する研究

Study of thermotolerant benzamide-assimilating bacteria

○猪瀬 孝之、坂倉 徹哉[1]、青木 健次[2]、村上 周一郎[1]（明治大院・農、[1]明治大・農[2]相模女子大・栄養、）

○Takayuki Inose、Tetsuya Sakakura[1]、Kenji Aoki[2]、Shuichiro Murakami[1]（Meijidaiin、Meijidai、Sagamijoshidai）

【目的】安息香酸は芳香族化合物代謝の重要な代謝中間体であり、その代謝経路および酵素系に関してはよく研究されている。しかし含窒素芳香族化合物であるベンズアミド(BA)を資化する耐熱性菌に関する研究例はない。ベンズアミド代謝において第一に重要だと考えられる反応は、脱アミノ反応である。そこで本研究では、ベンズアミドの脱アミノ反応を触媒する耐熱性アミダーゼを生産する微生物を土壌から分離した。

【方法】菌株の分離：0.3% （w/v） BAを唯一の炭素源および窒素源とするBA培地（pH 5.5および7.1）を用いて45℃、好気条件下で集積培養をした後、肉汁平板培地を用いて純粋分離した。分離した菌株の中から生育が良好な菌株を選抜した。菌株の同定：分離菌株の形態学的、生理学的、生化学的、および遺伝学的性質に基づいて同定した。代謝中間体の解析： BA液体培地を用いて菌株を培養し、培養上清中のBAおよび代謝中間体の蓄積を逆相HPLCにて定量した。代謝経路の解析：BA液体培地を用いて菌株を培養し、指数増殖後期で集菌した後、超音波による菌体破砕、除核酸処理を行い、粗酵素液を調製した。調製した粗酵素液をカテコールと反応させ、反応生成物を分光光学的に分析した。アミダーゼ生産条件の検討：種々の易分解性基質を含むBA液体培地を用いて菌株を培養した。回収した菌体から粗酵素液を調製後、BAと反応させ、反応生成物の増加を逆相HPLCにて分析し、酵素活性を評価した。

【結果】集積培養および純粋分離の結果、pH 5.5 では 8 株、pH 7.1 では 3 株の計 11 株を分離し、生育が良好な菌株として 6 株（pH 5.5）を選抜した。同定試験の結果、6 株全てを *Amycolatopsis tucumanensis* と同定した。代謝中間体の解析から培養上清中に安息香酸を見出した事、また全ての菌株の粗酵素液中にカテコール 1,2-ジオキシゲナーゼ活性を見出した事から、これらの菌株が BA を脱アミノ化し安息香酸を生成した後、カテコールのオルト開裂を経由して BA を代謝している事が明らかになった。生育試験の結果、もっとも良好な生育を示した No. 4 株を用いてベンズアミドアミダーゼの生産条件を検討したところ、0.6% BA、0.2% 酵母エキスを含む培地を用いる事でベンズアミドアミダーゼの生産性が約 2 倍向上した。現在、本菌の生産する酵素の精製を進めている。

benzamide, amidase, *Amycolatopsis*

講演番号:2C22p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ C校舎22会場

大腸菌に発現させた*Aspergillus oryzae*のクチナーゼホモログの遺伝子産物の精製と性質

Expression and characterization of gene product from *A. oryzae* cutinase homologue by *E. coli*

○渡辺久美子、前橋健二、柏木豊（東農大院・醸造）
○Kumiko Watanabe, Kenji Maehashi, Yutaka Kashiwagi (Grad. Sch. Fermentation Sci. Technol., Tokyo Univ. Agriculture)

【目的】麹菌のリパーゼは味噌の香気成分生成に関与することが知られ、主要なリパーゼはクチナーゼ CutL1である。*Aspergillus oryzae* RIB40株のゲノムDB(DOGAN, NITE)からクチナーゼと推定される遺伝子が 5種存在することが判明した。本研究では、味噌等の製造におけるクチナーゼの作用を解明するため、そのホモログ遺伝子を単離し、遺伝子産物の精製と性質について検討した。
【方法・結果】麹菌ゲノム情報をもとにしてクチナーゼ遺伝子のホモログ 5種のcDNAをPCRクローニングし、発現ベクターpET-48bに組込み*E. coli* BL21(DE3)を用いて組換え酵素の発現を試みた。本発現系では供試した 5種の遺伝子のうち、DOGAN Gene ID AO090023000058 遺伝子の形質転換株のみが目的酵素を菌体内に大量に発現していた。しかし、不溶性タンパク質であったため 6 M 尿素にて可溶化し、ゲル濾過クロマトグラフィーにて部分精製後、透析によって尿素を除去した。本酵素(仮称cutinase 058)におけるpNP-butyrate分解活性の至適pHは7、至適温度は25 ℃であった。また、pH 3-6にてほぼ安定であり、pH 7, 80℃において30分間加熱後も約70 % のpNP-butyrate分解活性を保持し、比較的熱安定性が高いことがわかった。

Aspergillus oryzae, cutinase, recombinant enzyme

講演番号：2C22p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ C校舎22会場

Penicillium sp. III-1株由来のプロトカテク酸3,4-ジオキシゲナーゼ（P34D）の精製および特性解析

Purification and characterization of protocatechuate 3,4-dioxygenase (P34D) from *Penicillium* sp. III-1

○川合 史晃、青木 健次[1]、村上 周一郎[2]（明治大院農・農化、[1]相模女子大栄養・管理栄養、[2]明治大農・農化）
○Fumiaki Kawai, Kenji Aoki[1], Shuichiro Murakami[2](Meijidaiin, [1]Sagamijoshidai, [2]Meijidai)

【目的】安息香酸のアミド誘導体であるベンズアミド（BA）を分解、資化する真核微生物の報告はほとんどない。そこで我々は土壌よりBA資化性真菌の分離を試み、数種の目的微生物を分離した[1)]。分離株の一つである*Penicillium* sp. III-1株の代謝中間体を分析したところ、BAは安息香酸に変換された後、プロトカテク酸のオルト開裂を経由して代謝されていることが示唆された。本研究では、報告例が無い*Penicillium*属由来のプロトカテク酸3,4-ジオキシゲナーゼ（P34D）の精製、および特性解析を試みた。
【方法】菌株の培養：ポテトデキストロース培地で培養後、安息香酸を含む反応液に菌体を移し、酵素を誘導生産させた。酵素活性測定：基質の減少を分光光学的に測定し、酵素活性を算出した。酵素の精製：菌体を破砕し徐核酸処理を行い、粗酵素液を調製した。粗酵素液から硫安分画、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーによってP34Dを精製した。
【結果】最終調整物をNative-PAGEに供したところ、単一のバンドが観察され、本酵素が均一に精製されていることを確認した。SDS-PAGEに供した結果本酵素は単一のバンドを示し、その分子質量は33 kDaであった。本酵素は35℃、20 minの熱処理後も80%以上の活性を維持し、45℃、20 minの熱処理によって完全に失活した。現在、その他の諸性質に関しても解析中である。

1）川合ら：日本農芸化学会2011年度大会講演要旨集 p. 120

benzamide, protocatechuic acid, *Penicillium* sp.

講演番号：2C22p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ C校舎22会場

ビタミン D_3 水酸化酵素に対する電子供給効率化による 25 位水酸化ビタミン D_3 の生産性向上

Enhancing biocatalytic production of 25-hydroxyvitamin D_3 by improvement of electron transfer to P450 Vdh

○西岡 大樹[1]、山形 理紗[2]、井元 紀子[3]、安武 義晃[4]、田村 具博[1,4]
[1]北大・農、[2]北海道ハイテク、[3]八戸大・人間健康、[4]産総研・生物プロセス
○Taiki Nishioka[1], Risa Yamagata[2], Noriko Imoto[3], Yoshiaki Yasutake[4], Tomohiro Tamura[1,4]
([1]Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ., [2]Hokkaido High-tech., col., [3]Fac. Human Health Sci., Hachinohe Univ., [4]Bioproduction Res. Inst., AIST)

【目的】我々は、組換え*Rhodococcus*属放線菌を用いた効率的な活性型ビタミンD_3の生産を行う為に、ビタミンD_3水酸化酵素（Vitamin D_3 hydroxylase; P450 Vdh）の発現系構築や進化工学による高活性型Vdh変異体（Vdh-K1）の取得を行なって来た[1)]。また、食品添加物として認可されており、宿主細胞に膜孔を形成させる事により抗菌活性を示すナイシンを用いて基質透過性を向上させ、高効率にビタミンD_3を25位水酸化ビタミンD_3に変換させる系の確立に成功している[2)]。これらの成果を組み合わせて、25位水酸化ビタミンD_3生産のさらなる効率化を目指したが、Vdh-K1変異体は野生型に比べ細胞内タンパク質発現量が大きく低下しており、結果として25位水酸化ビタミンD_3の生産性も低かった。その為、高い活性を示し、なおかつ菌体内での発現が良いVdh変異体の取得が望まれていた。そこで、本研究では、Vdhとそれにカップルするレドックスパートナー蛋白質との相互作用の向上による高活性型Vdh変異体の取得を目指した。
【方法】本研究では、Vdhへの電子伝達を行なう事が出来る*Acinetobacter* sp. OC4のレドックスパートナー蛋白質（AciB、AciC）を用いて実験を行った。VdhをよりAciBに対して最適化するために、AciBが結合すると予想されるVdhの分子表面に変異を導入し、より電子の受け渡しがスムースに進むような変異体の取得を行った。構築した13種類の変異体のビタミンD_3水酸化活性を調べ、特に活性が向上した変異体について、基質結合スペクトルアッセイ及びAciBとの相互作用解析を行った。
【結果】7つの変異体でビタミンD_3水酸化活性が向上し、その中でもT107A変異体は野生型に比べ、約80倍比活性が向上していた。そこで、基質結合スペクトルアッセイ及びAciBとの相互作用解析を行ったところ、基質との結合能は野生型とほとんど変わらずに、AciBとの相互作用が向上している事がわかった。また、T107A変異体の活性向上の構造学的要因を探るべく、X線結晶構造解析を行なったところ、進化工学によって取得されたVdh-K1変異体とほぼ同様な大規模な構造変化が観察された。現在、T107A変異体を発現させたナイシン処理細胞を用いて、25位水酸化ビタミンD_3の生産実験を行なっている。

1) Fujii, Y. et al. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 170-175.
2) Imoto, N. et al. (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 393-398.

cytochrome P450, vitamin D_3, *Rhodococcus*

講演番号：2C22p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ C校舎22会場

超純水と超音波による簡便なcell-free翻訳溶液調製

A minimum supplementation for cell-free protein expression prepared with pure water and sonication

○藤原 慶、野村 M. 慎一郎[1]（東北大院工・機械系、[1]JSTさきがけ）
○Kei Fujiwara, Shin-ichiro M. Nomura[1] (Tohoku Univ. Mech. Eng.、 [1]JST PRESTO)

cell-free 翻訳溶液は PCR 由来 DNA で簡便なタンパク質発現チェックが可能であること、毒性のあるタンパク質発現が可能であること、また極力手間を減らして小スケールのタンパク質発現・精製をするのに適しているなど、魅力あるツールである。しかし、市販品は決して安くないこと、自前で調製するのには難解さを感じるなど、扱い始めるのに敷居が高い面がある。このような敷居を下げるには、どこまで簡便な方法で cell-free 翻訳溶液を調製できるかを知ることが重要である。通常、無細胞タンパク質合成系のために細胞抽出液を回収する際、細胞と等量の塩を含むバッファーを加えたあと、圧力やビーズによって細胞を破砕する。本発表では、cell-free 翻訳溶液用の細胞抽出液は①塩を含むバッファーの代わりに超純水を用い、超音波で破砕することで細胞抽出液の調製できるほど安定であること、②タンパク質発現活性のためには最少 3 つの添加塩類で良いことを報告する。

対数増殖期の 1g の大腸菌細胞(BL21(DE3))に対し体積 4 倍量の 20%スクロース溶液を加え、10 分氷上に放置後、菌体を回収した。回収した菌体に体積 4 倍量の超純水(MiliQ 水)を加え、氷上 10 分、その後再び菌体を回収、-80℃で冷凍した。冷凍後、菌体重に対し半分量の MiliQ 水を加えた細胞を氷上に置き、超音波によって破砕した。得られた溶液を 30,000 x *g* で 1 時間遠心した。結果、45 mg/ml の蛋白質濃度、51 mmol/kg 相当の浸透圧を与える化合物を含んだ細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液を用いて *tac* promoter 下流に superfolder GFP をコードしたプラスミドを添加し、適量の塩類とバッファーを加えて発現させたところ、約 100 μg/ml の GFP が合成された。このように得られた超純水調製細胞抽出液はバッファーの場合と同等のタンパク質合成活性を示した。この結果から、超純水抽出でも機能的な RNA ポリメラーゼやリボソームが十分量残存していることが確認された。上記の系における superfolder GFP 合成量は 37 ℃で極大を向かえたが、最終細胞抽出液の濃度が 10 mg/ml を超えたあたりから著しく合成量が減少することが見出された。また、添加化合物をどこまで減らせるか健闘したところ、37 ℃条件においては、15 mM $(CH_3COO)_2Mg$、90 mM Glutamate-K、35 mM PEP の添加だけでアミノ酸や NTP 添加時と同等以上の superfolder GFP が合成された。Glutamete-K を Acetate-K に変更した場合、GFP 合成が著しく減少したため、Glutamate から各アミノ酸に代謝されている可能性が示唆された。

本研究により、超音波、超純水に加え、少ない化合物の添加で cell-free 翻訳溶液が作れることは示された。超音波装置からの細胞抽出液調製は生化学において通常操作であり、また超純水で抽出しても機能を失わない安定さ、添加塩類の少なさから、本発表の手法は cell-free 翻訳溶液を自前で調製するのに簡便な方法であるといえる。

Cell-free protein expression, Synthetic biology, Biotechnology

講演番号：2C23a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ C校舎23会場

海洋深層水を利用した *Dunaliella salina* の産業的大量培養方法の確立

Establishment of industrial mass cultivation method of *Dunaliella salina* using deep seawater

○ 松田 岳大[1]、工藤 勇人[1]、花崎 金行[2]、金枝 栄寿[2]、竹中 裕行[3]、山口 裕司[3]、津嶋 貴弘[4]、林 芳弘[4]、島村 智子[1]、柏木 丈拡[1]、受田 浩之[1] ([1]高知大・農、[2]赤穂化成 (株) 、[3]マイクロアルジェコーポレーション (株) 、[4]高知県海洋深層水研究所)

○ Takehiro Matsuda[1], Hayato Kudo[1], Kaneyuki Hanasaki[2], Shigetoshi Kanaeda[2], Hiroyuki Takenaka[3], Yuji Yamaguchi[3], Takahiro Tsushima[4], Yoshihiro Hayashi[4], Tomoko Shimamura[1], Takehiro Kashiwagi[1], Hiroyuki Ukeda[1] ([1] Faculty of Agliculture・Kochi Univ., [2]Ako Kasei Co., Ltd., [3]Micro Algae Co., [4]Kochi Prefectural Deep Seawater Laboratory)

【目的】微細藻 *Dunaliella salina* は、高塩分濃度環境下において機能性物質である β-カロテンを生成・蓄積することから、諸外国では、機能性食品素材として産業的に屋外で大量培養されている。しかし日本では、高濃度塩水の調達と広大な土地の確保が難しいため、産業的培養には至っていない。演者らはこれまで、高知県室戸市の海洋深層水を工業的に蒸発濃縮して製造した蒸発濃縮深層水の *D. salina* 培養液としての利用について検討、報告してきた(1)。本研究では、海洋深層水の取水地である室戸市を培養拠点とし、国内初の屋外での *D. salina* 産業的大量培養の実現へ向けて最適な培養条件の検討を行った。

【方法】*D. salina* の培養は高知県海洋深層水研究所の屋内または屋外にて行った。培養液として、蒸発濃縮深層水 (塩分濃度 16%) に栄養塩を添加したものを用いた。また、海洋深層水の低温安定性 (約 10˚C～12˚C) と表層水の冬季の水温 (約 16˚C～20˚C) を利用し、それぞれ培養容器周囲に常時掛け流すことで水温制御培養を行った。*D. salina* の生育は細胞濃度と β-カロテン含量を経時的に測定することで評価した。

【結果】屋外にて水温制御なしで 1 年間培養を行った結果、水温変化の激しい夏季及び冬季 (夏季 ： 最高水温 ; 50˚C、最低水温 ; 22.6˚C、冬季 ： 最高水温 ; 35.0˚C、最低水温 ; 2.3˚C) に *D. salina* の細胞増殖能が低下した (夏季 ：1.2×10^5 cells/mL、冬季 ：2.4×10^5 cells/mL) ことを除き、室戸の自然環境下においても培養可能であることが判明した。しかし、産業的通年培養を達成するためには、水温管理が不可欠であると推察された。そこで夏季は深層水、冬季は表層水を用いて水温制御培養法の検討を行ったところ、上記の問題は改善され、*D. salina* の順調な生育 (夏季 ： 最高水温 ; 29.7˚C、最低水温 ; 16.8˚C、細胞濃度 ; 3.3×10^5 cells/mL、冬季 ： 最高水温 ; 23.8˚C、最低水温 ; 10.2˚C、細胞濃度 ; 4.9×10^5 cells/mL) が認められた。さらに、藻体品質の判断基準となる β-カロテン含量について、水温制御前の最高値 (3.0 μg/mL) と比較すると、約 1.5 倍 (4.4 μg/mL) の値が得られた。以上から、深層水ならびに表層水を利用した水温制御培養を行うことで、*D. salina* の日本での産業的大量培養が可能であると考えられた。現在、*D. salina* 藻体品質の向上と新規利用価値の探究を目的とし、藻体の詳細な分析と育種改良を進めている。

(1) 新名ら、日本食品科学工学会第 56 回大会講演集、p.125 (2009).

Dunaliella salina, mass culture, deep seawater

講演番号：2C23a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ C校舎23会場

アルカリ性静置培養により生産される*Amphibacillus xylanus*のxylan分解酵素

Xylanolytic enzymes produced by *Amphibacillus xylanus* cultured on alkaline and static condition.

〇西田 俊介、佐藤 ひかる、望月 大地、藤田 信之[1]、佐藤 純一、川崎 信治、新村 洋一（ 東農大応生科・バイオ、[1]NITE ）

〇Shunsuke NISHIDA, Hikaru SATO, Daichi MOCHIZUKI, Nobuyuki FUJITA[1], Junichi SATO, Shinji KAWASAKI, Youichi NIIMURA (Dept. Bio., Tokyo Univ. Agric., [1]NITE)

【目的】Xylanは農産廃棄物に多く含まれる難分解性多糖類であり、アルカリ性条件下で可溶化する傾向があるため、好アルカリ性菌によるxylan分解研究が行われてきた。*Amphibacillus xylanus*（ 以下*A.xylanus* ）はxylanを糖源とし、アルカリ性下の無酸素・有酸素条件で良好に生育し、菌体自身で強力に酸素を吸収することにより静置培養で培地を嫌気状態に維持することが可能である。アルカリ性無酸素培養は有酸素培養に比べ培地中の他菌種のコンタミネーションを軽減する効果があり、静置培養は通気撹拌装置を省けることから、省エネかつ効率的なxylan分解が期待される。本発表では、本菌の効率的な生育とxylan分解条件の検討及びxylanaseの精製を試みたので、ここに発表する。

【方法・結果】① Xylan (oatspelts, beechwood, larchwood, birchwood)をそれぞれ糖源として調製した培地を用いて静置条件下で*A.xylanus*を培養し、pH変化により生育を推定した。その結果、beechwoodおよび oatspeltsにおいて特に良好な生育が観察された。② Xylan（ beechwood, oatspelts ）を糖源として調整した培地を用いて*A.xylanus*を静置培養し、培地中の全糖量を経時的に測定した。その結果、両xylan間で糖量の減少に大きな差は見られなかった。③ Beechwood xylanを糖源として調製した培地を用いて*A.xylanus*を好気および静置条件で培養し、培養上清のxylanase活性をソモギーネルソン法で経時的に測定した。その結果、静置条件において良好なxylanase活性が見られた。④ Beechwood xylanを糖源とする培地で*A.xylanus*を静置培養し、培養30時間（ 静止期初期 ）で集菌を行った。培養上清を20,000cutの限外濾過膜を用いて限外濾過し約10倍に濃縮した。得られた粗酵素液を陰イオン交換カラム（ DEAE-TOYOPEARL650S ）に供した結果、xylanase活性を有する3つの画分を得た。これらの画分をゲル濾過カラム（ Superdex 200pg ）に供して精製を試みている。独立行政法人NITEとの共同研究により、*A.xylanus* がxylanaseをコードする遺伝子を5つ持つことが示唆されている[1)]。

これらの結果を鑑み、*A.xylanus*におけるxylan分解機構について考察する。

【参考文献】

[1)]田中遥　2011年　農芸化学会年次大会 P107

xylan, xylanase, xylosidase

講演番号：2C23a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ C校舎23会場

Amphibacillus と乳酸菌の酸素存在下における Fe の影響（ 第２報 ）

Effect of iron in the growth of *Amphibacillus* and lactic acid bacteria under presence of oxygen.

○森田円史、望月大地、羽鳥宗佑、藤田信之[1]、安保充[2]、吉村悦郎[2]、中川純一[3]、佐藤純一、川崎信治、新村洋一（ 東農大応生科・バイオ、[1]（ 独 ） 製品評価技術基盤機構、[2]東大院農生科・応生化、[3]東農大生物産業・食科 ）

○Enji MORITA, Daichi MOCHIZUKI, Sosuke HATORI, Nobuyuki FUJITA, Mitsuru ABO, Etsurou YOSHIMURA, Junichi NAKAGAWA, Junichi SATO, Shinji KAWASAKI, Youichi NIIMURA (Dept. Bio. Tokyo Univ. Agric. [1]NITE, [2]Dept. of Appl. Biol. chem. school of Agric. Life science, Tokyo Univ. [3]Dept. food and Cosmetic. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】鉄は活性酸素種の解毒化、呼吸鎖での ATP 生産に補因子として関与しており、生物の生育において重要な因子である。その一方、活性酸素種の中で、最も強毒性のヒドロキシラジカルの発生に関与する両刃の剣である。ヘムタンパクを欠如する *A. xylanus* は好気的生育に鉄要求性が示唆されている。一方、*A. xylanus* と同様にヘムタンパクを欠如した乳酸菌の中には、生育に鉄を要求しない株の報告が有る。しかし、乳酸菌において鉄要求性と酸素存在下での生育との関係は不明である。そこで *A. xylanus* と乳酸菌の酸素存在下での鉄要求性について検討した。なお、*A. xylanus* の鉄関連タンパク質の酸素存在下、非存在下におけるノーザン解析も行った。

【方法・結果】供試菌株は*Lactobacillus plantarum* NRIC 1067^{T}, *Pediococcus pentosaceus* NRIC 0099^{T}, *Streptococcus thermophilus* NRIC 0256^{T}, *Streptococcus mutans* JCM 5705^{T}, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* NRIC 0665^{T}を用いた。鉄要求性の為の半合成培地は、Otto らによる乳酸菌用合成培地 (*L. plan.*^{T}, *P. pent.*^{T})、田村・角田培地 (*L. delb.*^{T})、B. Terleckjy らによる乳酸菌用合成培地 (*S. thermo.*^{T}, *S. mutans*^{T})、を基本に調製した。これらの培地で*L. plan.*^{T}, *P. pent.*^{T}は好気培養で良好な生育を得られた。*S. thermo*^{T}, *S. mutans*^{T}, *L. delb*^{T}. は静置培養でのみ生育が得られた。両条件下での鉄要求性は、*L. plan*^{T}, *P. pent*^{T}では見られなかった。現在、他の菌株で鉄要求性実験を行っている。今後、培養で用いた培地中の鉄含量の測定は偏光ゼーマン原子吸光度計を用いて行う。

A. xylanus は全塩基配列が解読されており、ゲノム解析より鉄代謝系および鉄タンパク質としてferredoxin, 7Fe ferredoxin, Suf BCD, aconitate hydratase, peptide deformylase, DNA protection during starvation protein 等の存在が推定されている。そこで鉄濃度1 ppm で好気・嫌気培養した菌体を用いてノーザン解析を行った。その結果、転写の誘導が観察された遺伝子があり、現在、鉄濃度を低濃度と高濃度で好気・嫌気培養した菌体を用いて同様にノーザン解析を行っている。

【参考】

森田円史ら 2011 農芸化学会　年次大会　要旨集　P 107

Iron, Amphibacillus, Lactic acid bacteria

講演番号：2C23a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ C校舎23会場

*Amphibacillus xylanus*における遊離フラビン関与の酸素代謝（ 第二報 ）

Oxygen metabolism related to flavins in *Amphibacillus xylanus*

○望月大地、新井俊晃、木俣真弥、中川純一[1]、阿部晃[2]、佐藤純一、川﨑信治、新村洋一（ 東農大応生科 • バイオ、[1]東農大生物生産 • 食香、[2]札幌医大医 • 眼科 ）

○Daichi MOCHIZUKI, Toshiaki ARAI, Shinya KIMATA, Junichi NAKAGAWA, Akira ABE, Junichi SATO, Shinji KAWASAKI, Youichi NIIMURA (Dept. Bio., Tokyo Univ. Agri. [1]Dept. Food and Cosmetic., Tokyo Univ. Agri. [2]Dept. Oph., Sapporo Med. Univ.)

【背景】

本実験の供試菌である*Amphibacillus xylanus*は農産廃棄物の有効利用を目的として、本研究室により単離命名されたグラム陽性桿菌である。本菌は呼吸鎖を欠如し、ヘムカタラーゼも欠如するが好気、嫌気両条件下で同等に良好生育し、キシランを分解資化する。本菌は強力な酸素吸収能と酸素ストレス抵抗性を有しており、0 ～ 80 % 酸素濃度で良好に生育する。我々の研究チームではこの酸素代謝に着目し、研究を行ってきた。本菌の主要な酸素代謝はNADH oxidase (Nox) が、過酸化物分解はNADH oxidase - AhpC (Nox - Prx) 複合体が関与すると推定された[4)]。Noxは遊離フラビン存在下で酸素に対する親和性が著しく上昇する[1)]ことから本菌の酸素代謝への遊離フラビンの関与が示唆された[2)]。フラビンは一般にタンパク質の補因子として機能することが知られているが、遊離フラビンの存在、機能、生理的意義は不明である。そこで我々は、本菌の好気代謝における遊離フラビンの生理的な意義の解明を試みている。前大会までに、好気条件下におけるフラビン合成系遺伝子群の転写誘導、菌体内遊離フラビン含量の増加を見いだした[3)]。本大会では好気振盪培養菌体内の遊離フラビン濃度と、遊離フラビン依存性の酸素代謝酵素について報告する。

【方法・結果】

5 L三角フラスコを用いて好気振盪条件で培養した菌体をフラビン分析に供した。菌体中主要遊離フラビンはFADであり、濃度は約10 μMと算出された。生理的フラビン濃度条件下で酸素代謝酵素として機能する酵素の精製は10 μM FAD存在下でのNADH oxidase活性を指標として行った。Butyl TOYOPEARL 650S, DEAE sephacel, POROS HQ / H カラムを順に使用し、遊離フラビン存在下でNADH oxidase活性を持つ酵素を精製した。本精製酵素はFMNを補因子とし、FAD存在下でNADH oxidase活性を有していた。酸素電極を用いた活性測定の結果より、代謝産物はH_2O_2と示唆された。現在、Nox - Prxを構成するNoxとの比較解析を行っている。

【 Reference 】

1) Ohnishi K et al. *J Biol Chem.* 1994 Dec 16 ; 269(50) : 31418 - 31423

2) Nishiyama Y et al. *J Bacteriol.* 2001 Apr ; 183 (8) : 2431 - 2438

3) 望月大地ら 2011 農芸化学会 年次大会 要旨集 P 107

4) Arai T et al. Flavins and Flavoproteins 2008 P381 - 384

Flavin, *Amphibacillus xylanus*, Oxygen

講演番号：2C23a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ C校舎23会場

メタン資化性細菌の植物葉上での生存戦略

Survival strategy of methanotrophs on plant leaves

○井口 博之、佐藤 出、厚主 聡美、由里本 博也、阪井 康能（京大院農・応用生命）
○Hiroyuki IGUCHI, Izuru SATO, Satomi, KOUNUSHI, Hiroya YURIMOTO and Yasuyoshi SAKAI (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景】メタンは二酸化炭素に次ぐ温室効果ガスであり、メタン生成菌による嫌気的な生産や化石燃料などを由来とした発生がこれまで知られていたが、近年、植物の細胞構成成分であるペクチンを由来としてメタンが発生していることが明らかになった（Nature. 2006. 439:187-191）。一方、メタン資化性細菌が広範な自然環境中に生息してメタン酸化を行うことによって大気中メタン濃度が調節されているが、これまで植物葉圏でのメタン資化性細菌の生態はほとんど知られていなかった。そこで、我々は培養法によって植物からメタン資化性細菌のスクリーニングを行い、様々な種の植物にメタン資化性細菌が生息していることを明らかにした（2009年度本大会 講演要旨集 p.86）。今回、葉から取得したメタン資化性細菌を用いて、葉上でのメタン資化性細菌の動態を解析した。

【結果】葦の葉から単離したメタン資化性細菌*Methylosinus sporium* B4S株に、トランスポゾンを用いて*gfp*遺伝子を導入した。得られた*gfp*発現株をシロイヌナズナ葉とタバコ葉に接種して、蛍光顕微鏡観察を行った結果、2週間以上の後も蛍光が認められた。しかし、シロイヌナズナ葉上での菌数の変化を定量PCRによって追跡した結果、日数の経過に伴って*M. sporium* B4S株の菌数は徐々に減少していた。シロイヌナズナからはメタンが発生していない可能性が考えられたため、メタンを加えた気相条件下で実験を行ったが、*M. sporium* B4S株の菌数は同様に減少傾向を示した。以上の結果より、本実験条件下でメタン資化性細菌の増殖は見られなかったが、メタン資化性細菌が葉上で長期間に渡って生存が可能であることが示唆された。近年、植物上での生育に必要なストレス応答性因子として*phyR*遺伝子が発見され、*α-Proteobacteria*に保存されていることが報告されている（PNAS. 2006. 103:13186-13191）。そこで本菌において、*phyR*遺伝子のクローニングと遺伝子破壊を行った。インバースPCR法によって、*phyR*, *nepR*, *ecfG*のレギュロン遺伝子ホモログを同定し、続いて*phyR*遺伝子破壊株を作成した。現在、*phyR*遺伝子破壊株について、*in vitro*でのストレス耐性ならびに葉上での増殖を解析している。

methanotroph., methane, plant leaves

講演番号：2C23a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ C校舎23会場

シソに生息する*Methylobacterium* 属細菌の分布とその特性評価

Distribution and characterization of *Methylobacterium* spp. on perilla leaves and seeds

○水野雅之[1]、井口博之[1]、谷　明生[2]、由里本博也[1]、阪井康能[1]
([1]京大院農・応用生命、[2]岡山大・資源植物科学研)
○Masayuki Mizuno[1], Hiroyuki Iguchi[1], Akio Tani[2], Hiroya Yurimoto[1], Yasuyoshi Sakai[1]
([1] Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ., [2]Institute of Plant Science and Resources, Okayama Univ.)

【目的】　植物葉圏には、Pink Pigmented Facultative Methylotroph (PPFM) として知られる *Methylobacterium* 属細菌をはじめ、多くのメタノール資化性細菌が広く分布しており、植物と微生物間の相利共生や地球温暖化防止の観点から注目されている。我々はこれまでに、種々の野菜葉圏に生息する PPFM の分布を、メタノールを単一炭素源とする寒天平板培養法で調べた結果、同一場所において同時期に栽培された野菜でも、PPFM数 (CFU/g 新鮮葉) が野菜種によって異なっていること、市販品を含む全てのアオシソ葉で、最も多数の PPFM が検出されること、さらに、シソ種子から分離した PPFM の16S rRNA解析の結果、*Methylobacterium fujisawaense* DSM5686と*M. radiotolerans* JCM2831に近縁の種が多いことを明らかにした[1)]。本研究では、シソ種子および各地で栽培した新鮮葉と、新たに収穫した種子から PPFM を分離し、MALDI-TOF/MS を用いた系統解析および 16S rRNA 解析に基づいて、その特性評価を行った。

【結果】　アオシソ種子(タキイ種苗) から分離した PPFM の 16S rRNA 解析の結果、分離した８株全てが *M. radiotolerans* JCM2831 の16S rRNAと１塩基異なる同一配列を持ち、アカシソ種子(2009年産大原ちりめんアカシソ[土井志ば漬本舗])から分離した12株の PPFM については、11株が*M. fujisawaense* DSM5686と１塩基異なる同一配列を持っていた。このアカシソ種子を、2010年に４地域 (山形、静岡、三重、京都) でプランター栽培し、新鮮葉と収穫した種子から PPFM を分離して、MALDI-TOF/MS 解析および 16S rRNA 解析を行った。山形、静岡、京都で栽培された葉由来 PPFM は、全て *M. fujisawaense* が最近縁種であったが、三重で栽培された葉由来 PPFM は、全て*M. radiotolerans* が最近縁種であった。一方、各地で収穫された種子から分離した PPFM は、全ての地域において*M. fujisawaense* DSM5686が最近縁種であった。さらに、土井志ば漬本舗より入手した３年分 (2009年～2011年産) のアカシソ種子および新鮮葉・栽培土壌・周辺環境(2011年)から分離した PPFM は、すべて*M. fujisawaense* が最近縁種であった。以上の結果から、シソ類と PPFM の間に、種レベルで特異的相互作用のあること、その特異性が世代や地理的要因を超えて維持されていることが示唆された。

1) 日本農芸化学会2011年度大会講演要旨集 p.258

Methylobacterium, perilla, phyllosphere

講演番号:2C23a07
講演日時、会場:3月23日10:16～ C校舎23会場

適応育種による耐熱性酵母の取得と耐熱性機構の考察

Acquisition of thermotolerant yeast by adaptive breeding and analysis of mechanisms of thermotolerance

○勝山 義明、黒田 浩一、植田 充美（京大院農・応用生命）
○Yoshiaki Katsuyama, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda (Kyoto Univ., Div. Appl. Life Sci.)

【目的】近年バイオ燃料生産において酵母による発酵を利用した系が用いられている。しかし、発酵時に副次的に発生する熱の影響により生育に悪影響が出るため、熱による生産効率の低下が起こる。さらに、その後のエタノール蒸留の段階では加熱が必要となるため、コスト面、エネルギー収支において最適化が問題となっている。そこで、高温条件下でも良好に生育し、高効率に発酵生産を行うことのできる耐熱性酵母を獲得することができれば有用であることが予測されている。本研究では、適応育種による耐熱性酵母の取得を試み、さらに得られた耐熱性酵母のDNAマイクロアレイ解析を行うことによって、耐熱性獲得機構を考察した。
【方法と結果】実験室酵母*Saccharomyces cerevisiae* MT8-1株を親株として生育温度を2℃ずつ上昇させ、設定した温度に適応するまで継代培養を繰り返しながら、耐熱性を示す適応育種株の取得を試みた。その結果、適応育種によって、親株が生育できない、42℃という高温条件下でも生育可能である耐熱性株を獲得することができた。また、この耐性株は通常の生育条件である30℃においても親株と比較して良好な生育を示すことが確認できた。さらに、得られた適応育種株と親株を通常条件である30℃、もしくは、熱ストレス条件である40℃で培養し、mRNAを抽出した後、DNAマイクロアレイ解析を行った。このDNAマイクロアレイ解析の結果から、酵母が耐熱性を獲得した理由を考察した。

thermotolerance, adaptive breeding, DNA microarray

講演番号:2C23a08
講演日時、会場:3月23日10:27～ C校舎23会場

出芽酵母における染色体からのセントロメアDNAの切り出しによる細胞死の誘導

Cell death caused by excision of centromeric DNA from a chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*

○松崎 浩明、宮本 昭弘、柳本 敏彰、秦野 琢之（福山大・生命工・生物工）
○Hiroaki Matsuzaki, Akihiro Miyamoto, Toshiaki Yanamoto, Takushi Hatano (Fukuyama Univ.)

【目的】遺伝子組換え生物が野外で拡散すると環境へ及ぼす影響が危惧される。遺伝子組換え生物の野外での拡散を防止するために遺伝子組換え生物に条件致死性質や不稔性質を付与することが重要である。条件致死性質や不稔性質の付与に部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメアDNAを切り出し、細胞死を誘導することが有効であると考えられる。そこで、酵母*S. cerevisiae*をモデル生物としてpSR1プラスミドの部位特異的組換えを利用してセントロメアDNAを切り出して細胞死を誘導することを検討した。
【方法・結果】まず、一倍体細胞において第IV番染色体のセントロメア配列（*CEN4*）の両側に組換え部位配列(RS)を同じ方向に挿入した後、この細胞に*GAL1*プロモーター制御下でレコンビナーゼ遺伝子が発現するプラスミド（レコンビナーゼ発現プラスミド）を導入し、ガラクトースによりセントロメアDNAの切り出しが誘導される酵母を作製した。次に、この細胞のガラクトースおよびグルコースプレートにおける生育を調べた結果、グルコースプレートでは多数のコロニーが出現したが、ガラクトースプレートではほとんど出現しなかった。また、組換え部位を挿入していない株やレコンビナーゼ遺伝子が破壊された株ではガラクトースプレートでも多数のコロニーが出現した。さらに、ガラクトース液体培養での増殖はグルコース液体培養よりも遅く，細胞の生存率は低下した。パルスフィールドゲル電気泳動で分離した染色体DNAに対するサザン解析から、この時に第IV番染色体から*CEN4* DNAが切り出されていると考えられた。したがって、一倍体細胞においてセントロメアDNAの切り出しによって細胞死を誘導できた。さらに、二倍体細胞においてプレート培養と液体培養の両方で第IV番相同染色体の両方からセントロメアDNAを切り出すことにより細胞死を誘導できた。しかし、これらの生存率は一倍体細胞よりも高かった。一倍体細胞においてガラクトースプレートで切り出しを誘導しても生存した細胞クローンについて、生存原因を解析しようとしている。

cell death, centromere, site-specific recombination

講演番号:2C23a09
講演日時、会場:3月23日10:38～ C校舎23会場

Ca^{2+}シグナルによる出芽酵母の複製的寿命制御機構の解析

Analysis of the mechanism for the regulation of yeast lifespan mediated by the Ca^{2+}-signaling pathways

○長尾 悠広[1]、椿山 諒平[2]、水沼 正樹[2]、平田 大[2]（[1]広島大・工、[2]広島大院・先端研・分子生命）
○Yuko Nagao[1], Ryohei Tsubakiyama[2], Masaki Mizunuma[2], Dai Hirata[2] ([1]Dept. of Eng. Hiroshima Univ., [2]Dep. of Mol. Biotech., Grad. Sch. of AdSM, Hiroshima Univ.)

【目的】

我々は、Ca^{2+}シグナルによる細胞周期及び増殖制御の全体像を明らかにするため、*zds1*破壊株が示すCa^{2+}感受性を抑圧する変異株*scz*を多数取得した。*scz*変異は14の遺伝子座に分類され、*scz14*の原因遺伝子は*SIR3*である事が明らかとなった。Sir3は、*MAT*座やテロメア領域のサイレンシングに関与しており、ストレス応答や老化にも関与することが報告されている。しかし、酵母のCa^{2+}シグナルと寿命制御との関係は明らかになっていない。そこで本研究では、他の*SCZ*の寿命への関与の可能性も検証する事により、Ca^{2+}シグナルが関与する老化制御機構の解明を目的とした。

出芽酵母では、細胞老化のモデルとして複製的寿命と経時的寿命が知られている。複製的寿命は、老化するまでの母細胞によって行われた有糸分裂サイクルの回数で定義されており、多細胞生物における活発に分裂している細胞の老化モデルとなりうる。一方、経時的寿命は、定常期に入って増殖が止まった細胞の生存率で定義されており、分裂が終了した細胞の老化モデルとなりうる。本研究では、寿命制御機構の全容を明らかとするために、出芽酵母のCa^{2+}シグナルと複製的寿命との関連に注目し、解析を行った。

【方法・結果】

まず、Ca^{2+}シグナルの寿命制御への関与を明らかにするため、Ca^{2+}シグナル伝達経路に欠損をもつ変異株(*Δswe1*株/*scz1*, *Δmpk1*株/*scz2*, *Δbck1*株/*scz3*, *Δcnb1*株/*scz4*, *scz5*, *pkc1*株/*scz6*, *sah1-1*株/*scz7*, *Δmck1*株/*scz10*, *scz13*, および*Δsir3*株/*scz14*)と*Δzds1*株について複製的寿命を調べた。複製的寿命は新生娘細胞の出芽した回数の平均によって決定した。その結果、すべての*scz*株において、野生株と比較して寿命が短くなった。特に、*Δmpk1*株、*Δbck1*株、*pkc1*変異株、*sah1-1*変異株において著しく短くなる事が明らかとなった。また、細胞の老化によってテロメアが短縮化することが示唆されている事から、*scz*株のテロメア長をSouthern blot法を用いて解析した。その結果、*Δzds1*株および多くの*scz*変異株が、野生株と比較してテロメア長が短く、特に*sah1-1*変異株において顕著な短縮化が観察された。以上より、*SCZ*がテロメア長と寿命制御に関与し、Ca^{2+}シグナルがそれらの制御において何らかの役割を担う事が予想された。

calcium, Budding Yeast, Lifespan

講演番号：2C23a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ C校舎23会場

出芽酵母における新規寿命制御因子の同定と機能解析

Identification of a novel regulator of lifespan and analysis of its functions in budding yeast

○椿山諒平、水沼正樹、久米一規、平田大（広島大院・先端研・分子生命）
○Ryohei Tsubakiyama, Masaki Mizunuma, Kazunori Kume, Dai Hirata (Dep. of Mol. Biotech., Grad. Sch. of AdSM, Hiroshima Univ.)

【目的】

我々は、Ca^{2+}シグナル経路の生理機能を解析する過程で、本経路の欠損が寿命に影響をおよぼすことを見出した。特に、*S*-アデノシルホモシステイン (AdoHcy)水解酵素の変異株 *sah1-1*/*scz7* は、野生株と比較して許容温度においても増殖遅延が観察され、寿命が短く、興味深いことにテロメア長の著しい短縮化も観察された。さらに、*sah1-1* 変異株では、Sah1 の基質である AdoHcy だけでなく、*S*-アデノシルメチオニン (AdoMet)も高蓄積していた。AdoMet は、メチル基供与体として、DNA、リン脂質、およびタンパク質など様々な物質のメチル化反応に必須な生理化合物であり、一方、AdoHcy はこの反応を強く阻害する。これまで、AdoMet/ AdoHcy、またそれらが関わるメチル化制御が寿命に与える影響についてはほとんど解析されていない。そこで、本研究では *sah1-1* 変異株を用いた解析を通して、メチル化反応が関わる新規寿命制御因子を同定・解析し、メチル化制御と寿命制御との関係を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

sah1-1 変異株の増殖遅延を抑圧する変異株を取得することにより、寿命が延長した変異株が取得できると予想し、新規寿命制御因子の取得を試みた。現在までに抑圧変異株を多数取得し、いずれの変異も優性変異であり、遺伝的解析の結果、変異は 1 つの遺伝子座に集約された。そこで、この抑圧変異を *ssg1* (Spontaneous Suppressor of Growth-delay of the *sah1-1*)変異と命名した。さらに、*SSG1* 遺伝子のクローニングの結果、その原因遺伝子は *ERC1* (過剰発現によってメチオニンの構造アナログであるエチオニン耐性となる遺伝子として取得、同定された遺伝子)と同一遺伝子であった。

*ssg1*変異によって*sah1-1*変異株の増殖遅延が抑圧されたことから、*sah1-1 ssg1*二重変異株では*sah1-1*変異株の寿命およびテロメア長の短縮といった表現型も抑圧できることが予想された。実際、*sah1-1 ssg1*二重変異株の寿命は野生株と同程度まで回復し、テロメアの短縮も抑圧された。これらの結果より、*SSG1*遺伝子が新規な寿命制御因子である可能性が示唆された。一方、*sah1-1* 変異株で高蓄積しているAdoMetおよびAdoHcyの細胞内含量をキャピラリー電気泳動により測定したところ、*sah1-1 ssg1*二重変異株では両物質とも*sah1-1*変異株よりも有意に高蓄積していることが明らかとなり、これらの物質が寿命の延長につながることが示唆された。さらに、*ERC1* 破壊株および*ERC1*高発現株を作製し、*sah1-1*に対するそれらの効果を調べたところ、*ssg1*変異とは異なり、何の影響も観察されなかった。以上の結果から、*ssg1*変異は寿命制御に対して極めて重要な機能を持つことが示唆された。

今後は、*ssg1*変異による寿命制御の全容を明らかにするため、寿命延長に必要な因子の同定とともに、既知の寿命制御経路との関係を明らかにする予定である。

Yeast, Lifespan, *S*-adenosylmethionine

講演番号:2C23a11
講演日時、会場:3月23日11:10～ C校舎23会場

分裂酵母*S. pombe*におけるオリゴペプチド・アミノ酸利用を制御するネットワークの解析

Regulatory mechanism for utilization of oligopeptides and amino acids in fission yeast

○北村　憲司（広島大・自然科学研セ・遺伝子）
○Kenji Kitamura(Hiroshima Univ., CGS)

【目的】 細胞外のアミノ酸やオリゴペプチドの利用は微生物の生育や生理にとって重要な問題であり、またそれらの取込みを人為的に調節できれば、微生物の高機能化や育種、物質生産などにも役立つと考えられる。ペプチドを有効利用する手段の開発と、オリゴペプチドの機能性評価系の構築を目指し、ペプチドの利用を制御する機構を明らかにする。
【方法】 オリゴペプチドは、アミノ酸とは異なる独自の輸送体により細胞内に取込まれるが、分裂酵母*S. pombe*には少なくとも４種のペプチド輸送体候補蛋白質が存在する。各々の遺伝子をゲノムから欠失した株のペプチド利用能を調べた。更にオリゴペプチドやアミノ酸の利用能が変化した変異株を単離し、非天然のものを含むペプチドやアミノ酸による影響を調べた。
【結果】 分裂酵母で唯一のPTRファミリー輸送体であるPtr2の遺伝子をノックアウトすると、調べた全てのジペプチドが利用不能になった。また、分裂酵母の３種のOPTファミリー蛋白質のうち、Isp4が機能しないとテトラペプチドが利用できないため、Ptr2とIsp4が主要なペプチド輸送体と思われる。N端がbenzyloxycarbonyl化されたジペプチド(Z-Ile-Leu)は、予想外にもIsp4を介して細胞に入りロイシンとして利用されたのに対し、N端に同じbenzyloxycarbonyl基を持つトリロイシンのアルデヒド体（Z-Leu-Leu-Leu-CHO;プロテアソーム阻害剤のMG132）は、Ptr2, Isp4を含めた４つの輸送体候補遺伝子を全てノックアウトした細胞においても有効に作用した。MG132が特異的な輸送体を介して細胞に取込まれるかについてはまだ不明である。
　機能欠損によりJohanson-Blizzard病を発症するヒトUbr1ユビキチンリガーゼの類似蛋白質として、分裂酵母にはUbr1とUbr11の２種が存在する。多様な現象に必要なUbr1に対し、ノックアウトしても顕著な異常がないUbr11の生理作用は謎だったが、Ubr11がオリゴペプチド利用に必要であり、Ubr11機能欠損株では前述のPtr2, Isp4の両ペプチド輸送体遺伝子の発現量が非常に低下している事を見つけた。*ubr11*株のペプチド輸送体遺伝子発現欠損を回復させる抑圧変異（*upa1*）を単離して性質を調べたところ、アミノ酸アナログ耐性や、人工甘味料アスパルテームなど一部の非天然ジペプチドの利用能が顕著に変化していた。特に抗老化作用などが注目されているジペプチドのカルノシンは、*upa1*変異株特異的に生育を強く阻害した。更に、*upa1*株を親株として、オリゴペプチドは利用できるものの、複数種のアミノ酸が利用できない変異株(*uaa1*)が得られた。*uaa1*変異株では複数種のアミノ酸輸送体の発現、又は機能が影響を受けていると考えられる。*upa1*や*uaa1*遺伝子産物はまだ不明であり、アミノ酸やオリゴペプチド利用を制御するネットワークについて更に詳しく調べるため、Ubr11の具体的な機能解明や、*upa1*抑圧変異遺伝子等のクローニングを行っている。

oligopeptide transporter, Ubr ubiquitin ligase, *S. pombe*

講演番号：2C23a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ C校舎23会場

出芽酵母の低親和性トリプトファン輸送体Tat1のユビキチン依存分解における細胞質末端の役割

Role of the cytolasmic domains on ubiquitin-dependent degradation of the low-affinity yeast tryptophan permease Tat1

○出口 弘樹[1]、鈴木 麻葉[1]、上村 聡志[1]、阿部 文快[1,2]（[1]青山学院大・理工・化学生命、[2]海洋研究開発機構）

○Hiroki Deguchi[1], Asaha Suzuki[1], Satoshi Uemura[1], Fumiyoshi Abe[1,2] ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】出芽酵母におけるトリプトファンの取り込みは、低親和性のTat1、および高親和性のTat2という2種類の輸送体により担われている。私たちは、酵母細胞に高水圧や低温などのストレスがかかると、これらの輸送体がRsp5ユビキチンリガーゼに依存し分解することを報告している。Tat2ではユビキチン化されるN末端リジン残基、およびユビキチン化に対し負に作用する、すなわちTat2の安定化に働くC末端の変異を見いだしているが、Tat1ではいずれも不明のままである。そこで本研究では、Tat1の細胞質末端に着目し、欠損や変異を導入することでユビキチン化に関与するアミノ酸残基を同定し、Tat1の制御機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】Tat1のN末端領域には11個のリジン残基があるので、部位特異的変異導入によりそれらを様々な組み合わせでアルギニンに置換した（K>R変異）。C末端領域については、これを末端側から10、20、30および37個のアミノ酸残基を欠損させるため、途中に停止コドンを挿入した。以下、それぞれ発現するタンパク質をTat1 C-del10, Tat1 C-del20, Tat1 C-del30およびTat1 C-del37と呼ぶ。このようにして構築されたプラスミドを野生型YPH499株、および*RSP5*の変異によりユビキチンリガーゼ活性が低下している*HPG1-1*株に導入した。そしてHAを標識としたウエスタンブロッティングを行い、これらの変異がTat1の安定性にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

【結果】N末端のK>R変異体についてはプラスミド構築が終了し、現在Tat1の安定性とユビキチン化の有無について解析を行っている。一方、C末端変異体についてウエスタンブロッティングを行ったところ、Tat1 C-del10, Tat1 C-del20およびTat1 C-del30では分子量に相当してバンドがシフトした。ところが、Tat1 C-del 37では予想された低分子量バンドのほかに、高分子量側にもう1本のバンドが検出された。*HPG1-1*株でも同様に2本のTat1 C-del 37バンドが検出されたが、野生株に比べ*HPG1-1*株ではTat1 C-del 37の高分子量バンドの割合が低いことがわかった。よって、高分子量側に見られたフラクションがユビキチン化と何らかの関連性があるものと考えられる。C末端から30番目と37番目の間にはアスパラギン酸に富む配列がある。そこで、現在この領域における変異体を作製し、Tat1のユビキチン化と安定性について解析を行っている。

Saccharomyces cerevisiae, tryptophan permease Tat1, ubiquitination

講演番号：2C23a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ C校舎23会場

出芽酵母の高親和性トリプトファン輸送体Tat2とGap1のキメラを用いた輸送体制御機構の解析

Analysis of chimeric proteins between the high-affinity tryptophan permease Tat2 and the general amino acid permease Gap1 in yeast

○望月　貴博[1]、阿部　文快[1, 2]（[1]青山学院大・理工・化学生命、[2]海洋研究開発機構）
○Takahiro Mochizuki[1], Fumiyoshi Abe[1, 2] ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】 出芽酵母のトリプトファン輸送は高水圧や低温などストレス下で制限され、その要求株の増殖は停止する。高親和性輸送体であるTat2の高発現はストレス耐性をもたらすが、Tat2によるトリプトファン取り込みのメカニズムや細胞内局在の制御はよくわかっていない。本研究では、Tat2と総アミノ酸輸送体Gap1の分子キメラを作製し、トリプトファン認識や輸送体タンパク質の制御機構の解明を目指した。

【方法】 DNAシャッフリング法によりTat2とGap1の膜貫通領域（TMD）を部分的に入れ換え、キメラタンパク質を発現するプラスミドを構築した。まず、*TAT2*の配列の末端に*GAP1*と相同な配列が付加されたプライマーを設計し、PCRを行なった。増幅断片を混合し2回目のPCRを行なうことで、*TAT2*の一部が*GAP1*と入れ替わったキメラ遺伝子を得た。このPCR産物を抽出後、ベクターとともにトリプトファン要求性のYPH499株に導入し、Gap Repair法によってPCR産物とベクターを連結した。作製したプラスミドをYPH499株に導入し、HAを標識としたウエスタンブロッティングを行なってキメラタンパク質の存在量を調べた。また、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを投与することで、Tat2分解のチェイス実験を行なった。作製したプラスミドを*tat2*Δ株に導入し増殖特性を調べた。さらに、GFP融合 Tat2-Gap1キメラタンパク質を発現させ細胞内局在を調べた。

【結果】 ウエスタンブロッティングを行なった結果、野生型Tat2に比べTat2-Gap1キメラタンパク質の存在量は高く、特にTat2のTMD9～12番目をGap1と置換したキメラ体でそれが顕著だった。シクロヘキシミドチェイス実験により、Tat2-Gap1キメラタンパク質の分解が抑制されていることがわかった。次に、Tat2のTMD9～12を一つずつGap1と置換したキメラを作製し、同様の実験を行なった。その結果、TMDの10番目あるいは11番目のキメラタンパク質の存在量が高く、分解も抑制されていた。*tat2*Δ株はYPD培地あるいは低濃度のトリプトファン存在下で増殖できないが、 Tat2-Gap1キメラはこの失陥を相補できなかった。GFP標識で細胞内局在を確認したところ、キメラタンパク質は細胞膜よりもむしろ小胞体に蓄積していることがわかった。このことは、Tat2-Gap1キメラタンパク質はフォールディングに異常が生じ、小胞体でCOPⅡ小胞に取り込まれなくなっている可能性を示唆している。

Saccharomyces cerevisiae, tryptophan permease Tat2, general amino acid permease Gap1

講演番号：2C23a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ C校舎23会場

ランダム変異導入法による出芽酵母の高親和性トリプトファン輸送体Tat2の機能解析

Functional analysis of the high-affinity yeast tryptophan permease Tat2 using random mutagenesis

完田 奈緒子[1]、○阿部 文快[1,2]（[1]青山学院大・理工・化学生命、[2]海洋研究開発機構）
Naoko Kanda[1], ○Fumiyoshi Abe[1,2] ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】出芽酵母におけるトリプトファンの輸送は細胞のアキレス腱と呼ばれ、高水圧や低温、あるいは様々な薬剤による損傷を受け、トリプトファン要求株の増殖を制限する。酵母のトリプトファンの取り込みを担う輸送体として低親和性のTat1と高親和性のTat2が知られており、いずれにも12個の膜貫通領域（TMD）の存在が予測されている。しかしながら基質認識や透過機構に関する詳細は共にほとんど明らかになっていない。本研究ではTat2に着目し、エラープローンPCRで導入したランダム変異体をスクリーニングすることで、トリプトファンの取り込みにおいて重要な役割を果たすアミノ酸残基を同定した。

【方法】Tat2の高発現株が高圧や低温で増殖することを利用し、多コピー導入にもかかわらずこれらの条件下で増殖しない株をスクリーニングした。まず、$MnCl_2$存在下で*TAT2*をPCRで増幅し、多コピーベクターを用いて変異型*TAT2*ライブラリーを作製した。次にこれをトリプトファン要求性のYPH499株に導入し、高圧（25 MPa, 25 ℃）あるいは低温（0.1 MPa, 10−15 ℃）条件下で増殖しない150株の変異体を取得した。全株についてウエスタンブロットを行い、野生型Tat2との間で発現量に差のない13株について、プラスミドを抽出し*TAT2*の塩基配列を決定した。単一ORFに生じた複数のアミノ酸置換については、部位特異的変異導入法により個々の置換を実施しふるい込みを行った。得られた変異型プラスミドを*tat2*Δ株に導入し、^{3}H-トリプトファンの取り込み活性を測定することで変異型Tat2の機能を評価した。

【結果】エラープローンPCRで得られた13個の変異型Tat2には、多数のアミノ酸置換が誘発されていた。うち、4つのクローンに共通するF324Y置換が7番目のTMDに認められた。部位特異的変異導入法を用いて、このフェニルアラニンをチロシンおよびロイシンに置換したところ、野生株に比べいずれの変異株もトリプトファン濃度の低い培地中での増殖に失陥が見られた。特にTat2^{F324L}でトリプトファンの取り込み能が著しく低下していた。一方、細胞内3HA-Tat2 ^{F324L}の存在量、およびTat2^{F324L}-GFPの局在は野生型とほぼ同等だった。このことは、324番目のフェニルアラニンがトリプトファン分子の認識、あるいは透過に重要な役割を果たすことを示唆している。今後、機能不全を誘発するアミノ酸置換を網羅的に探索することで、トリプトファンの認識や透過の分子機構の全容が明らかになるものと期待される。

Saccharomyces cerevisiae, tryptophan permease Tat2, TMD

講演番号:2C23p02
講演日時、会場:3月23日14:00～ C校舎23会場

*Clostridium thermocellum*マンナナーゼ Man5Aにおけるファミリー32糖質結合モジュール(CBM32)の機能

Functions of family 32 carbohydrate-binding module in *Clostridium thermocellum* Man5A

○水谷 公也、粟冠 真紀子、木村 哲哉、粟冠 和郎（三重大・生）
○Kimiya Mizutani, Makiko Sakka, Tetsuya Kimura, Kazuo Sakka (Mie Univ)

【目的】*Clostridium thermocellum* Man5A (Cthe_0821) はN末端側から触媒モジュール(CM)、ファミリー32 糖質結合モジュール(CBM32;F5F8 TypeC ドメイン)、ドックリンモジュールの3つのモジュールから構成されている。これまでの研究でCBM32はマンナンに対し吸着すること、CBM32の有無によってマンナンの分解産物が変化することが確認された。この原因が、CBM32が加水分解反応の基質認識に直接関与するとともに、糖転移反応にも影響を与えていると予想し、今回の実験ではMan5Aの分解性に与えるCBM32の影響と活性を除去した変異酵素を用いて酵素の基質への親和性について詳しく調べた。
【方法】Man5Aの活性部位の1つである247番目のアスパラギン酸をアラニンへ変異させ、活性を除去した変異酵素を作成した。触媒モジュール(rCM E247A)とCBM32を持つ触媒モジュール(rCM-CBM E247A)の2種類の変異酵素を*C. thermocellum*のゲノムを鋳型としてPCR法を用いた部位指定突然変異導入法で作成し、大腸菌で発現した。発現したタンパク質はNative Affinity PAGEを用いてそれぞれの基質に対する親和性を調べた。また、Man5Aの糖転移反応を調べる為にマンノトリオース(M3)、マンノテトラオース(M4)を基質とし、エタノール、1-ブタノール、1-ヘキサノール、1-オクタノール、1-ブタンジオールを受容体としたときの、Man5Aの触媒モジュール(rCM)とCBMを持つ触媒モジュール(rCM-CBM)による糖転移反応物を薄層クロマトグラフィーで調べた。
【結果】Native Affinity PAGEの結果、rCM E247AとrCM-CBM E247Aはそれぞれコンニャクグルコマンナン(KGM)とキャロブガラクトマンナン(CGM)に対して高い親和性を示し、KGMに対してはrCM E247Aの方が、CGMに対してはrCM-CBM E247Aの方が高い親和性を示した。CGMより高度にガラクトースで修飾されたガラクトマンナンであるグアーガム(GGM)に対してはrCM-CBM E247Aのみが親和性を示した。このように、Man5Aの持つrCMとCBM32の基質に対する親和性は必ずしも一致しない事が確認された。また*Yersinia enterolitica*由来のCBM32が親和性を示すポリガラクツロン酸に対してrCM E247AとrCM-CBM E247Aはともに親和性を示さなかった。糖転移反応では1-ヘキサノールと1-オクタノールを受容体として用いた時に基質が受容体へ転移した産物が確認され、転移産物はrCMを用いた反応で多く現れた。この結果はCBM32の存在は糖転移反には阻害的に働く事を示唆している。またマンノトリオースを基質としたときにマンノテトラオースやマンノペンタオース、マンノヘキサオースの生成が確認された。CBM32は基質の非還元末端側に作用していると予想しており、今後は還元末端を修飾した基質を用いて酵素のサブサイトについて調べ、またそれぞれの変異酵素のマンノオリゴ糖に対する吸着特性もITCを用いて調べる予定である。

Keyword1 Carbohydrate-binding module, Keyword2 Mannanase, Keyword3 Cellulosome

講演番号：2C23p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ C校舎23会場

Raoultella ornithinolytica MB426株由来のL-リボースイソメラーゼを用いたL-アロースの生産

Production of L-allose by L-ribose isomerase from *Raoultella ornithinolytica* MB426

○寺見優司、吉原明秀[1]、森本兼司[1]、高田悟郎[1]（香川大・農、[1]香川大農・希少糖研セ）

○ Yuji terami, Akihide Yoshihara[1], Kenji Morimoto[1], Goro Takata[1] (Kagawadai, [1]RSRC,Kagawadai)

【目的】当研究室では、様々な異性化反応、酸化還元反応を用いて、天然に微量しか存在しない希少糖生産を行っている。それら反応に重要な酵素の中でも、本研究ではL-リボースイソメラーゼ（L-RI）に着目した。L-RIはL-リボースとL-リブロース間の可逆的異性化反応を触媒する酵素であり、その他にもL-プシコースとL-アロース間にも作用する。われわれは新たに *Raoultella ornithinolytica* MB426 株由来の L-RI を発見し、その熱安定性は 40℃までと以前報告されたL-RIより高く、この菌由来のL-RIを用いてL-アロースの生産を試みた。

【方法】まず始めに希少糖D-プシコースを出発源としアリトールの生産を試みた。水素化ホウ素ナトリウムにより水素還元し、生産物としてアリトールとD-タリトールを得た。次のステップとして、L-アロース生産の基質となるL-プシコースの生産を試みた。アリトールとD-タリトールを基質とし*Gluconobacter thailandicus* NBRC 3254を用いた洗浄菌体反応により、L-プシコースとD-タガトースを生産し、生産物を分離・精製した。

次に大腸菌内で大量発現した *R. ornithinolytica* MB426 株由来の L-RI をキトパールに固定化し固定化 L-RI を用いて L-プシコースを基質として酵素反応を行い、目的物である L-アロースの生産を試みた。現在この反応における L-アロース生産の最適条件および、旋光度、NMR など諸性質の検討を行っている。

【結果】水素化ホウ素ナトリウムを用いた還元反応では、原料のD-プシコースの80%がアリトール、20%がD-タリトールに転換された。この段階においてこれらの糖の分離は困難でその上、*G. thailandicus* NBRC 3254を用いた洗浄菌体反応はどちらの糖も反応しうると考えられた。そのため、これらの糖を分離せず*G. thailandicus* NBRC 3254を用いた反応を行った。5%アリトール・D-タリトールを用いて30℃で48時間反応させたところ、ほぼ100%が生産物であるL-プシコースとD-タガトースに転換された。これを分離・精製し、L-プシコースのみを得た。

次に固定化L-RIを用いてL-アロースの生産においては、10%L-プシコースを基質とし40℃で24時間反応させたところ最終目的物であるL-アロースが約35%程度生産された。生産物を分離・精製し、L-アロースの諸性質の検討を行っている。

Rare sugar, L-ribose isomerase, L-allose

講演番号：2C23p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ C校舎23会場

Aspergillus oryzae KBN616株およびその変異株によるキシリトール生産

Xylitol production by *Aspergillus oryzae* strain KBN616 and its mutants

○丸山洋平[1]、有浦淑帆[2]、中村浩平[1]、北本則行[3]、鈴木徹[4]、高見澤一裕[1]（[1]岐阜大院・応生・資源生命、[2]岐阜大・応生・食品生命、[3]愛知産技研・食品工技、[4]岐阜大・連農）

○Yohei Maruyama[1], Shiho Ariura[2], Kohei Nakamura[1], Noriyuki Kitamoto[3], Toru Suzuki[4], Kazuhiro Takamizawa[1]（[1]Grad. Sch. Appl. Biol. Gifu Univ., [2]Appl. Biol. Gifu Univ., [3]Food Res. Center, Aichi Ind. Tech. Inst., [4]United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ.）

【目的】*Aspergillus oryzae*を用いてD-キシロースからのキシリトール生産を検討した。*A. oryzae*では、D-キシロースはキシロースリダクターゼ（XR）によりキシリトールへ還元され、キシリトールデヒドロゲナーゼ（XDH）によりD-キシルロースへ酸化された後、ペントースリン酸経路を経て代謝される。これまでに、XDH活性酵素をコードする*xdhA*、*ladA*遺伝子の破壊または削除により、キシリトール生産の向上を図ってきた。親株であるKBN616株と比較して、*xdhA*遺伝子削除株では約6倍、*ladA*遺伝子削除株では約1.6倍のキシリトールを生産することを既に報告した*。

今回はそれらの菌株の酵素活性を経時的に測定し、キシリトール生産と酵素活性の相関を検討した。また、XRの反応においては、生じたNADPHの再酸化が必要となる。そこで、低濃度のグルコースの添加により代謝経路中のNADPH再生能を高めることでキシリトール生産効率の向上を試みた。

【方法及び結果】*A. oryzae*の胞子をグルコース添加培地に植菌し、30℃、150 rpmで前培養を行った。菌体を洗浄後、回収を行い、植菌率５％となるようにキシロース添加培地に植菌した。48時間ごとに培養上清を1.0 mLサンプリングし、HPLCで測定した。また、酵素活性を測定するために菌体1.0 gを液体窒素及び海砂を用いて物理的に菌体を破砕し、100 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）を加えた。これを菌体内粗酵素溶液とし、NADPHの酸化量からXR活性を、NAD^+の還元量からXDH活性を測定した。XR活性では、1分間で1 μmolのNADPHの酸化を与える酵素量と定義し、XDH活性では、1分間で1 μmolのNAD^+の還元を与える酵素量と定義した。その結果、キシロース存在下において、XRは約1.0 U/mg付近で一定の値を示した。したがって、XDH活性の削除は効率的なキシリトール生産を可能とした。また、現在グルコース添加によるキシリトール生産について検討中であり、その結果を併せて報告する。

＊参考資料：日本生物工学会要旨集（２００９）、２Lp23

xylitol, *Aspergillus oryzae*, xylose reductase

講演番号：2C23p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ C校舎23会場

強アルカリ耐性アルドラーゼと化学的異性化反応を共役させた*N*-アセチルグルコサミンからの*N*-アセチルノイラミン酸の生産

Production of *N*-acetylneuraminic acid by coupling of strong alkaline-tolerant aldolase and chemical epimerization from *N*-acetylglucosamine.

○石井　康太[1]、日比　慎、永野　秀昭、萩下　大郎、小川　順[1]、清水　昌[1]、横関　健三
（京大院農・産業微生物、[1]京大院農・応用生命）
○Kota Ishii[1], Makoto Hibi, Hideaki Nagano, Tairo Hagishita, Jun Ogawa[1], Sakayu Shimizu[1], Kenzo Yokozeki (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [1]Ind. Microb., Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ.)

【目的】
我々は安価な*N*-アセチルグルコサミン(NAG)を原料に用いた、*N*-アセチルノイラミン酸(NANA)の効率的な生産手法を検討してきた。NAGはアルカリ条件下において*N*-アセチルマンノサミン(NAM)へと自発的に異性化する性質がある。そしてNAMを*N*-アセチルノイラミン酸アルドラーゼによりピルビン酸と縮合することでNANAを生産することができる。我々のこれまでの検討で、*Bacillus* sp. B株より取得したアルカリ耐性*N*-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ(BnanA)をアルカリ条件下（pH 10）において作用させることで、NAGからモル変換率約50 %でNANAを生産することに成功している。しかし、pH 10においてはNAGからNAMへの異性化反応がNANA生産の律速段階となり、これ以上の生産性の向上が見込めないことがわかった。そこで、NAGからNAMへの異性化反応が促進するより強アルカリ条件でのNANA生産を試みたが、BnanAの酵素活性が強アルカリ耐性を示さないことが原因となりNANA生産に至らなかった。そこで本研究ではより強いアルカリ条件下でも働く新規アルドラーゼを探索し、強アルカリ条件下での効率的なNANA生産反応系の確立を目指した。
【方法と結果】
NANAを単一炭素源とするアルカリ性の培地に生育した土壌微生物を対象としたスクリーニングの結果、pH 11においてNAMとピルビン酸からNANAを合成できる微生物として*Oceanobacillus* sp. K55を取得した。この微生物の保持する新規強アルカリ耐性アルドラーゼ(KnanA)を同定し、KnanA高発現大腸菌株を作製した。このKnanA高発現大腸菌株の無細胞抽出液を、NAGおよびピルビン酸を基質に用いたNANA生産反応に供した。pH 10での反応においてはBnanAを用いた場合と同等のNANAを生産することが可能であった。さらにBnanAを用いた場合ではNANAの生成が見られないpH 10より強いアルカリ条件下においても、KnanAを用いる事でNANAを生産することが可能であることが分かった。現在強アルカリ条件下におけるKnanAを用いたNANA生産反応系の反応条件の最適化を実施している。

N-acetylneuraminic acid, alkaline-tolerant aldolase, epimerization

講演番号：2C23p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ C校舎23会場

好塩細菌*Halomonas* sp. H11株より単離したα-グルコシダーゼの配糖化能評価

Evaluation of transglucosylation ability of alpha-glucosidase isolated from *Halomonas* sp. H11

○小島　晃代、相沢　健太、山本　健（日本食品化工）
○Teruyo Ojima, Kenta Aizawa, Takeshi Yamamoto (Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.)

【目的および方法】α-グルコシダーゼ（EC.3.2.1.20）はα-グルカンの非還元末端α-グルコシド結合に作用しグルコースを遊離させる。一般的に、糖転移活性を有することから、分岐糖や配糖体の製造において有用である。最近、我々は中度好塩細菌*Halomonas* sp. H11株から、糖転移活性の高いα-グルコシダーゼ（HaG）を見出した。そこで、大腸菌による組換えHaGを用いて、各種アルコール類、およびその他様々な物質への糖転移能を評価した。また、配糖化物の高純度化を試みた。
【結果】本α-グルコシダーゼはエタノール、グリセロール、プロピレングリコール、プロパノール等のアルコール類に対する糖転移活性を示した。また、メントール、ハイドロキノンおよびジンゲロールなどの物質をグルコシル化することが可能であった。本発表においては、グリセロール配糖体の高純度化法およびジンゲロール配糖体を中心に紹介する予定である。

alpha-glucosidase, *Halomonas* sp., transglucosylation

講演番号：2C23p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ C校舎23会場

ヒト由来硫酸基転移酵素発現出芽酵母を用いた抱合体産生

Production of sulfate using human SULT isoforms in budding yeast.

○生城　真一、布目　基倫、西川　美宇、榊　利之 (富山県大・工・生物工学)
○Shinichi Ikushiro, Motomichi Nunome, Miyu Nishikawa, and Toshiyuki Sakaki (Dep. of Biotech., Fac. of Engineer, Toyama Pref. Univ.)

【目的】生体内における硫酸抱合は、UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)によるグルクロン酸抱合と同じく異物代謝過程の第二相反応である。硫酸基転移酵素(SULT)は、PAPS(活性硫酸)を硫酸基供与体として硫酸抱合を行い、生体外異物や薬物の解毒代謝機構として知られている。硫酸抱合体は多くの異物代謝で確認されており、特に食品中機能性成分であるポリフェノール化合物は血中にグルクロン酸抱合体とともに硫酸抱合体として検出されている。機能性成分の体内動態を調べる上で重要な代謝物であるが、有機合成では調製困難な場合が多い。そこで本研究ではヒト SULT 分子種を発現させた出芽酵母菌体を用いて容易に硫酸抱合体を調製する技術を開発した。

【方法】ヒトにおいて主要な分子種であるSULT遺伝子(1A1、1A3、2A1、1B1、1E1)を酵母自律複製型ベクターであるpGYRに導入し(pGYR/SULT)、酢酸リチウム法を用いて出芽酵母AH22株に形質転換することにより5種類の酵母SULT発現系を構築した。各酵素の発現は特異抗体を用いたウェスタンブロット法にて確認した。静止菌体を用いた硫酸抱合活性測定は、1mM 抱合化基質、1% 硫酸アンモニウム、8% グルコース、0.1M KPi(pH7.4)の反応系で30℃、６時間で反応させた後、遠心分離にて培地を回収し逆相カラムを用いたHPLC分析を行った。

【結果】出芽酵母菌体における SULT 分子の発現量をウェスタンブロット法により推定したところ、２～５x 10^5 （分子/細胞）であった。静止菌体を用いてモデル基質として７位水酸化クマリン(7HC)の変換反応を解析したところ、菌体反応の培地成分において 7 位硫酸抱合体の生成が確認された。SULT1A1 発現菌体を用いて反応時間、硫酸アンモニウム及びグルコース濃度、基質濃度など最適条件下において、1mM7HC を用いた反応系でほぼ 100%に近い変換効率で硫酸抱合体を得ることができた。また、ケルセチンやレスベラトロールなどのポリフェノール化合物を基質にした場合においても、高変換率で硫酸抱合体を得ることができた。とくにヒト SULT 分子種を選択することにより複数の水酸基を有する化合物の位置特異的な硫酸抱合体の調製が可能となった。

以上のように、ヒトSULT発現出芽酵母を用いることにより容易に異物代謝物としての硫酸抱合体を調製することが可能となり、ポリフェノールなど食品中機能性成分代謝物の体内動態研究に有用であると考えている。

Sulfate, Sulfotransferase, Budding yeast

講演番号：2C23p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎23会場

哺乳動物由来UDP-グルクロン酸転移酵素発現出芽酵母を用いた抱合体産生

Production of glucuronide using mammalian UGT isoforms in budding yeast.

○長谷川　嵩、西川　美宇、生城　真一、榊　利之 (富山県大・工・生物工学)
○Takashi Hasegawa, Miyu Nishikawa, Shinichi Ikushiro, and Toshiyuki Sakaki (Dep. of Biotech., Fac. of Engineer., Toyama Pref. Univ.)

【目的】異物代謝過程における抱合反応は、脂溶性化合物に水溶性原子団を付加することにより体外への排泄を促進する。近年、医薬品の一部の抱合体が反応性代謝物となり副作用を引き起こすことや、食品機能性成分であるフラボノイドの抱合代謝物が生理機能の発揮に重要である可能性が示されており、生体に対する抱合代謝物の影響を調べることは極めて重要である。しかし、抱合代謝物の化学合成は困難である場合が多く、代謝物の影響を正確に評価できていないのが現状である。我々はグルクロン酸抱合体を簡便に調製することを目的として、出芽酵母発現系を用いてUDP-グルコース脱水素酵素（UGDH）及びUDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）分子種を同時に発現させることで、酵母菌体に添加した基質の抱合体への効率的な変換に成功している。UGTは遺伝子ファミリーを形成しており、複数の分子種が存在し、さらに動物種によっても基質特異性を異にする分子種をもつことでさまざま抱合化を可能にしている。本発表ではヒトを含めた複数の哺乳動物由来UGT分子種によるさまざまな抱合体調製の検討について報告する。

【方法】出芽酵母菌体を用いたグルクロン酸抱合体産生のためにシロイヌナズナまたはラット由来UGDHを有する染色体組み込み型ベクターpAUR-UGDHに、種々の哺乳動物由来UGT分子種（ヒト：13種、ラット：10種、マウス：6種、ブタ：1種）を挿入することで形質転換体を得た。酵母におけるUGDHおよびUGT発現は特異抗体によるウェスタンブロット法によって解析した。また、静止菌体を用いて、基質および8% グルコースを含む0.1M KPi (pH7.4)の反応系で30℃、24時間で反応させた後、抱合体をHPLCで定量し、各UGT発現株の性能を評価した。

【結果】フェノール性水酸基を有する７位水酸化クマリンに対する抱合能はほぼすべてのUGT分子種でみられた。ビスフェノールAや１位水酸化ピレンなどの化合物に対してはラットUGT2B1が顕著な抱合能を示した。カルボキシル基を有する非ステロイド性抗炎症剤（ジクロフェナックやメフェナム酸）などのアシル抱合体の生成にはヒトUGT1A8、ラットUGT2B1などが高い抱合能を示した。また、ケルセチンやレスベラトロールなどの複数の水酸基を有するポリフェノールなどの機能性食品成分に対しては、UGT分子種を選択することにより部位特異的な抱合体を調製することができた。

以上の結果より、種々の哺乳動物由来UGT分子種を適切に選択することにより、目的のグルクロン酸抱合体を特異的かつ高効率で得ることが可能になった。

Glucuronide,UDP-glucose dehydrogenase, Budding yeast

講演番号：2C23p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎23会場

薬物代謝酵素発現酵母株を用いた医薬品代謝物調製技術の開発

Whole cell dependent-production of drug metabolites using genetically engineered yeast cells expressing CYP and UGT isoforms.

○西川　美宇、増山　優香、長谷川　嵩、鎌倉　昌樹、榊　利之、生城　真一
(富山県大・工・生物工学)
○Miyu Nishikawa, Yuuka Masuyama, Takashi Hasegawa, Masaki Kamakura, Toshiyuki Sakaki, and Shinichi Ikushiro (Dep. of Biotech., Fac. of Engineer., Toyama Pref. Univ.)

【背景・目的】医薬品などの生体外異物は、主に肝臓においてシトクロム P450(CYP)により水酸化され、UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)によりグルクロン酸抱合体となり、水溶性を増すことで体外へ排泄される。これを異物代謝といい、通常異物代謝は解毒排泄作用として働くが、近年では、医薬品の一部の抱合体が反応性代謝物となり副作用を惹起することや、食品の機能性成分であるフラボノイドの抱合代謝物が生理機能発揮に重要である可能性が示されている。したがって新規医薬品や機能性食品開発の際には親化合物だけでなく、代謝物の安全性・機能性評価が極めて重要である。しかしながら概して代謝物の化学合成は困難であり、安価で安定した代謝物の供給が望まれている。そこで我々は代謝物を簡便かつ大量に調製することを目的として、出芽酵母発現系を用いて CYP および UGT 分子種の同時発現株を構築し、その性能を評価した。

【方法】酵母発現ベクターを用いてヒト由来 CYP および UGT 分子種を出芽酵母 AH22 株に導入し、ヒト CYP・UGT 同時発現酵母株を構築した。モデル基質として 7 エトキシクマリン(7EC) を酵母菌体液に添加し、30℃で 24 時間インキュベートした後、水酸化体およびグルクロン酸抱合体を HPLC で定量し、各同時発現株の性能を評価した。また、各株における CYP および UGT タンパク質の発現をウェスタンブロットで解析した。

【結果・考察】様々な CYP および UGT 分子種を酵母菌体に導入し、35 種類の CYP・UGT 同時発現株の構築に成功した。7EC 対する代謝活性を測定した結果、CYP による 3 位水酸化反応あるいは O-脱エチル化反応とそれに続く UGT によるグルクロン酸抱合反応が観察されたが、分子種により代謝の主経路が異なった。また、これら同時発現株を用いて種々の医薬品の代謝を調べたところ、適切な同時発現株を選択することにより、目的とする代謝物を効率良く取得できることがわかった。

【結論】本研究では、ヒト肝臓における CYP および UGT による連続した代謝反応を酵母内で再現することに成功した。多様な CYP・UGT 分子種発現株をもつ本システムは、複数の代謝経路を持つ基質からの特異的な代謝物の取得に有用であると考えられる。また、代謝経路が未知の基質における代謝酵素分子種の同定や代謝様式解明にも寄与すると考えられる。

Drug metabolites, budding yeast, whole cell dependent production

講演番号：2C23p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎23会場

合成代謝工学的手法によるキメラ型解糖系の構築

Construction of a chimeric glycolytic pathway for stoichiometrical production of lactic acid using thermophilic enzymes

○叶　暁亭[1]，酒井　隆彬[1]，岡野　憲司[1]，廣田　隆一[2]，黒田　彰夫[2]，本田　孝祐[13]，大竹　久夫[1]

○ Xiaoting YE[1], Takaaki SAKAI[1], Kenji OKANO[1], Ryuichi HIROTA[2], Akio KURODA[2], Kohsuke HONDA[13], Hisao OHTAKE[1]

[1]阪大院・工・生命先端，[2]広大院・工・生命機能，[3]科学技術振興機構 さきがけ

[1]Department of Biotechnology, Osaka University, [2]Department of Molecular Biotechnology, Hiroshima University [3]PRESTO, Japan science and Technology Agency (JST)

【Introduction】Use of recombinant mesophiles producing thermostable enzymes at high temperature results in the denaturation of indigenous enzymes and elimination of undesired side reactions. Combination of multiple thermostable enzymes could allow us to construct artificial bio-synthetic pathways to obtain value-added chemicals. In the present work, we aimed to construct a chimeric glycolytic pathway for stoichiometrical production of lactic acid from glucose by using recombinant *Escherichia coli* cells expressing glucose kinase, phosphoglucose isomerase, phosphofructokinase, fructose 1,6-bisphosphate aldolase, triose phosphate isomerase, non-phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPN), cofactor-independent phosphoglycerate mutase, enolase, pyruvate kinase and malate/lactate dehydrogenase (MLDH). The GAPN of *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 was employed to provide shortcut from glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) to 3-phosphoglycerate (3PG) and achieve the balance of ATP/ADP in the reaction pathway. The NAD^+ consumed by GAPN can be re-oxidized by MLDH. Consequently, the cofactor required for the reaction can be continuously regenerated.

【Results】The genes encoding the glycolytic enzymes were functionally produced in *E.coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS, respectively. To prevent the ATP depletion at the first step of GK-catalyzed phosphorylation of glucose, glucose was added in fed-batch mode. Consequently, 6 mM glucose was stoichiometrically converted to 4.7 mM lactate (a molar yield = 40 %) in 10 h. The ATP turnover number was estimated to be 24.

【Keywords】Chimeric glycolytic pathway, thermophilic enzyme, synthetic metabolic engineering

講演番号：2C23p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ C校舎23会場

合成代謝工学によるバイオアルコール生産

Bioalcohol production by synthetic metabolic engineering

○本田孝祐[1,2]、Borimas KRUTSAKORN[1]、岡野憲司[1]、大竹久夫[1]　([1]阪大院・工・生命先端、[2]科学技術振興機構　さきがけ)

○Kohsuke HONDA[1,2], Borimas KRUTSAKORN[1], Kenji OKANO[1], Hisao OHTAKE[1] ([1] Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2] JST, PRESTO)

【目的】

演者らのグループでは、モジュール化した耐熱性酵素を任意に組み合わせることで、化学品生産に特化した代謝経路を自由自在にデザインする「合成代謝工学」の確立を目指している。現在、その具体的応用例として、グルコースを出発基質としたブタノール生産のための合成代謝経路の構築に取り組んでいる。今回の発表では、現在までに得られた成果の一端として、本合成代謝経路の後半部分にあたる酢酸からのブテノール生産について報告する。

【方法と結果】

構築した合成代謝経路は、好熱性細菌ならびに超好熱性アーキア由来の 6 種類の酵素、acetyl-CoA synthetase (ACS)、acetoacetyl-CoA synthetase (AACS)、hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HCDH)、enoyl-CoA hydratase (ECD)、acyl-CoA dehydrogenase (ACDH)、ならびに alcohol dehydrogenase (AdDH) から構成される。一般的なブタノール生産経路に見られる酵素群のうち、crotonyl-CoA の二重結合飽和化による butanoyl-CoA へ変換を触媒する butyryl-CoA dehydrogenase は、レドックスパートナータンパク質を要し、高い酸素感受性を示すことから *in vitro* での利用は難しいと予想された。一方、その下流に位置する ACDH が butanoyl-CoA だけでなく crotonyl-CoA に対する還元的脱アセチル化を触媒可能であったことから、その反応産物を還元して得られるブテノールを目的産物として設定した。各酵素反応の最適温度、pH から決定した反応条件下で一連の反応を実施した結果、10 mM の酢酸から 1.1 mM のブテノールが生産された（モル収率 22%）。現在、経路を構築する各酵素の量比を最適化することにより、さらなる収率の向上を目指した検討を進めている。

【Keyword】synthetic metabolic engineering, thermophilic enzyme, butenol

講演番号：2C23p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎23会場

炭素間二重結合を還元する耐熱性酵素の探索

Screening for thermostable enzyme with C=C double bond reducing activity

○辻 直人[1]、本田 孝祐[1,2]、岡野 憲司[1]、大竹 久夫[1]（[1]阪大院・工・生命先端、[2]科学技術振興機構 さきがけ）

○Naoto TSUJI[1], Kohsuke HONDA[1,2], Kenji OKANO[1], Hisao OHTAKE[1]（[1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]JST, PRESTO）

【目的】

耐熱性酵素を大腸菌などの中温菌宿主で発現させた後、得られた組換え菌体を熱処理に供することによって、宿主由来の酵素を失活させた極めて選択性の高い生体触媒を簡便に調製することが可能となる。我々は本法により作成した生体触媒モジュールを任意に組み合わせることによって、化学品生産のための人工的な代謝経路を*in vitro*で構築することに取り組んでいる。今回、第3世代バイオ燃料として注目が集まるブタノールの生産を最終目標とし、グルコースからのブタノール生産経路構築に利用可能な炭素間二重結合還元活性を有した耐熱性酵素の取得を試みたので報告する。

【方法と結果】

大阪大学構内から採取した土壌サンプルの懸濁液をジェランガムにて固化させた栄養培地上に塗布し、70℃で1～2日間の静置培養後、生育したコロニーを単離した。分離された約70株の湿菌体を目的反応の基質であるクロトンアルデヒドを含む反応液に懸濁し、70℃で一晩インキュベートしたのち、残存基質と目的反応産物であるブタナールをガスクロマトグラフィーにて定量することで酵素活性を評価した。なお、反応液には補酵素としてNADHおよびNADPHとこれらの再生反応を触媒する耐熱性グルコースデヒドロゲナーゼならびにグルコースを添加した。次に湿菌体反応にて選抜された菌株の無細胞抽出液を同様の反応系に供することにより、2次スクリーニングを実施した。この際、NADH、NADPHのいずれか一方のみを含む反応液中にて活性測定を実施し、各酵素の補酵素要求性を検証した。この結果、比較的高い比活性を示す候補株11株が選抜され、その多くはNADPH要求性を示すものであった。現在、選抜された各菌株について、16r DNA配列に基づく同定を進めている。

【Keyword】thermophilic enzyme, butanol, synthetic metabolic engineering

講演番号：2C23p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ C校舎23会場

Thermobifida alba AHK119由来の組換えポリエステラーゼの遺伝子改変と構造解析

Biochemical and genetic analysis of a cutinase-type polyesterase from *Thermobifida alba* AHK119

○タマラート　アチャラ、川端猛[1]、鈴木秀之、河合富佐子[2]（京都工繊大院・応生、[1]阪大・蛋白研、[2]京都工繊大・ナノ材料セ）

○Uschara Thumarat, Takeshi Kawabata[1], Hideyuki Suzuki, Fusako Kawai[2] (Div Appl Biol, Graduate School of KIT, [1]Inst Protein Res, Osaka Univ, [2]Center Nanomater & Dev, KIT)

【目的】堆肥由来の耐熱性*Thermobifida alba* AHK119(Ref1)よりえたポリエステル分解遺伝子(*est119*)をpQE80Lに挿入し、*E. coli* Rosetta-gami B(DE3)で可溶性活性タンパクとして発現させた(Ref.2)。本研究では組換え酵素の遺伝子改変により強力な分解酵素の作成を目指す。

【方法】*E. coli* Rosetta-gami B(DE3)-pQE80L-*est119*を常法どおりIPTGで誘導的に酵素を発現させ、cell-free extractからNi-NTA columnで酵素を精製した。必要な場合はさらにMonoQ anion exchange columnにて精製した。活性は*p*-nitrophenyl butyrate(pNPB)及びpoly(butylene succinate-*co*-adipate)(PBSA)の分解で判定した。変異酵素のスクリーニングはIPTG含有Rodamin-tributylin寒天培地で行った。

【結果】精製Est119はpNPBを最適基質とする典型的なクチナーゼタイプのポリエステラーゼであった。3Dモデリングの結果、9本のβ-シート(E1-E9)をコア構造とし、両側を８本のα-ヘリックスが挟む典型的なα/β-hydrolase構造が予測された。クチナーゼはリパーゼファミリーに属するが、本酵素はtrue lipaseの保有するlidを有せず、活性Serは溶媒に常に曝されている。これもクチナーゼ構造の典型的な特徴である。活性中心は芳香族ポリエステルのpolyethylene terephthalateなどを収納する十分なスペースがある。Est119は2価金属イオン（Ca, Mg, Mn）で活性化され、特にCa濃度の増加とともに活性と耐熱性の増加が認められた。本酵素は脂肪族及び脂肪族-芳香族ポリエステルに広い活性を有し，ポリ乳酸にも高い活性を示すが、PHBは基質としなかった。Niuらの方法に従ってMn存在下のerror-prone PCRによるrandom mutagenesisにより、約9,000のclonesをえて、活性と耐熱性の増加を調べた。その結果、E1上のアミノ酸変異が活性の増加に関連していることが判明した。また、S219Pが耐熱性に関連していたので、A68V/S219Pを作成した。他方、いくつかの*Thermobifida*株にはEst119と相同性の高い酵素遺伝子がtandemに存在することが知られている。そこで、*est*119の上流に同様な遺伝子(H1)が存在することを確認し、Est119と同じvector, hostで発現させた。２つの酵素の比較を進めて、より強力な分解能を有する遺伝子の作成を目指す。

References:

1. Hu X et al. J. Polym. Environ. 16: 103-108 (2008)
2. Hu X, Thumarat U et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87: 771-779 (2010)
3. Thumarat U et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. in press.

Thermobifida alba AHK119, polyesterases, tandem genes

講演番号：2C23p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎23会場

酵素的非対称化を利用した光学活性α,α-2置換α-アミノ酸の合成法の開発（１）

Application of enzymatic desymmetrization to the synthesis of chiral α,α-disubstituted α-amino acids (1)

○川端　潤[1,2]、三宅良磨[1,2]、阿須間夕紀[1,2]、鈴木竜哉[1]、出来島康方[1]、竹原　潤[1,2]、上田　誠[1,2]
([1]三菱化学科学技術研究センター、[2]エーピーアイコーポレーション)

○Hiroshi Kawabata[1,2], Ryoma Miyake[1,2], Yuuki Asuma[1,2], Tatsuya Suzuki[1], Yasumasa Dekishima[1], Jun Takehara[1,2], Makoto Ueda[1,2] ([1]Mitsubishi Chemical Group Science and Technology Research Center, [2]API Corporation)

【目的】

光学活性α,α-2置換α-アミノ酸は医薬品の重要中間体として広く利用されており、効率的な合成法の確立が求められている。酵素を用いたアミノ酸の合成法は選択性や触媒コストの面で有利であり、本研究では(1*R*,2*S*)-ethyl 1-amino-2-vinylcyclopropanecarboxylate (VCPA)をターゲットとして、酵素反応による光学活性の導入を経たα,α-2置換α-アミノ酸合成法の確立を目的とする。

【方法・結果】

VCPAの合成法として種々の合成ルートを検討したところ、光学活性なモノエステル(1*S*,2*S*)-1-(ethoxycarbonyl)-2-vinylcyclopropanecarboxylic acid (VCPME)を合成した後に、Crutius転位によりVCPAに誘導する合成ルートが既存法等と比較して効率的であることを見出した。(1*S*,2*S*)-VCPMEの合成法として、diethyl 2-vinylcyclopropane-1,1-dicarboxylate (VCPDE)を原料として、酵素的光学分割を経るルートを3パターン検討した結果、VCPDEのジエステルの一方のエステルのみを加水分解し、光学活性モノエステルを得る酵素的非対称化ルートにおいて、酵素スクリーニングによって*Bacillus subtilis*等が高い選択性を発揮することを見出した。

unnatural amino acids, desymmetrization, enzymatic hydrolysis

講演番号:2C23p15
講演日時、会場:3月23日16:43～ C校舎23会場

酵素的非対称化を利用した光学活性α,α-2置換α-アミノ酸の合成法の開発（２）

Application of enzymatic desymmetrization to the synthesis of chiral α,α-disubstituted α-amino acids (2)

○三宅良磨[1,2]、川端　潤[1,2]、加藤良平[1]、阿須間夕紀[1,2]、鈴木竜哉[1]、出来島康方[1]、竹原　潤[1,2]、上田　誠[1,2]（[1]三菱化学科学技術研究センター、[2]エーピーアイコーポレーション）

○Ryoma Miyake[1,2], Hiroshi Kawabata[1,2], Ryouhei Kato[1], Yuuki Asuma[1,2], Tatsuya Suzuki[1], Yasumasa Dekishima[1], Jun Takehara[1,2], Makoto Ueda[1,2] ([1]Mitsubishi Chemical Group Science and Technology Research Center, [2]API Corporation)

【目的】

光学活性α,α-2置換α-アミノ酸は医薬品の重要中間体として広く利用されており、効率的な合成法の確立が求められている。酵素を用いたアミノ酸の合成法は選択性や触媒コストの面で有利であり、本研究では(1*R*,2*S*)-ethyl 1-amino-2-vinylcyclopropanecarboxylate (VCPA)をターゲットとして、酵素反応による光学活性の導入を経たα,α-2置換α-アミノ酸合成法の確立を目的とする。

【方法・結果】

VCPAの合成法として種々の合成ルートを検討したところ、ジエステルdiethyl 2-vinylcyclopropane-1,1-dicarboxylate (VCPDE)の酵素的非対称化を経て光学活性なモノエステル (1*S*,2*S*)-1-(ethoxycarbonyl)-2-vinylcyclopropanecarboxylic acid (VCPME)を合成した後に、Crutius転位によりVCPAに誘導する合成ルートが既存法等と比較して効率的であることを見出した。酵素的非対称化において、*Bacillus subtilis*等が高い選択性を発揮することを見出したため、本反応に関与する酵素の特定を試みた結果、*p*-nitrobenzyl esterase (PNBE)が本反応を触媒していることを見出した。また、反応の選択性向上のため、本酵素ホモログのスクリーニングと基質結合部位近辺のアミノ酸残基の改変を行い、工業的なプロセスにも適用可能な選択性を有したPNBE変異体を取得することに成功した。

unnatural amino acids, desymmetrization, directed evolution

講演番号：2C23p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ C校舎23会場

Rhodococcus erythropolis JCM3132 株の酸化的ピリミジン代謝における新規アミダーゼの同定ならびに代謝遺伝子クラスターの解明

○堀之内伸行、宋　子良、清水　昌、小川　順（京大院農・応用生命）

【目的】我々は、酵素的塩基交換反応によるヌクレオシド生産の反応平衡制御に有用な *Rhodococcus erythropolis* JCM 3132株のピリミジン分解系が酸化的分解経路であることを見いだしている。これまでに酸化的ピリミジン代謝系関しては、ウラシル/チミンデヒドロゲナーゼ（UTDH）、バルビチュラーゼ（BAR）の作用によりウラシルがマロン酸とウレアに分解されることが報告されていた。しかし、BARの精製を行なった際、BAR反応生成物がウレイドマロン酸であることを見いだし、さらなる分解には別の酵素が関与することを示唆できた（ウレイドマロナーゼ；UMaseと命名）。そこで、このUMaseの酵素・遺伝子レベルでの同定ならびに代謝遺伝子クラスターの解明を試みた。
【方法】*Rhodococcus erythropolis* JCM 3132株をウラシル単一炭素源培地で培養し、代謝系酵素の発現誘導を行った。３日間培養した菌体の無細胞抽出液からUMaseの精製（硫安分画→DEAEカラム→MonoQカラム→分子篩カラム→MonoQカラム→MonoQカラム）を行った。
また部分ペプチド配列情報からUMase遺伝子の同定を行った。
【結果】酵素精製の結果、ウレイドマロナーゼを単一バンドとして分離でき、そのサブユニット分子量は53kDaであった。部分ペプチド配列情報をBLAST検索した結果、*Rhodococcus erythropolis* PR4株のputative amidaseと相同性を示した。そこで、PR4株のputative amidaseの遺伝子情報からJCM3132のウレイドマロナーゼ遺伝子の取得を試みた。得られた遺伝子断片を解析し、上述の部分ペプチドの存在を確認できたので、本遺伝子を*E. coli*にクローニングした。その結果、20℃で培養した形質転換体にウレイドマロナーゼ活性を確認した。また、全アミノ酸配列の解析結果から、本酵素がgamma-glutamyltransferaseファミリーに属し、*R. erythropolis* PR4、*Pseudomonas aeruginosa*、*Burlholderia ambifaria*のputative amidaseと高い相同性を有すことが示された。さらにJCM3132株の酸化的ピリミジン系代謝遺伝子クラスターを解析し、これらの酵素群はピリミジン塩基による誘導により発現・機能することを酵素活性レベルで明らかにした。

Rhodococcus erythropolis, pyrimidine, amidase

講演番号：2C23p17
講演日時、会場：3月23日17:15～ C校舎23会場

アメーバ由来新規ピロリン酸依存酢酸キナーゼ：アセチルリン酸の生産と ATP 再生系構築への展望

The novel pyrophosphate-dependent acetate kinase from *Entamoeba histolytica*：Production of acetyl phosphate and the prospect for construction of ATP-regeneration system

○吉岡　彩、河井重幸、村田幸作（京大院農・食品生物）
○Aya Yoshioka, Shigeyuki Kawai, Kousaku Murata (Grad. School of Agric., Kyoto Univ.)

【背景】現在、産業に利用されている酵素は、反応にエネルギー（ATP）を要しない加水分解酵素、転移酵素、異性化酵素などに限定されている。これは、ATP が高価であり、その大量使用が不可能なことに起因する。高価な ATP の代わりに、安価なポリリン酸やピロリン酸（ともに無機リン酸の重合体）をエネルギー担体とした生産プロセスの構築が望まれる。本プロセスの構築は、(i)ポリリン酸やピロリン酸を直接利用できる酵素（ポリリン酸依存キナーゼ）の利用、もしくは (ii) ポリリン酸やピロリン酸をエネルギー担体とする ATP 再生系の構築により達成可能である。しかし、ポリリン酸依存キナーゼの種類が限られているため、ポリリン酸依存 NAD キナーゼとポリリン酸からの $NADP^+$ の合成例など数例の成功例はあるものの、ポリリン酸依存キナーゼの利用による達成は現在困難とみなされている。一方、ピロリン酸依存酢酸キナーゼは、ATP 再生系における優良なエネルギー担体アセチルリン酸をピロリン酸と酢酸から合成するため、ピロリン酸をエネルギー担体とする ATP 再生系の構築実現の鍵となると期待される。しかし、本キナーゼは病原性赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* にその活性が検出されることが報告されているのみで、それ以上の知見は皆無であった。

【方法・結果】*E. histolytica* のゲノム上に、大腸菌の酢酸キナーゼと相同性を示す遺伝子 (ehi_AK 遺伝子) が一つ見出された。本遺伝子を人工合成し、大腸菌を宿主とした発現系を構築した。ehi_AK 遺伝子を発現させた大腸菌抽出物には、対照（空ベクターのみを保有）の抽出物には検出されない、ピロリン酸に依存した酢酸キナーゼ（アセチルリン酸合成）活性がヒドロキシルアミン法により検出された。なお、pET システムでは良好な発現が得られなかったが、pQE-80L の使用により発現が観察された。宿主や発現条件を至適化し、同抽出物から TALON アフィニティーカラムにより 43kDa のタンパク質を精製した。本精製タンパク質も同活性を示した。通常の酢酸キナーゼは ATP を利用するが、本精製タンパク質は ATP を利用せず、ピロリン酸をリン酸供与体として利用した。以上の結果から、ehi_AK 遺伝子産物がピロリン酸依存の酢酸キナーゼであることが分かった。これは、ピロリン酸依存酢酸キナーゼのはじめての同定であった。ehi_AK の一次構造を既知の ATP 依存酢酸キナーゼの一次構造と比較したところ、触媒に関わる重要な残基は保存されていたが、リン酸供与体認識に関わると予想される残基に違いが見られた。この違いが、ehi_AK が ATP ではなくピロリン酸を利用する構造要因の一つと推察された。本キナーゼを用いた、ピロリン酸をエネルギー担体とした ATP 再生系の構築ならびにその工業レベルでの実用化が期待される。

pyrophosphate, acetate kinase, *Entamoeba histolytica*

講演番号：2C23p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ C校舎23会場

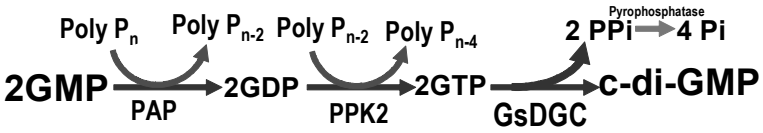
Cyclic di-GMP量産化技術の確立

Practical enzymatic production of cyclic di-GMP

○田辺 香緒里、石毛 和也（ヤマサ醤油・医薬化成品）
○Kaori Tanabe, Kazuya Ishige (Biochemicals Division, Yamasa Corporation)

【目的】Cyclic di-GMP（以下cdGMP）は微生物界で広く用いられる重要なシグナル伝達分子である。微生物のバイオフィルム形成や接着、運動性、病原性の発現などに深く関与し、コレラ菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌などの病原菌のバイオフィルム形成を調節することで、薬剤耐性化／感染能力の低下をもたらす生理活性物質として期待されている。また、最近、哺乳動物に対する自然免疫活性化作用が明らかとなり、ウイルス性疾患の予防・治療薬、抗がん剤としての開発可能性が期待されている。一方で、その実用的な酵素合成法は確立されておらず、本研究において、cdGMPの量産化に向けた酵素合成技術の構築を試みた。

【方法及び結果】cdGMPは、diguanylate cyclase（以下DGC）の触媒作用により、2分子のGTPより2段階の酵素反応により酵素合成され、当該酵素のホモログは様々な細菌ゲノム中に多数保存されている。報告者らは、大腸菌や枯草菌、中等度好熱菌*Geobacillus stearothermophilus*由来の複数の当該酵素ホモログの中から、最もcdGMP合成特性に優れたDGCを選出した（GsDGC）。また、*Acinetobacter johnsonii*由来ポリリン酸：AMPホスホトランスフェラーゼ（PAP）と緑膿菌由来ポリリン酸依存的ヌクレオシド二リン酸キナーゼ（PPK2）を組み合わせることにより、ポリリン酸をドナーとしたGMPからの実用的なGTP供給系を構築した。これをGsDGCと共役させることで、安価なGMPからの高効率なcdGMP酵素合成系を構築した（下図）。このcdGMP酵素合成系により、高濃度での効率的なcdGMP酵素合成を実現した。しかしながら、GsDGCの酵素生産性は低く、これがcdGMPの量産化に大きな障壁となった。



DGCはその酵素活性が様々なメカニズムで制御されることが知られており、GsDGCも例外でなく、その酵素活性を効率的に引き出してやることがcdGMP量産化技術確立に向けた鍵となる。一般的に、DGCはC末端側に触媒ドメインを有し、N末端側には活性制御ドメインを有する。この活性制御ドメインの外部シグナルに応じた二量体化がDGC活性発現に必須である。そこで、GsDGC触媒ドメインを様々な二量体化能を有するタンパク質／ドメインと融合化することで、その強制的な二量体化を図った。その結果、パン酵母由来無機ピロフォスファターゼとの融合化により、活性発現を飛躍的に効率化することに成功した。さらに、単アミノ酸変異導入により比活性向上にも成功し、当該人工機能改変DGCを上記のポリリン酸をドナーとしたGTP供給系と共役させることで、cdGMPの量産化が可能となった。

cyclic di-GMP, diguanylate cyclase, polyphosphate

講演番号：2C23p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ C校舎23会場

窒素化合物を貯留する微生物の研究：蓄積した窒素化合物の解析

Study on Bacteria that Accumulate Nitrogen Compounds: Analysis of Accumulated Nitrogen Compounds

○太田 光昭、登尾 浩助[1]、村上周一郎[2]（明治大院農・農化、[1]明治大・農、[2]明治大・農化）

○Mitsuaki Ohta, Kosuke Noborio[1], Shuichiro Murakami[2]（Dep. Agric. Chem., Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., [1]Dep. Agric., Fac. Agric., Meiji Univ., [2]Dep. Agric. Chem., Fac. Agric., Meiji Univ.）

【目的】これまでに好気条件下で脱窒する微生物を分離する目的で、0.1％硝酸アンモニウム（NH_4NO_3）を含む液体培地でスクリーニングを行ったところ、好気条件下で良好に NO_3^-を除去する 4 菌株を分離し、*Enterobacter cloacae* と同定した [1)]。これらの分離菌株の培養時における窒素化合物の消長を調べたところ、これらの菌株は添加した NH_4NO_3 を脱窒しておらず、培養上清中に他の窒素化合物として蓄積していることを見出した。本報告ではこの窒素化合物について検討した結果を報告する。

【方法】本研究では 4 菌株の中で好気的に最も良好に NO_3^-を除去した Kb21-2 株を用いた。通気条件の異なる培養機を用いて培養し、Kb21-2 株の増殖や NO_3^-除去に与える通気の影響を調べた。培地中に蓄積する物質については逆相 HPLC を用いて分析し、主なピークを分取した。分取により得られた物質を種々の機器分析に供し、その構造を解析した。

【結果】Kb21-2株は好気条件下で培養した場合、培地に添加したNH_4^+およびNO_3^-を共に良好に除去したが、通気を制限した場合では、62%のNO_3^-が培地中に残存した。この結果は、Kb21-2株はNO_3^-を除去するためには一定以上の通気条件が必要であることを示している。また経時的にサンプリングした培養上清を逆相HPLCで分析した結果、好気的に培養した培養上清には通気を制限した場合では見られなかった2つのピークが観察された。これらのピークは、NH_4^+が培地中にほとんど残存せず、残存するNO_3^-が除去されている時に出現したことから、NO_3^-由来の窒素を含む物質である可能性が示唆された。このクロマトグラムにおいて二番目のピークを分取し、酸加水分解処理した後、アミノ酸組成分析を行なったところ、この物質にはセリンが含まれていることが明らかになった。現在この物質の構造解析を進めているところである。

1）太田ら、農芸化学会2011年度講演要旨集P. 6

nitrate, nitrogen compounds, analysis

講演番号：2C24a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ C校舎24会場

大腸菌のバイオフィルム形成に及ぼすL-TryptophanとL-Cysteineの影響

Effects of L-Tryptophan and L-Cysteine on biofilm formation by *Escherichia coli.*

○島崎 純次，古川 壮一，荻原 博和，森永 康（日大院・生資科）
○Junji Shimazaki, Soichi Furukawa, Hirokazu Ogihara, Yasushi Morinaga (Coll. Bioresource Sci., Nihon Univ.)

【 背景・目的 】

微生物は液体培地中では浮遊状態で生育し、固体培地上ではコロニーを形成して生育する。また、固液界面ではバイオフィルム（BF）を形成して生育する場合が多い。このように微生物は環境によって生育形態を変化させるが、その制御機構には不明な点が多い。これまでに、当研究室では *Escherichia coli* K-12 のアミノ酸生合成系遺伝子欠損が BF に及ぼす影響を検討した結果、L-Tryptophan (L-Trp) やアスパラギン酸系アミノ酸 (L-Threonine、L-Methionine、L-Isoleucine) の合成関連遺伝子が欠損すると BF 形成が顕著に増加することを見出し、これらのアミノ酸の欠乏が BF 形成の trigger となる可能性を示唆する結果を得てきた（2011 年 第 84 回日本生化学会大会)。本研究では、特に L-Trp 関連遺伝子の欠損株を対象として検討を行い、L-Trp の BF 形成に及ぼす影響を詳細に解析することを目的とした。また L-Trp と同様、欠乏しがちなアミノ酸である L-Cysteine（L-Cys）の代謝遺伝子変異株も対象として解析を行った。

【 方法 】

供試菌株として *Escherichia coli* K-12 BW25113（Wild Type：WT）及び L-Trp および L-Cys 代謝系遺伝子欠損株を用いた。BF 形成量評価は LB 培地で 30℃、24 h、静置培養し、形成された BF 量を Crystal Violet 法にて測定した。また、L-Trp 添加条件下における BF 形成量評価では、培養 0 h あるいは 16 h で L-Trp を添加し、その後の BF 形成量の変化を観察した。

【 結果・考察 】

WTと比較してL-TrpあるいはL-Cysの細胞内濃度が低いと考えられる変異株のほとんどでBF形成量が増加し、細胞内のL-TrpやL-Cysの濃度が低下するとBF形成が亢進することが示唆された。しかし、L-Cys合成系の最初の酵素をコードする*cysE*の欠損株は例外的にBFを形成しなかった。*cysE*はL-Trp合成とL-Cys合成の共通原料であるL-Serineを基質とするため、*cysE*欠損によりL-Trp合成が亢進して細胞内濃度が高まった結果BF形成が抑制された可能性がある。一方、LB培地にL-Trpを添加するとWTのBF形成が顕著に抑制された。以上の結果より、アミノ酸の中でも特に不足しがちなL-Trpの細胞内濃度の低下がBF形成のtriggerとなっている可能性が強いと考えられた。

L-Tryptophan, L-Cysteine, Biofilm

講演番号：2C24a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ C校舎24会場

大腸菌の核酸代謝とバイオフィルム形成の関連性

Nucleic acid metabolism and biofilm formation in *Escherichia coli* K-12

○臼井 有美[1]、古川 壮一[1]、荻原 博和[1]、森永 康[1]（[1]日大院・生資科）
○Yumi Usui[1], Soichi Furukawa[1], Hirokazu Ogihara[1], Yasushi Morinaga[1]
（[1]Coll. Bioresource Sci., Nihon Univ.）

【目的】自然界において、微生物は浮遊状態よりもむしろ固体表面に付着し、バイオフィルム(以下BF)と呼ばれる高次構造体を形成して生育する場合が多い。BFは薬剤に対して耐性が高く、医療器具や食品製造工程の汚染源となるため。その形成制御は重要な課題とされているが、BF形成機構については未解明な点が多い。我々はこれまでに大腸菌のマイクロアレイ解析などにより欠損するとBF形成能が変化する176種類の遺伝子を見出したが、その中にピリミジン合成関連遺伝子（ *pyrI*、*pyrB* ）が含まれていた。そこで本研究では、核酸代謝とBF形成の関連性を遺伝学的なアプローチにより解析することを目的とした。

【方法】供試菌株として*Escherichia coli* K-12 BW25113（以下WT）及びそのプリン及びピリミジン塩基関連遺伝子欠損株計26株(Keio collection)を用いた。BF形成培養は96穴microtiter plateで30℃、16～40時間静置にて行い、well内に付着した菌体をcrystal violetで染色し、水洗後に残存する色素をエタノール抽出し吸光度を測定してBF形成量とした。

【結果】ピリミジンヌクレオチド（PYR）合成系の鍵酵素 aspartate carbamoyl transferase（ ATCase ）の活性ユニットが欠失した *ΔpyrB* をはじめPYR合成が傷害を受けた変異株の殆どでBF低形成を示した。このことから、BF形成にはPYRが不可欠と考えられた。一方、ATCaseの制御ユニットが欠失した *ΔpyrI* あるいはリーダーペプチドが欠失した *ΔpyrL* はBF形成が顕著に高まり、制御解除に基づくPYR合成の上昇に伴いBF形成を過剰に形成したことが示唆された。これら欠損株をウラシル添加条件下で培養したところ、BF低形成株 *ΔpyrB* のBF形成が低濃度のウラシル存在下で高まるのに対し、BF過剰形成株 *ΔpyrI*、*ΔpyrL* のBF形成はウラシルで抑制された。

一方、プリンヌクレオチド（PUR）合成系の場合も、PUR合成が傷害を受けた変異株の殆どでBF低形成となる傾向が認められた。この結果より、PURもPYR同様BF形成に不可欠と考えられた。しかしながら例外的に、phosphoribosylglycinamide formyltransferaseが欠失した *ΔpurT* ではBF形成が顕著に高まった。この原因は*purT* の代替機能をもつ*purN* が *ΔpurT* において過剰発現したためと推定される。また、*ΔpurT* の過剰なBF形成はアデニン添加で抑制された。

以上の結果より、大腸菌のBF形成にはPYRおよびPURが不可欠であること、ならびに、PYR、PURの合成が亢進してPYR、PURの細胞内濃度が高まるとBF形成が促進されること、さらに、BF形成に至適なPYR、PURの濃度レベルが存在し、一定レベル以上に達するとBF形成が抑制されることが示唆された。

Escherichia coli, biofilm, aspartate carbamoyltransferase

講演番号：2C24a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ C校舎24会場

エリスリトール生産酵母*Trichosporonoides megachiliensis*におけるErythrose Reductase遺伝子の発現挙動とポリオールの生成

Erythrose Reductase gene expression and polyol production of *Trichosporonoides megachiliensis,* erythritol-producing yeast

○小林 洋介、 小山 善幸[1]、 荻原 淳、 加藤 順[1]、 春見 隆文 （日大院生資研究科・生資利用、[1]日大生資科・生命化）

○Yousuke Kobayashi, Yoshiyuki Koyama[1], Jun Ogihara, Jun Kato[1], Takafumi Kasumi (Dept. Biores. Util. Sci. Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ, [1] Dept. Chem. Life. Sci. Nihon Univ)

【目的】担子菌系酵母である*Trichosporonoides megachiliensis*は高浸透圧条件下でエリスリトールを生成することが知られ、実用菌株としてエリスリトールの工業的生産にも用いられている。一方、本菌はエリスリトール以外のポリオールも生成することが確認されているが、各々のポリオール生成がどのような生理的意義をもつのかは明らかではない。本研究では生育にともなうポリオール生成量の比較と関連遺伝子の発現量解析、およびエリスリトール生成関連酵素である*erythrose reductase1*、*2*、*3*(*er1*、*2*、*3*)の特異性について検討し、本菌の特異な糖代謝機構の解明を目的とした。

【方法】2 %グルコースまたは20%グルコース培地で12時間から72時間培養した菌体、2 %から60 %グルコース培地で7日間培養した菌体のポリオール蓄積量をイオンクロマトグラフィーによって分析した。また、*er1*、*2*、*3*及びグリセロール生成関連酵素でストレス応答が確認されている*glycerol-3-phosphate dehydrogenase*(*gpd*)の発現量をRT-PCRによって解析した。さらに、*er*の機能解析を行うために*Saccharomyces cerevisiae*において*er*と最も高い相同性を示す*gcy1*の欠損株、*S. cerevisiae* BY4741Δ*gcy1*に*er*を導入して強制発現を行い、ポリオールの生成に変化があるか否かを検討した。

【結果】*T. megachiliensis*が生成する主なポリオールはエリスリトール、グリセロール、トレハロースであったが、これらポリオールの生成条件は培養時間によって大きく異なっていた。本菌は浸透圧ストレスに対して初期段階ではグリセロールを蓄積するが、時間の経過につれてトレハロースを蓄積していき、次いでグリセロールの減少とともにエリスリトールを蓄積して細胞の保護に用いることが確認された。このとき*er1*、*2*と*er3*は発現挙動が異なり、*er1*、*2*ではエリスリトールの上昇とともに発現量も上昇したが、*er3*はこれに加えてグルコースが枯渇した状態で発現量が再び増加することが確認された。さらに、*S. cerevisiae*を用いた強制発現ではポリオールの生成に有意な差はみられず、*T. megachiliensis*と*S. cerevisiae*では予想された通り、糖代謝経路が異なることが明らかとなった。ERやGCY1はいずれもaldo-keto reductase(AKR)に属するが、その中でもERはこれまで知られている他のAKRと比べて特異的な性質を持つと考えられた。

polyol, erythritol, Erythrose Reductase

講演番号：2C24a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ C校舎24会場

エリスリトール生産酵母*Trichosporonoides megachiliensis*におけるtransaldolase遺伝子の機能解析

Functional analysis of transaldolase gene in *Trichosporonoides megachiliensis*, erythritol-producing yeast

○岩田悠志[1]、小山善幸[2]、大倉哲也[3]、荻原淳[1,2]、加藤順[2]、春見隆文[1,2]（[1]日大院生資研究科・生物利用、[2]日大生資科・生命化、[3]食総研）

○Hisashi Iwata、Yoshiyuki Koyama、Okura Tethuya[2]、Jun Ogihara、Jun Kato、Takafumi Kasumi(Nihon Univ,[2] Dept.Agric.Biol.Chem.)

【目的】

乾燥果実から分離した担子菌様酵母*Trichosporonoides megachiliensis*は、*S. cerevisiae*より高糖濃度条件下を好んで生育する酵母であり、適合溶質としてグリセロールの代わりに、主にエリスリトールを生成する。このエリスリトールは、ペントースリン酸経路(PPP)の中間代謝産物であるエリスロース-4-リン酸(E4P)が脱リン酸化されエリスロースとなり、さらにエリスロースがエリスロースレダクターゼ(ER)により還元されて生成すると考えられている。このことから*S. cerevisiae*におけるグリセロールと同様、細胞内の浸透圧調節を行うための適合溶質であると推定されている。エリスリトール生成には、ERの他に多くの酵素が関わっているが、中でも解糖系とPPPの分岐点に存在し、糖代謝フラックスの制御の中心的役割を担っていると考えられるtransaldolase(TAL)に着目した。これまでに、本菌からそれぞれ2個の相同遺伝子(*Tmtal*1, *Tmtal*2)を取得しており、その機能解析をすることで浸透圧ストレスに対する応答機構の解明を目的とした。

【方法・結果】

これまでに、取得した両遺伝子において、他菌種酵母で保存されているtransaldolaseAB domainを有していた。そこで、両遺伝子の推定したアミノ酸配列の比較及び5'上流域の解析をしたところ、72%の相同性を示し、*Tmtal*2の5'上流域を含むプロモーター領域に、浸透圧ストレス応答に関与するSTRE (stress response element)配列が存在した。そのため、*Tmtal*2は浸透圧ストレスに対して応答する遺伝子であることが示唆された。そこで、浸透圧ストレスに対す挙動を検討するために、ストレスフリー及び浸透圧ストレス(0.8 M NaClストレス)条件下で10分毎に0-60分間及び90分間培養した後、菌体を回収し、*Tmtal*1及び*Tmtal*2のmRNA発現動態を半定量的PCRにより解析をしたところ、浸透圧ストレス(0.8 M NaCL)条件下で*Tmtal*2は、浸透圧ストレスに応答して時間経過と共に発現量が増加する遺伝子、*Tmtal*1は、非応答であり常時一定的に発現する遺伝子であることが判明した。同時にエリスリトール生成と*Tmtal*2の相関性を検討するために、前途のストレス条件下で30分毎に0-120分間の菌体を用いて、イオンクロマトグラフィーにより菌体内糖アルコール蓄積量を解析したところ、*Tmtal*2の発現動態とエリスリトール蓄積量の相関がみられることから、本遺伝子はエリスリトール生成に関与していることが示唆された。また、浸透圧ストレスを負荷した初期にグリセロールとエリスリトールを同時期に蓄積していることから、浸透圧ストレスに対する高度な適応機構を有していることが示唆された。

osmotic stress, transaldolase, erythritol

講演番号：2C24a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ C校舎24会場

ヨーグルト乳酸菌によるミルク培地中の溶存酸素低減メカニズムの解明

Study on the dissolved oxygen reduction mechanism in milk by yogurt lactic acid bacteria

○川嶋紘子[1]、堀内啓史[1]、福井宗徳[1]、山本裕司[2]、向井孝夫[2]、佐々木泰子[1]（明治[1]、北里大・獣[2]）
○Hiroko Kawashima[1], Hiroshi Horiuchi[1], Munenori Fukui[1], Yuji Yamamoto[2], Takao Mukai[2], Yasuko Sasaki[1] (Meiji, Kitasatodai)

【目的】ヨーグルトはLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus（以下L. bulgaricus ）とStreptococcus thermophilus（以下S. thermophilusの2菌種の共生発酵によって作られる。我々はこれまでにL. bulgaricus 2038株とS. thermophilus 1131株によるヨーグルト発酵の酸度上昇は溶存酸素が約0 ppmになってから始まること、溶存酸素がヨーグルト発酵を阻害することを見出し、あらかじめ溶存酸素を低減化したミルク培地を用いることによりヨーグルト発酵を30分短縮できることを報告した。本研究は、L. bulgaricus 2038株とS. thermophilus 1131株によるミルク培地中の溶存酸素低減メカニズムの解明を目的とした。
【方法と結果】培養は、10%脱脂粉乳培地（ミルク培地)を使用し43℃で行った。また比色法によるミルク培地中の過酸化水素定量法を開発し、溶存酸素の処理方法を解析した。その結果、L. bulgaricus 2038株とS. thermophilus 1131株は単菌培養において、それぞれ溶存酸素を減少させてから発酵を開始するが、その処理方法は異なることが確認された。すなわち、L. bulgaricus 2038株、S. thermophilus 1131株ともに培養開始直後から溶存酸素濃度の減少が見られるが、前者では培養開始30分で40 μM、90分では100 μM以上の過酸化水素が検出されるのに対して、後者では過酸化水素は発酵終了まで検出されなかった。一方、過酸化水素存在下でS. thermophilus 1131株を培養したところ、培地中の過酸化水素濃度は減少しなかった。従って、S. thermophilus 1131株は溶存酸素を処理するが、過酸化水素を産生しないことが示唆された。また、S. thermophilus 1131株のゲノム情報から、溶存酸素の処理はNADH oxidase（H₂O型）が関与している可能性が高いと考えられた。そこで、NADH oxidase（H₂O型）ノックアウト株を作製し、ミルク培地中の生育を調べたところ、ノックアウト株は溶存酸素を処理する能力がほとんど認められなかったことから、S. thermophilus 1131株において溶存酸素を処理しているのはNADH oxidase（H₂O）であることが示唆された。

yogurt, lactic acid bacteria, oxygen

講演番号：2C24a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ C校舎24会場

Paracoccus sp. 43P株のL-グルコース代謝経路

An L-glucose metabolic pathway in *Paracoccus* sp. 43P

○清水　哲、高谷　直樹、中村　顕（筑波大院・生命環境）
○Tetsu Shimizu, Naoki Takaya, Akira Nakamura (Grad. Sch. Life Environ. Sci., University of Tsukuba)

【目的】地球上のほとんどの生命は、D-glucose を炭素源及びエネルギー源として利用し、生育しているが、D-glucose の鏡像異性体である L-glucose に関しては資化する生物の報告はなされていない。そのため、タンパク質合成における L-アミノ酸の利用のように、グルコース代謝においても"ホモキラリティー"が存在すると考えられている。

我々は、この"グルコース代謝のホモキラリティー"の解明を目指すために、L-glucose 資化菌として *Paracoccus* sp. 43P 株を自然環境より分離し、同代謝経路の全貌を明らかにした [1)]。同代謝経路は、L-glucose の dehydrogenase (LgdA)による L-gluconate の生成後、5 位の dehydrogenase (LgnH)による酸化/reductase (LgnI)による還元を通じた D/L 変換を経て D-idonate を生成し、さらに 2, 3 位の dehydratase (LgnE)による脱水反応、6 位の kinase (LgnF)によるリン酸化、aldolase (LgnG)による開裂を経て、pyruvate と D-glyceraldehyde-3-phosphate を生じるものであった。この経路は、全体としては超好熱古細菌の D-glucose 代謝で見られる semi-phosphorylative Entner-Doudoroff 経路に類似しているが、aldonate の段階で D/L 変換を行う点が特徴的である。また、L-gluconate 以降の過程は、大腸菌の L-galactonate 代謝経路と同一の反応であった。

今回上記の代謝経路が、実際に *in vivo* で機能しているかどうかを明らかにするため、代謝経路を構成する酵素遺伝子群の破壊株を作製し、L-glucose 及び代謝中間体に対する資化能について検討した。

【方法及び結果】同株の形質転換は大腸菌との接合伝達により可能であったので、相同組換えによる薬剤耐性遺伝子の挿入により *lgdA*, *lgnE*, *lgnH*, *lgnI* の各破壊株の作製を行い、これらの株について L-glucose 及び代謝中間体の L-gluconate, D-idonate を単一炭素源とした最少培地での生育を検討した。その結果、*lgnE* (dehydratase)破壊株を除いて、代謝経路の下流に位置する遺伝子の破壊により、各化合物の資化能を失うことが明らかになった。*lgnE* 破壊株はいずれの化合物でも生育したので、同株内では他の dehydratase が LgnE と同様の反応を行うことが考えられた。またいずれの破壊株も L-gluconate の C4 epimer である L-galactonate に対する資化能は失っておらず、これらの遺伝子が L-galactonate 代謝には関与しないことが示唆された。この結果から、同定した遺伝子群が同株内で L-glucose 代謝に関与していることが明らかになった。

現在代謝遺伝子クラスター中のトランスポーター、転写制御因子をコードする遺伝子の破壊株を作製して解析を進めており、こちらの結果も併せて報告する予定である。

本研究は、2010 年度野田産研研究助成の補助を受けて実施した。

1) 日本農芸化学会2011年度大会要旨集p. 91

L-glucose metabolism, Entner-Doudoroff pathway, *Paracoccus*

講演番号：2C24a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ C校舎24会場

Paracoccus sp. 43P由来L-グルコース代謝経路酵素の立体構造解析

Structural analyses of enzymes in the L-glucose metabolic pathway from *Paracoccus* sp. 43P

○深野 和紘、清水 哲[1]、牧 遼、佐々木 康幸、 中村 顕[1]、 矢嶋 俊介
（東農大応生科・バイオ、[1]筑波大・生命環境）
○Kazuhiro Fukano, Tetsu Shimizu[1], Ryo Maki, Yasuyuki Sasaki, Akira Nakamura[1], Shunsuke Yajima
（Dept. of Biosci., Tokyo Univ. of Agri., [1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., University of Tsukuba）

生物はタンパク質合成におけるL-アミノ酸のように、鏡像異性体の一方を偏って利用するホモキラリティーを示すことが知られており、糖質についてもホモキラリティーが存在している。生命の重要な栄養源であるグルコースにもD体とL体が存在しているが、ほとんどの生物がD体を資化可能なのに対して、L体は資化されないと考えられてきた。しかし我々は、L-グルコースを資化可能な*Paracoccus* sp. 43P株を単離し、そのL-glucose代謝経路の全貌を明らかにした。本代謝経路では、第一段階の酵素反応でL-glucoseが酸化され、L-gluconateが生じる。続く第二・第三段階の酵素反応ではL-gluconateの5位の水酸基が酸化・還元されることでエピ化され、D-idonateへと変換される。

この経路の酵素がどのようにL-glucoseやその代謝物を認識し反応を触媒するのかを明らかにするため、結晶構造解析を行い、前回大会では第一段階の反応を触媒するL-glucose dehydrogenase (LgdA)の立体構造を報告した。今回は第二・第三段階に関わる2つの酵素L-gluconate dehydrogenase (LgnH)および、5-keto-L-gluconate reductase (LgnI)の立体構造解析を報告する。

両酵素を大腸菌を宿主として生産・精製し、蒸気拡散法により結晶化して、X線結晶構造解析法により、それぞれ2.3 Å、2.0 Åの分解能で立体構造を決定した。L-gluconate dehydrogenaseはNAD(H)依存酵素であり、L-gluconateの5位の水酸基を酸化して5-keto-L-gluconateを生成する反応を触媒する。この酵素の結晶は、空間群$P6_122$で非対象単位中に1分子を含んでおり、結晶学的対称分子間で二量体構造を形成していた。それぞれのサブユニットに亜鉛結合構造をもつ活性中心が存在しており、ここに補酵素のニコチンアミド部分が隣接している様子が観察された。5-keto-L-gluconate reductaseはNADP(H)依存酵素であり、5-keto-L-gluconateの5位の水酸基を還元してD-idonateを生成する反応を触媒する。この酵素の結晶は、空間群$P3_122$で非対象単位中に4分子を含む構造をとっていた。本酵素は4量体を形成しており、各サブユニットにSer, Lys, Thrの３残基からなる活性中心が存在していた。

これらの立体構造から、L-gluconate dehydrogenaseおよび5-keto-L-gluconate reductaseの基質認識および反応機構の考察を行う予定である。

X-ray crystallography, L-gluconate dehydrogenase, 5-keto-L-gluconate reductase

講演番号：2C24a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ C校舎24会場

好熱性独立栄養性水素細菌*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6におけるエネルギー獲得様式の違いに応じた代謝系の変化

Changes of Energy Metabolisms According to the Energy-acquisition manners in *Hydrogenobacter thermopihlus* TK-6

○佐藤 由也、神邉 悠奈、宮野 裕介、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫（東大院農生科・応生工）

○Yuya Sato, Haruna Kanbe, Hirosuke Miyano, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi (Univ. Tokyo)

【目的】好熱性独立栄養性水素細菌*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6は二酸化炭素を唯一の炭素源として旺盛に生育する。炭酸固定経路として還元的TCA回路を用いており、その他にもこれまでに多くの興味深い代謝経路が発見されてきた。また、本菌は水素を唯一のエネルギー源(電子供与体)、酸素を最終電子受容体として生育するが、これまでに硝酸を最終電子受容体、およびチオ硫酸を電子供与体とする生育も確認されている。本研究では特にこれらの条件でのエネルギー代謝系に注目し、電子供与体と受容体の組み合わせによるエネルギー代謝系の変化を解析することを目的とした。

【方法】本菌を各条件において培養し、対数増殖期においてmRNAを抽出し、トランスクリプトーム解析に供した。培養条件には[電子供与体－電位受容体]として[H_2-O_2]、[H_2-NO_3^-]、[$S_2O_3^{2-}$-O_2]の三つの組み合わせを用いた。

【結果】中央代謝系である還元的TCA回路酵素、糖新生酵素、GS-GOGAT系酵素遺伝子の発現量はいずれの条件でも高い値を示した。本菌は酸素呼吸末端酸化酵素に相同性の高い4種類の遺伝子を有しているが、それらの発現量は最終電子受容体によって大きく変化しており、各生育条件での使い分けがなされていることが確認された。また、硝酸を最終電子受容体として用いた系では脱窒酵素遺伝子群の発現量が大きく上昇していた。チオ硫酸を電子供与体とした場合には、本菌が有する4種のhydrogenase様遺伝子の内、通常発現量の高い3種のhydrogenase遺伝子の発現量が大きく低下していた。この様に、酸素呼吸、硝酸呼吸、水素酸化等のエネルギー代謝系遺伝子群は誘導的であり、恒常的には発現していないことが分かった。これらと対照的に、別のエネルギー代謝系である硫黄化合物の酸化還元酵素関連遺伝子の多くは、全条件を通じて発現量は大きく変化せず、恒常的に高い発現量を示していた。これは本菌の単離環境に硫黄化合物が豊富に存在し、恒常的に硫黄化合物の酸化還元によるエネルギー代謝がなされていたことを示唆している。

thermophile, hydrogen-oxidation, denitrification

講演番号：2C24a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ C校舎24会場

好熱性独立栄養性水素細菌*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6由来Fructose-1,6-bisphosphatase, aldolaseの解析

Analysis of Fructose-1,6-bisphosphatase and aldolase of the thermophilic, obligately chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

〇安間 俊輔、 亀谷 将史、 新井 博之、 石井 正治、 五十嵐 泰夫（東大院農生科・応生工）
〇Shunsuke Anma, Masafumi Kameya, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi (Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo)

好熱性水素細菌*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6株は、水素をエネルギー源、二酸化炭素を炭素源として生育する独立栄養性細菌である。本菌は炭酸固定経路として還元的TCA回路を有しており、固定された炭素は核酸や細胞壁成分の合成のため糖新生経路にも流れている。トランスクリプトーム解析の結果から、本菌は糖新生の鍵酵素であるFructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)を2種類発現していることが明らかとなった。片方はFBP aldolase活性も併せて持っており、この性質については、昨年度の本大会において発表している。もう片方はinositol monophosphataseとしてアノテートされている酵素であった。さらに、本菌細胞抽出液よりFBP aldolase活性を指標に酵素の精製を行ったところ、上記のものとは別の酵素が存在することが示唆された。本発表では、これらの酵素学的解析に加えて、トランスクリプトーム等の網羅的解析も合わせて本菌のFBPase, FBP aldolaseについて議論する。

fructose-1,6-bisphosphatase, gluconeogenesis, fructose-1,6-bisphosphate aldolase

講演番号：2C24a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ C校舎24会場

好熱性独立栄養性水素細菌*Hydrogenobacter thermophiles* TK-6の二酸化炭素利用性とトランスクリプトーム解析

Carbon dioxide utilization and transcriptome analyses in terms of applied CO_2 concentration in *Hydrogenobacter thermophiles* TK-6

○宮野裕介、佐藤由也、神邉悠奈、新井博之、石井正治、五十嵐泰夫（東大院農生科・応生工）
○Hirosuke Miyano, Yuya Sato, Haruna Kanbe, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi (Univ. Tokyo)

【目的】*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6は、水素をエネルギー源、二酸化炭素を唯一の炭素源として還元的TCA回路（RTCA回路）により炭酸固定を行い旺盛に生育する好熱性独立栄養性水素細菌である。そのため、二酸化炭素の利用性を含め工業的利用という観点からもその代謝の解明には興味が持たれる。本研究では、特に気相中二酸化炭素濃度に応じた代謝系の変化を解析することを目的とした。
【方法】様々な二酸化炭素濃度条件下で本菌を培養し、その生育を観察した。また低濃度二酸化炭素、高濃度二酸化炭素通気培養条件時の対数増殖期においてmRNAを抽出し、トランスクリプトーム解析に供した。
【結果】本菌は気相中二酸化炭素濃度が1%～60%の間ではいずれの濃度でも旺盛に生育することがわかった。更に気相中二酸化炭素濃度が80%の場合でも十分に生育することがわかった。これは本菌が気相中二酸化炭素濃度に対する高い順応性を持つことを示唆している。また、SOxやNOxを含んだ模擬発電所排ガス中でも十分に生育することがわかった。トランスクリプトーム解析の結果、低濃度二酸化炭素条件、高濃度二酸化炭素条件下いずれの場合も、RTCA回路関連遺伝子、糖新生関連遺伝子の発現量に大きな変化はなかった。低濃度二酸化炭素条件下で培養したものは、formate dehydrogenase遺伝子の発現量が上昇していた。また、脱窒酵素遺伝子群と末端酸化酵素遺伝子群の発現量が上昇していた。なお、本研究は独立行政法人科学技術振興機構の先端的低炭素化技術開発（ALCA）における、独立栄養性微生物の代謝高性能化の一環で行われた。

carbon fixation, thermophile, hydrogen-oxidation

講演番号:2C24a11
講演日時、会場:3月23日11:10～ C校舎24会場

Gluconacetobacter xylinus IFO 3288におけるアルコール脱水素酵素のサブユニットIII

Subunit III of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase of *Gluconacetobacter xylinus* IFO 3288

○向井　妃奈、薬師　寿治、松谷　峰之介、松下　一信（山口大・農）
○Hina Mukai, Toshiharu Yakushi, Minenosuke Matsutani, Kazunobu Matsushita (Fac. Agr. Yamaguchi Univ.)

【目的】酢酸菌による、エタノールからアセトアルデヒドを介した酢酸への酸化反応は本菌特徴的な反応であり、一段階目の反応はアルコール脱水素酵素(ADH)によって行われる。本酵素はエタノール：ユビキノン酸化還元活性をもち、本菌のエタノール酸化系呼吸鎖の初発脱水素酵素として働く。ADHは３つのサブユニットから構成されており、サブユニットIはPQQとヘムCを１分子づつ含む脱水素酵素サブユニット、サブユニットIIは３つのヘムCを含み、ユビキノンとの反応を司るシトクロム*c*サブユニットである。*Acetobacter*属酢酸菌において、サブユニットIIIを欠く変異株では、サブユニットIは活性、タンパク質共に検出できなくなるほど不安定になる。このため、サブユニットIIIはシャペロン様サブユニットであると考えられている。一方、*Gluconacetobacter*属酢酸菌から精製されたADHには、サブユニットIIIは確認されていない。しかし、我々が最近報告した*Gluconacetobacter xylinus* IFO 3288 (NBRC 3288)株の完全ゲノムには、サブユニットIIIをコードする*adhS*遺伝子のホモログが存在する。本研究では、この*adhS*遺伝子ホモログの機能を明らかにするため遺伝子破壊株を作製した。
【方法】*Ga.xylinus* IFO 3288の膜画分からADHを精製した。界面活性剤としてTriton X-100とDodecyl maltosideの２種類を使用し、可溶化とその後のカラムクロマトグラフィーを行った。フェリシアン化カリ還元を用いたADH活性の測定とSDS-PAGE解析を行った。次に、 ADHのサブユニットIIをコードする*adhB*遺伝子(GLX_26600)とサブユニットIIIをコードする*adhS*遺伝子ホモログ(GLX_16410)の5’側、3’側領域をそれぞれクローニングし、テトラサイクリン耐性遺伝子を挟むように遺伝子破壊プラスミドを構築した。構築したプラスミドを用いて*Ga.xylinus* IFO 3288株をエレクトロポレーションにより形質転換した。形質転換体からダブルクロスオーバーを起こしたものを選抜し、遺伝子破壊株とした。これら遺伝子破壊株のエタノール酸化活性、ADH活性測定ならびにSDS-PAGE(ヘム染色)による解析を行った。
【結果】本菌の膜画分からTriton X-100、あるいはDodecyl maltosideを使用してADHを精製した。これらをSDS-PAGEで分離し、Coomassie染色や銀染色したところサブユニットIIIは見られなかった。*adhB*遺伝子破壊株では、エタノール酸化活性はなく、さらに脱水素酵素活性も検出されなかった。しかしヘム染色したSDS-PAGEでは、サブユニットIのバンドが確認できたので、*adhB*破壊株でもサブユニットIがヘムCを持った状態で発現することが示唆された。*adhS*遺伝子ホモログ破壊株ではエタノール酸化活性、脱水素酵素活性共に検出されたので、ADHの分子構築においてこの*adhS*遺伝子ホモログは必要ないことが分かった。

acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter* sp., alcohol dehydrogenase

講演番号:2C24a12
講演日時、会場:3月23日11:21～ C校舎24会場

*A. ferrooxidans*由来ubiquinol oxidase活性におけるaa_3型 cytochrome *c* oxidaseの関与

Involvement of aa_3-type cytochrome *c* oxidase in ubiquinol oxidase activity of *A. ferrooxidans*

○杉尾　剛、竹内文章[1]（杉尾化学合成独立栄養細菌研、[1]岡大・環境管理セ）
○Tsuyoshi Sugio, Fumiaki Takeuchi[1] (Sugio Inst. of Chemolithoautotrophy, [1]Environ. Manage. Cen. Okayama Univ.)

【目的】*A. ferrooxidans*(A.f.)は好酸性の化学合成独立栄養細菌でバイオリーチングに重要な役割を果たしている。本菌の硫黄酸化の末端酸化酵素に関しては*bd*型ubiquinol oxidase(UOase)という説とaa_3 型cytochrome *c* oxidase(COase)という二説がある。我々は、A.f.が元素硫黄 (S^0)やテトラチオン酸(4-TH)を電子供与体にして3価鉄を2価鉄に還元する3種類のFe reductaseを持っていること、S^0や4-THで増殖するA.f.が培養初期に高い鉄酸化活性を持つこと等から、Fe reductaseとiron oxidase(COaseが末端酸化酵素)が鉄イオンによってリンクする硫黄酸化系の存在を提案してきた。2価鉄及びS^0で増殖したA.f.からUOaseを精製してみるとcyt.*b*とaa_3型 COaseに特徴的なスペクトルを示したが*d* 型cyt.は存在していなかった。今回、UOase活性の発現にCOaseが関与しているかを検討した。

【方法及び結果】UOaseの基質にはUbiquinone-2の還元型(Q_2H_2)を用いた。Q_2H_2は1 mMのNaCNの存在下、時間に応じて精製UOase内のaa_3型 COaseを還元した。A.f. ATCC 23270株のCOaseに対して調製した抗体を精製UOase溶液に添加すると、抗体量に比例してcyt.*b*とCOaseは共沈殿し、それに対応して沈殿物を除去した後の精製UOase溶液のUOase活性は消失した。これらの結果は、UOaseは、cyt.*d*ではなくcyt.*b*とaa_3型COaseとの間で複合体を形成していること、Q_2H_2からの電子がcyt. *c* oxidaseに伝達されること強く示している。

Keyword1 *A. ferrooxidans*, Keyword2 ubiquinol oxidase, Keyword3 cytochrome *c* oxidase

講演番号：2C24a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ C校舎24会場

E. coli 細胞内のATPのダイナミクスをATPバイオセンサー「ATeam」を用いて解明する

Revealing the dynamics of ATP concentration in *E. coli* cells using ATP biosensor "ATeam"

○柳沼秀幸[1, 2]、冨山圭祐[2]、田端和仁[1]、今村博臣[3]、野地博行[1, 2]（[1]東大院工・応化、[2]阪大院生命機能、[3]京大・白眉センター）

○Hideyuki Yaginuma, Keisuke Tomiyama, Kazuhito V. Tabata, Hiromi Imamura and Hiroyuki Noji ([1] The University of Tokyo, [2] Osaka University, [3] Kyoto University)

【目的】細胞は常にタンパク合成などさまざまな反応のエネルギー源としてATPを必要とするので、絶えずATPを合成し分解している。これまで細胞内のATP濃度は多数の細胞の平均値で議論されることが多かったが、合成と分解のバランス次第で細胞内のATP濃度は一時的に変動する可能性も考えられる。しかし計測手法の限界から、これまでそのような変動の報告は我々の知る限り無かった。そこで我々は生物のエネルギー生産の仕組みを一細胞レベルで詳細に理解するために、大腸菌のATP濃度の変動を可視化することを目的に研究を行った。

【方法】2009年に今村らは蛍光性ATPバイオセンサー「ATeam」を開発した。ATeamはF_oF_1-ATP合成酵素のεサブユニットでCFPとYFPを繋いだ構造をもち、ATP濃度に応じてCFP-YFP間のFRET効率が変化する。我々はこのATeamを大腸菌において発現させ、蛍光波長の変化を測定した。

【結果】まず大腸菌で発現させたATeamのシグナルを多数の菌を含んだ培養液で測定した。ATeamシグナル（YFP/CFP比）は、解糖系を阻害するIodoacetateと酸化的リン酸化を阻害するシアン化カリウムの両方で低下し、特に後者で急速に低下した（時定数τ = 6.0秒）。このことは、ATeamがATP濃度に対して迅速に応答し、時間分解能の高い解析が可能であることを示している。続いて、顕微鏡の下で個々の大腸菌のATeamシグナルの観察を行った。同じ培養液に由来する大腸菌群であっても菌ごとにATeamシグナルは大きなばらつきが見られた。さらに、単一の大腸菌およびその子孫に着目すると、一部の菌でATeamシグナルが一時的に低下し、約20分で元の値まで回復するという現象がみられた。この現象は細胞周期とは無関係に起こっているように思われた（右図）。以上の結果から、細胞内のATP濃度は常に一定ではなくダイナミクスが存在することが示唆された。

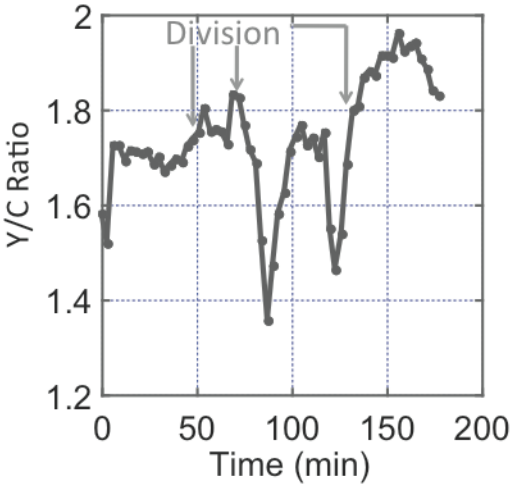


Fig. ATeam signal change of one selected cell plotted against time. Timing of division indicated.

今後は単一の大腸菌でATP濃度が変化する理由を解明する実験を行う。また、ATeamとシアン化カリウムを用いて、酸化的リン酸化によるATP合成速度を見積もる実験も進行中である。酸化的リン酸化によるATP合成量の直接測定はこれまで困難であったため、ATeamは細胞のエナジェティクスの研究において今後ますます重要なツールとなる可能性がある。

ATP dynamics, single cell measurement, bioenergetics

講演番号：2C24a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ C校舎24会場

好熱性独立栄養性水素細菌*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6における遺伝子導入系の確立

Transformation system for the thermophilic, obligately chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

○木村　真人、新井　博之、五十嵐　泰夫、石井　正治（東大院農生科・応生工）
○Makoto Kimura, Hiroyuki Arai, Yasuo Igarashi and Masaharu Ishii (Univ. Tokyo)

【背景・目的】現在、地球温暖化対策の一環として様々な方法で二酸化炭素ガスの削減が行われている。そのような中、単純に削減するのではなく、生物による炭酸固定反応を利用することにより、二酸化炭素をバイオマスとして積極的に利用するという考えが提案されている。*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6は、水素をエネルギー源とし、二酸化炭素を唯一炭素源として生育する絶対独立栄養性の水素細菌である。本菌は70℃という高温環境下において、通常のTCAサイクルを逆行させた還元的TCAサイクルにより二酸化炭素ガスを固定している。TCAサイクルの逆行には強い還元力を必要とし、また、還元的TCAサイクルにおいて炭酸固定を担う酵素は酸素に弱いことが知られている。そのため、多くの場合、還元的TCAサイクルは微好気または嫌気性微生物の一部がもつ炭酸固定経路である。TK-6株の炭酸固定酵素も酸素に弱いが、興味深い事に本菌は酸素分圧が高い環境下（酸素濃度10~40%）においても、還元的TCAサイクルにより炭酸固定を行い旺盛に生育する。また、本菌は独立栄養性生物としては非常に生育が速いことも知られている。これらのことから、本菌は非常に優れた炭酸固定能力を有し、本菌を用いた物質生産系を構築することにより、効率的な二酸化炭素ガスを原料としたものづくりシステムが構築出来ると考えられる。本菌の応用利用のためにはまず代謝生理を深く理解する必要があるため、我々の研究室では生化学的、遺伝学的観点から研究が進められており、多くの知見が蓄積されてきた。これまで、本菌における遺伝子破壊系に関しては既に開発されているが、遺伝子導入系は確立されていなかった。今後、本菌における生理学的解析をさらに進めるためにも、また物質生産系を構築するためにも本菌における遺伝子導入系の構築が必須である。そこで本研究では、*H. thermophilus* TK−6の遺伝子導入系の構築を行う事を目的とした。

【方法・結果】本菌で保持出来るプラスミドが見つかっていないため、目的遺伝子を直接ゲノムに導入することにした。ゲノム中の相同配列、本菌で発現可能なプロモーター及び耐熱性抗生物質耐性遺伝子を含む遺伝子発現用プラスミドを構築し、TK-6株を形質転換した。得られた菌体から抗生物質耐性遺伝子が検出された事から、本菌において相同組換えを利用した遺伝子導入系を構築する事に成功した。

なお、本研究は独立行政法人科学技術振興機構の先端的低炭素化技術開発（ALCA）における、独立栄養性微生物の代謝高性能化の一環で行われた。

transformation, carbon fixation,

講演番号：2C24a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ C校舎24会場

好熱性水素細菌*Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1株における形質転換法の確立

Transformation system for thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1

○五十嵐 佳史、木村 真人[1]、新井 博之[1]、石井 正治[1]、五十嵐 泰夫[1]（東大・農、[1]東大院農生科・応生工）

○ Yoshifumi Igarashi, Makoto Kimura, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi (Univ. Tokyo)

【目的】現在、二酸化炭素の削減は社会的な問題となっている。そのため二酸化炭素を資源として利用する技術の開発は重要な課題であるといえる。*Hydrogenophilus thermoluteolus*は水素をエネルギー源、二酸化炭素を炭素源として50℃で生育できる独立栄養性水素細菌である。本菌は独立栄養細菌の中で最も生育速度が早く、また従属栄養的にも生育が可能である。本菌を用いることで、二酸化炭素を原料とした物質生産系を構築できる可能性があると考えられる。本菌をそうした物質生産のために用いるには代謝の制御等についての理解が必要となる。しかしながら、本菌における生理学的解析は未だ十分には行われていない。その理由の一つとして、本菌における遺伝子操作系が確立されていないことが挙げられる。そこで本研究では、*H. thermoluteolus*の形質転換系の構築を目指した。

【方法および結果】抗生物質耐性遺伝子を有する広域宿主域のプラスミドを用いて、接合伝達により*H. thermoluteolus*の形質転換を試みた。得られたコロニーを、抗生物質を添加した無機塩培地で培養したところ生育が認められた。また、生育した菌体から抗生物質耐性遺伝子が検出された。以上のことから*H. thermoluteolus*における遺伝子操作系を確立することに成功した。今後、本系を用いて*H. thermoluteolus*の代謝について知見を深める。

transformation, CO_2, autotroph

講演番号：2C24p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ C校舎24会場

酵母 *Saccharomyces cerevisia* に見出した一酸化窒素合成酵素の機能解析

Functional analysis of nitric oxide synthase (NOS) found in *Saccharomyces cerevisia*

○川原　寛弘、西村　明、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Nobuhiro Kawahara、Akira Nishimura、Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】当研究室ではこれまでに、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、酸化ストレス下で誘導されるプロリンオキシダーゼ Put1 と *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 を介して、プロリンからアルギニンが合成されること、および増加したアルギニンが細胞のストレス耐性に関与することを報告した。さらに最近、細胞内の ROS レベルを上昇させる高温処理（39℃）において、アルギニン依存的に一酸化窒素（NO）が生成し、ストレス耐性に寄与していることを見出した。これらの結果は、哺乳類型の一酸化窒素合成酵素（NOS)が酵母にも存在する可能性を示唆している。しかしながら、酵母においてはゲノムに哺乳類 NOS のオルソログ遺伝子がなく、NOS は同定されていない。本研究では、酵母における NO の生成機構と生理機能を明らかにすることを目的として、NOS の同定と機能解析を行った。

【方法・結果】哺乳類の NOS はアルギニンから 2 段階の酸化反応で NO を合成するオキシドレダクターゼであるが、酵母のゲノムには機能未知のオキシドレダクターゼ遺伝子が 27 個存在している。そこで、各遺伝子を大腸菌で発現させ、得られた形質転換体の無細胞抽出液を用いて NOS 活性を測定した。その結果、有意に NOS 活性を示す遺伝子として *TAH18* を同定した。*TAH18* 産物（Tah18）は、NADPH の電子を FAD や FMN を介して Dre2 タンパク質に渡し、細胞質における鉄硫黄クラスターの生成に関与することが報告されている。しかしながら、Tah18 の一次構造にはアルギニンの酸化に関わるオキシゲナーゼドメインが存在せず、レダクターゼドメインと相同性を示す配列しかない。また、哺乳類 NOS の活性化に必要なカルモジュリンを添加しなくても活性を示すことから、Tah18 は新規な NOS として機能していることが示唆された。次に、酵母の *TAH18* ノックダウン株を作製し、高温処理後の NOS 活性と細胞生存率を調べた。その結果、Tah18 の発現量の低下に伴い、NO 発生量が顕著に減少し、生存率も著しく低下した。これらの結果から、酵母において Tah18 依存的な NO 合成が細胞のストレス耐性に関与することが明らかになった。

現在、Tah18 と相互作用する Dre2 タンパク質が NOS 活性に必要なのかどうかについて、*DRE2* ノックダウン株を作製し、解析を行っている。また、大腸菌から精製した組換え Tah18 を用いて、キネティクスを解析し、基質との親和性や反応速度などの酵素学的性質を哺乳類 NOS と比較しながら調べている。さらに、Tah18 の NOS 活性に関与するアミノ酸残基を特定する目的で、*TAH18* のランダム変異導入ライブラリーを作製中である。

Saccharomyces cerevisiae, nitric oxide, nitric oxide synthase

講演番号：2C24p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ C校舎24会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の機能未知遺伝子 *POG1* によるリチウム耐性機構の遺伝学的解析

Genetic analysis of lithium stress tolerance by the uncharacterized *POG1* in *Saccharomyces cerevisiae*

○喜多島 萌　大城 聡　高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Moe Kitajima, Satoshi Oshiro, Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】当研究室では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のユビキチンリガーゼ Rsp5 変異株（*rsp5*^{A401E}）が種々のストレスに感受性を示すことから、Rsp5 がストレス耐性に関与すると考えている。これまでに *rsp5*^{A401E} 株の高温、塩化リチウムに対する感受性を相補するマルチコピーサプレッサーとして、転写因子をコードすると推定されている *POG1*（Promoter of Growth）を単離した（Demae *et al*., *FEMS Microbiol. Lett.*, **277**, 70, 2007）。興味深いことに、野生株で *POG1* を過剰発現させると、塩化リチウム耐性が著しく向上することも見出した。このことは、*POG1* が *RSP5* とは非依存的に作用すること、および *POG1* の過剰発現がリチウムの解毒に寄与することを示唆している。また、野生株と *POG1* 過剰発現株の間で細胞内リチウム含量に有意な差はなかったことから、*POG1* がリチウムの細胞外への排出を促進しているのではなく、細胞内でその毒性を緩和していると考えられる。*POG1* は G1/S 期移行に関与する転写因子として以前に報告されたが（Maria *et al*., *Genetics*, **151**, 531, 1999）、一次構造上のオルソログが他の生物に存在せず、既知の機能ドメインも見出されていないため、その分子機能はほとんど不明である。これまでに、過剰発現によって接合因子存在下における G1 arrest が阻害されるという報告もあり、細胞周期とリチウムストレス応答において共通の機構が存在する可能性がある。また、リチウムは躁うつ病の治療薬に用いられているが、その作用機序、細胞毒性については不明な点が多い。したがって、*POG1* の機能解析によって、リチウムによる細胞毒性や躁うつ病における作用機序などに対して新たな知見が得られる可能性がある。本研究では、機能未知遺伝子 *POG1* によるリチウム耐性機構の解明を目的として、*POG1* と遺伝学的相互作用を示す遺伝子を単離し、その解析を行った。

【方法・結果】*S. cerevisiae* は遺伝学的解析が容易なモデル生物であり、一遺伝子破壊株コレクションが利用可能である。そこで、①遺伝子破壊株、②遺伝子過剰発現株で *POG1* を過剰発現させ、リチウムに対する感受性をスポット試験で評価することにした。まず、*POG1* を 2μ プラスミド（pAD4）に組込み、*ADH1* プロモーター制御下で過剰発現可能なプラスミドを構築し、リチウム感受性を示すと報告されている 114 種の遺伝子破壊株（Zhao *et al*., *Genomics*, **95**, 290, 2010）に導入した。得られた形質転換体を塩化リチウム（100 mM, 200 mM）を含む完全合成（SC）寒天培地にスポットし、25℃で培養後、表現型を解析した。その結果、*POG1* の過剰発現によって、リチウム感受性が相補される遺伝子と相補されない遺伝子に分かれた。リチウム感受性が相補されない遺伝子には vacuolar protein sorting (VPS) 系の遺伝子（*VPS32*, *VPS46* など）が多く含まれていたことから、*POG1* がリチウムの液胞輸送に関与している可能性が考えられた。今後、すべての菌株の表現型解析を急ぐとともに、これらの遺伝子を機能別にグループ化し、*POG1* との機能的相関について解析を行う予定である。

Saccharomyces cerevisiae, *POG1*, lithium stress

講演番号：2C24p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ C校舎24会場

酵母*Saccharomyces cerevisiae*における塩基性アミノ酸の細胞毒性メカニズムの解析

Cytotoxic mechanisms of basic amino acids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○菊島理恵　西村 明　高木博史（奈良先端大・バイオ）
○Rie Kikushima, Akira Nishimura, Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】ヒト神経変性疾患の一種である Juvenile Neuronal ceroid lipofuscinosis（JNCL）は、*CLN3* 遺伝子に変異が起こることで発症すると考えられているが、現在までにその発症機序および治療法は確立されていない。*CLN3* はリソソームの塩基性アミノ酸トランスポーターをコードしており、JNCL 患者の細胞質にはアルギニンや変性タンパク質が蓄積しているという報告もある。このため、アルギニンなど塩基性アミノ酸の蓄積と JNCL の発症に関連性があると示唆されている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *BTN1* はヒト *CLN3* のホモログであり、液胞の塩基性アミノ酸の輸送に関与すると考えられている。近年、ヒトの *CLN3* を *BTN1* 破壊株で発現させると、塩基性アミノ酸の液胞への輸送機能を相補することが報告されており、*S. cerevisiae* は JNCL のモデル生物として使用されている。上記で示したように、塩基性アミノ酸の蓄積と JNCL の発症の関連性が示唆されているが、その詳細は明らかとなっていない。また、塩基性アミノ酸の細胞毒性に関するメカニズムも、ほとんど理解されていない。そこで、我々は細胞内の塩基性アミノ酸レベルの著しい増加が、神経変性疾患を発症させるような細胞毒性（変性タンパク質の蓄積など）を誘導するのではないかとの仮説を立て、*S. cerevisiae* を用いてそのメカニズムの解析を行った。

【方法・結果】まず、*S. cerevisiae*の*BTN1*破壊株を作製し、種々の濃度の塩基性アミノ酸を含む最最少寒天培地で培養した。その結果、*BTN1*破壊株は野生株に比べ、塩基性アミノ酸に強い感受性を示した。また、ヒスチジン＞リジン＞アルギニンの順で細胞毒性が強くなったことから、側鎖のpKa値の大きさと毒性の強さに相関は見られなかった。次に、塩基性アミノ酸の毒性メカニズを解析する目的で、原形質膜上の塩基性アミノ酸トランスポーターをコードする*CAN1*を過剰発現するプラスミドを構築し、野生株と*BTN1*破壊株に導入した。得られた形質転換体について塩基性アミノ酸に対する表現型を試験したところ、*CAN1*の過剰発現は*BTN1*破壊株よりも野生株により強い感受性を付与することが判明した。この結果は、*BTN1*の破壊によって*BTN2*の発現が増加し、*Rhb1*によるCan1の塩基性アミノ酸の取り込みを負に制御するためと考えられた。さらに、*CAN1*を過剰発現させた野生株の塩基性アミノ酸に対する強い感受性をマルチコピーで相補するサプレッサーの単離を試みた。*S. cerevisiae*野生株のゲノムから作製したマルチコピーライブラリーを上記の菌株に導入し、得られた形質転換体の中から、塩基性アミノ酸含有培地で生育するクローンを取得した。現在、表現型（塩基性アミノ酸感受性の相補）のプラスミド依存性を確認したクローンについて、プラスミドに挿入されている遺伝子を同定し、その詳細な解析を行っている。

Saccharomyces cerevisiae, basic amino acids, transporter

講演番号：2C24p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ C校舎24会場

酵母液胞膜の Ca^{2+}透過性イオンチャネル YVC1 の活性調節機構と生理的役割

Regulation and physiological role of yeast tonoplast cation channel YVC1

○浜本 晋、森 泰生[1]、矢部 勇[2]、魚住 信之（東北大院工・バイオ工学、[1]京大院工・生化、[2]電機大・工）

○Shin Hamamoto, Yasuo Mori[1], Isamu Yabe[2], Nobuyuki Uozumi (Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [1]Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ., [2]Dept. of Eng., Tokyo Denki Univ.)

【目的】出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の液胞膜には、哺乳類の細胞機能や様々な刺激応答に関与している TRP（transient receptor potential）チャネルと相同性を示す陽イオンチャネル YVC1 が存在する。これまでの電気生理学的解析により、YVC1 が K^+、Na^+、Ca^{2+}を輸送し、*yvc1* 欠損酵母ではバックグラウンド電流が大幅に減少することから YVC１が酵母液胞膜の主要な陽イオン輸送体であることが明らかとなっている。さらに YVC1 発現酵母において、細胞質側における Ca^{2+}や還元剤の添加によって YVC1 が活性化することも示してきた。他のグループによって YVC1 の内向き整流性が報告されているが、私たちの研究では、YVC1 による外向き電流を見いだした。本研究では、YVC1 の調節機構と生理的役割の解明のために、巨大化した酵母液胞膜を用いたパッチクランプ法による電気生理学的解析を行った。

【方法・結果】細胞壁除去酵素を用いて処理した一倍体酵母を細胞壁合成阻害剤を添加した培地で培養することによりパッチクランプ法の適用が可能な巨大化酵母を調製した。巨大化酵母を低浸透圧ショックで細胞膜を破裂させることにより、細胞の巨大化に伴って巨大化した液胞を細胞外に露出させ、パッチクランプ電極（ピペット電極）を液胞膜に密接させてチャネル電流を記録した。本実験では、ピペット電極内バッファーが液胞内組成、バス（チャンバー）バッファーが細胞質組成に該当する。液胞内側への5 mM Ca^{2+}添加によるYVC1の活性測定を行ったところ、著しいチャネル活性の低下を確認した。また、細胞質と液胞の両側へのCa^{2+}添加においてもチャネルは活性化されなかった。以上より、液胞内Ca^{2+}による抑制機構は細胞質Ca^{2+}による活性化よりも優位に働くことが判明した。次、YVC1に9つあるシステイン残基をセリン残基に置換した変異チャネルを用いて還元剤によるYVC1チャネルの活性化機構を検討した。これまでに、細胞質側にあるC末端のシステイン残基をセリン残基に置換した変異チャネル（C624S）は還元剤による活性化能を消失していることを報告した。本研究では、N末端に存在する七つのシステイン残基をセリン残基に置換した変異チャネルを用いて還元剤の影響を検討した。その結果、細胞質への1 mM Ca^{2+}添加による活性化は示されたが、還元剤による活性化は見られなかった。さらに、小胞体（ER）の中に正しくフォールディングされなかった異常タンパク質が蓄積するERストレスの誘導剤であるツニカマイシンとCa^{2+}キレート剤であるBAPTAを含む培地で野生型酵母と*yvc1*欠損酵母を培養することにより、YVC1の生理的役割を検討した。その結果、野生型酵母は正常に生育したが、*yvc1*欠損酵母の増殖は著しく阻害された。これらより、YVC1が液胞内のCa^{2+}を細胞質に放出することにより、ERストレスを緩和することが示唆された。

Ion-channel, Yeast, Ca^{2+}

講演番号：2C24p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ C校舎24会場

酵母におけるカフェイン耐性に関与するSnq2pとPdr5pの機能解析

Functional analysis of Snq2p and Pdr5p in caffeine resistance of yeast

○辻本　善之、大竹　一也、渡部　邦彦（京府大　院　生命環境）
○Yoshiyuki Tsujimoto, Kazuya Otake, Kunihiko Watanabe （GSLES, KPU）

【目的】カフェイン（1,3,7-トリメチルキサンチン）は両親媒性プリン誘導体の一種であり、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては cAMP を分解するホスホジエステラーゼや TORC1（target of rapamycin）を阻害することで、さまざまな細胞内情報伝達経路に影響することが知られている。しかし、カフェイン耐性機構に関してはほとんど報告されていない。そこで、出芽酵母での多コピープラスミド（YEp24）を用いてゲノムライブラリーを作製し、カフェイン耐性を賦与する遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、*SNQ2* が多コピーでカフェイン耐性を賦与することが分かった。*SNQ2* には相同性が高い（40% identity a.a.） *PDR5* 遺伝子がある。両者は、PDR サブファミリーに属する ABC トランスポーターをコードし、多剤耐性に関与するが、カフェイン耐性に関する報告はない。そこで本研究では Snq2p と Pdr5p のカフェイン耐性における機能解明を目的とした。

【方法・結果】YEp24-SNQ2 または YEp24-PDR5 を持つ野生株のカフェイン耐性を評価した結果、両株とも耐性を示したが、前者の方がより強いカフェイン耐性を示した。YEp24-SNQ2 または YEp24-PDR5 を持つ *snq2/pdr5* 二重破壊株でも同様の結果が得られた。また両遺伝子の各種破壊株を用いてカフェイン、4-nitroquinoline 1-oxide（4NQO）、clotrimazole（CTZ）に対する薬剤試験を行った。*snq2* 株は野生株と比較してカフェインに対しては同等の耐性を示し、4NQO には顕著な感受性を示し、CTZ にはわずかな耐性を示した。*pdr5* 株は、野生株と比較してカフェインと 4NQO に対してはわずかな耐性を、CTZ には顕著な感受性を示した。一方、*snq2/pdr5* 株は３種いずれの薬剤に対しても顕著な感受性を示した。

次に、YEp24-SNQ2 または YEp24-PDR5 を持つ *snq2/pdr5* 株を用いて、細胞膜（PM）画分を調製し、トランスポーター活性を測定した。調製した PM 画分では、SDS-PAGE 上で、plasma membrane H^+-ATPase（Pma1p）と Snq2p または Pdr5p の２本の主要バンドがそれぞれ観察された。蛍光物質 rhodamine 6G（R6G）の PM 画分内への取り込みによる蛍光強度の減少を測定し、ATP 存在下と ADP 存在下での蛍光強度減少の差を活性とした。Snq2p を含む PM 画分は、Pdr5p を含む PM 画分の約 1/2 程度の活性を示した。また、カフェインは両者のトランスポーター活性を阻害し、その活性を 50% 阻害する濃度（I_{50} 値）は、それぞれ約 1.1 mM （Snq2p）と約 18.4 mM（Pdr5p）であった。

表現型解析やトランスポーター活性におけるカフェインの I_{50} 値から、Snq2p と Pdr5p が酵母のカフェイン耐性に関与し、Snq2p が Pdr5p よりもカフェインに対する特異性が高く、カフェイン耐性により機能していることが示された。

caffeine, ABC transporter, drug

講演番号：2C24p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎24会場

*Saccharomyces cerevisiae*圧力感受性変異株の遺伝子発現プロファイルの解析

Gene expression profile of a *Saccharomyces cerevisiae* barosensitive mutant

○野村 一樹[1]、齋木 朋恵[1]、林 真名歩[1]、林 真由美[1]、木戸 みゆ紀[2]、上野 茂昭[3]、井口 晃徳[1]、重松 亨[1]、岩橋 均[4]、平山 匡男[1,5]、藤井 智幸[1,3]（[1]新潟薬大・応生科、[2]NICO、[3]東北大院・農、[4]岐阜大・応生科、[5]ブルボン）

○Kazuki Nomura[1], Tomoe Saiki[1], Manabu Hayashi[1], Mayumi Hayashi[1], Miyuki Kido[2], Shigeaki Ueno[3], Akinori Iguchi[1], Toru Shigematsu[1], Hitoshi Iwahashi[4], Masao Hirayama[1,5], Tomoyuki Fujii[1,3] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci. , [2]NICO, [3]Tohoku Univ. , [4]Gifu Univ. , [5]Bourbon Co.)

【目的】我々は、圧力処理技術を発酵制御に応用するため、圧力感受性機構の解明を目指して研究を進めている。UV 照射により取得した *Saccharomyces cerevisiae* 変異株 a924E1 は、親株 KA31a と比較して、アルコール発酵能は同等でありながら圧力に対して有意に感受性を示す、発酵制御への応用に適した圧力感受性変異株であることが判明した。変異株の圧力感受性機構を解明するためには、変異遺伝子を特定する必要がある。これまでに行った表現形質の解析により、トレハロース代謝、マルトース代謝、糖新生に関連する遺伝子、また、それらの制御に関連している調節遺伝子への変異導入が示唆された。本研究では、変異株の遺伝子発現プロファイルを親株と比較することで、変異の導入に起因する遺伝子発現の変化と表現形質との関連性を解析した。

【方法・結果】変異株および親株の定常期細胞から total RNA を抽出し、Yeast オリゴ DNA マイクロアレイを用いて 6256 の遺伝子の発現を一色アレイ法により解析した。クオンタイル法によりデータの正規化を行い、両株の遺伝子発現量を比較解析したところ、親株の遺伝子発現量に対し半分以下の値を示した変異株の遺伝子が約 500 確認された。MIPS データベースを用いて遺伝子の機能分類を行ったところ、エネルギー代謝などに分類される遺伝子の発現量が、親株に比べて低くなる傾向が認められた。特に好気呼吸や貯蔵糖の代謝に関連する遺伝子のうち、約 17%の遺伝子の発現量が低い値を示し、表現形質の解析結果を支持した。また、ミトコンドリアのマトリックスに局在するタンパク質をコードする遺伝子のうち、約 20%の遺伝子の発現量が親株に比べて低い値を示した。そこで、TTC 染色性を解析した結果、変異株のミトコンドリアの機能の低下が確認された。以上のことから、好気呼吸および貯蔵糖の代謝機能の低下と圧力感受性との間に関連性が示唆された。同様に、親株の遺伝子発現量に対し 2 倍以上の値を示した変異株の遺伝子を解析したところ、転写やタンパク質生合成の機能に関連する遺伝子が約 600 確認された。特に rRNA やリボソームタンパク質生合成の機能に関連する遺伝子のうち、約 40%の遺伝子の発現量が親株に比べて高い値を示した。また、核小体に局在するタンパク質をコードする遺伝子のうち、約 45%の遺伝子の発現量が親株に比べて高い値を示したことから、変異株では親株に比べてタンパク質の生合成が活発に行われている可能性が示された。本研究の一部は、JST-CREATE の助成により実施した。

Saccharomyces cerevisiae, barosensitivity, DNA microarray

講演番号：2C24p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎24会場

圧力耐性が変化した*Saccharomyces cerevisiae* UV変異株の表現形質の解析

Phenotypic characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* barotolerant mutants obtained by UV mutagenesis

○南波 優[1]、野村 一樹[1]、南須原 悠輔[1]、林 真名歩[1]、木戸 みゆ紀[2]、林 真由美[1]、井口 晃徳[1]、重松 亨[1]、平山 匡男[1,3]、上野 茂昭[4]、藤井 智幸[1,4]
([1]新潟薬大・応生科、[2]NICO、[3]ブルボン、[4]東北大院・農)

○Masaru Nanba[1], Kazuki Nomura[1], Yusuke Nasuhara[1], Manabu Hayashi[1], Miyuki Kido[2], Mayumi Hayashi[1], Akinori Iguchi[1], Toru Shigematsu[1], Masao Hirayama[1,3], Shigeaki Ueno[4], Tomoyuki Fujii[1,4]
([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]NICO, [4]Tohoku Univ., [3]Bourbon Co.)

【目的】我々は、圧力処理技術を食品の発酵制御に応用するために一倍体酵母*Saccharomyces cerevisiae* KA31a株に紫外線照射を行い変異処理株ライブラリーを作製した。その中から、親株に比べて有意に圧力感受性と温度感受性が増加したa924E1株を選択し、圧力感受性機構の解析を進めている[1)]。親株に比べ圧力耐性が増加した変異株を取得し解析することは、圧力応答機構の解明のためだけでなく、高圧力下での発酵プロセスの確立にも応用可能と考えられる。そこで、本研究では圧力耐性変異株の取得を目的とし、新たな変異株の圧力死滅挙動の解析を行った。

【方法・結果】変異処理株ライブラリーからa1210H12株を選択し、圧力死滅挙動を解析した。a1210H12株と親株KA31aに対し異なる圧力条件（処理圧力：200 MPa、225 MPaおよび250 MPa、保持時間：0秒～360秒間）で死滅曲線を作成した結果、親株の死滅挙動は一次反応式で近似でき、1ヒット死モデルに従った。しかし、a1210H12株の死滅挙動は一次反応式では近似できず、多重ヒット死モデルに従うことが判明した。死滅速度定数の比較解析の結果、200 MPa、0秒～120秒の条件ではa1210H12株の圧力耐性が親株よりも高いことが示された。しかし、200 MPa、120秒～360秒および225 MPa、250 MPaの条件ではa1210H12株の圧力耐性が親株よりも低いことが示された。この結果から、a1210H12株に導入された変異は、圧力処理条件により圧力耐性を変化させるユニークなものであることが示唆された。圧力処理した親株およびa1210H12株の生菌数を固体培地を用いたコロニーカウント法および液体培養での生育遅れ解析法により比較した。親株では両者に有意な違いは認められなかったが、a1210H12株に圧力処理を施すとコロニーカウント法に基づく生菌数が、生育遅れ解析法に基づく生菌数よりも処理時間に依存して低くなることが示された。225 MPa、360秒の条件で圧力処理したa1210H12株の生菌数を、マイクロプレート10枚を用いた液体分離培養に基づき算出したところ、生育遅れ解析法による生菌数と一致した。これらのことから、a1210H12株に導入された変異は、圧力処理依存的にコロニー形成能を減少させることが示された。本研究の一部は、JST-CREATEにより実地した。

1) 野村ら 日本生物工学会大会 (2011)

Saccharomyces cerevisiae, barotolerance, UV mutagenesis

講演番号：2C24p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎24会場

遺伝子発現解析とエタノール発酵能に基づく酸耐性酵母の特性評価

Characterization of acids tolerant yeast by the analysis of gene expression and fermentation ability

○灰谷 豊、中村 敏英[1]、安藤 聡[1]、小川 順[2]、島 純（京大・微生物科学、[1]農研機構・食総研、[2]京大院農・応用生命）

○Yutaka Haitani, Toshihide Nakamura[1], Akira Ando[1], Jun Ogawa[2], Jun Shima (Microbial Sci. Kyoto Univ., [1]Natl. Food Res. Inst., [2]Appl. Life Sci. Kyoto Univ.)

【目的】バイオエタノールの発酵生産環境において、酵母は様々なストレスに曝されている。発酵熱による温度上昇、高濃度エタノールの蓄積、巨大タンクがもたらす高圧力、高糖蜜による高浸透圧などが、酵母の発酵能を制限してしまい有効利用を妨げている。また、バイオマスの無菌処理が困難なため、バクテリアの汚染によって発生する酢酸や乳酸などの弱酸ストレスが細胞内酸性化を招き、生育阻害や細胞死を引き起こしている。そこで、自然界から弱酸に対して高度な耐性を持つ酵母をスクリーニングし、酸耐性酵母の開発に必要な遺伝資源の確保に向けて、酵母分離株のプロファイリングを試みた。さらに、新規な弱酸ストレス耐性機構に関与する遺伝子の同定および機能解析を行い、バイオエタノール生産に用いる酵母への応用を目指す。

【方法】酢酸、乳酸、硫酸存在下において、保存菌株や自然界からの分離株を含む約1700株の生育特性を評価した。特に、酢酸に対して高い耐性を示した*Saccharomyces cerevisiae*, NFRI3145株に着目し、酢酸 ストレス環境における生存率、エタノール発酵生産能の特性を評価した。次に、バイオエタノール生産酵母NBRC0224株と酸耐性酵母NFRI3145株を完全培地で対数増殖期中期まで培養し、酢酸添加後に発現量が変化する遺伝子をDNAマイクロアレイで解析した。遺伝子発現プロファイルの比較から、酢酸処理により遺伝子の発現量が2倍以上変化したものを抽出し、データベースを利用して機能カテゴリーごとに分類した。

【結果】酸耐性を有する分離株の中には、*Saccharomyces*属酵母や*Candida*属酵母等が含まれており、単一の酸に対する耐性株に加えて、複数の酸に耐性を有する株が分離された。これらの酸耐性株は遺伝資源として活用可能であると考えられる。特に、*S. cerevisiae*は種々の実用酵母の交雑育種における遺伝資源としての重要性が高い。NFRI3145株は、酢酸ストレス下においてNBRC0224株よりも高い生存率を示した。また、エタノール発酵生産においても、大幅な発酵時間の短縮がみられた。さらに興味深いことに、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、NBRC0224株と比較してNFRI3145株では、鉄イオン輸送や酸化還元に関与する遺伝子の発現が著しく上昇していた。現在、酢酸ストレス耐性機構との関連を解析中である。

Saccharomyces cerevisiae, stress tolerance, weak acids

講演番号：2C24p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ C校舎24会場

7回膜貫通型熱ショックプロテインHsp30pのストレス依存的糖鎖修飾

Stress-responsive *N*-glycosylation of plasma membrane protein Hsp30p in *Saccharomyces cerevisiae*

○高畠暁子、加茂研一[1]、井上善晴[1]、井澤真吾（京都工繊大・応生、[1]京大院農・応生科）

○Akiko Takabatake, Ken'ichi Kamo[1], Yoshiharu Inoue[1], Shingo Izawa (Div. Appl. Biol., Kyoto Inst. Technol., [1]Div. Appl. Life Sci., Kyoto Univ.)

【目的】出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*のHsp30pは、7回膜貫通型の熱ショックプロテインであり、熱ショックストレス以外にもエタノールや酢酸、グルコース枯渇などのストレスによって発現が誘導される。また、Hsp30pのN末端のシグナルペプチド領域内には、*N*-型糖鎖付加のモチーフと一致する配列Asn^{2}-Asp^{3}-Thr^{4}が存在する。しかし、Hsp30pが実際に糖鎖修飾を受けるのか、あるいは細胞膜上での局在状態などのタンパク質レベルについての情報は限定的である。そこで、Hsp30pの糖鎖修飾の有無や、糖鎖修飾がHsp30pの機能に及ぼす影響を中心に解析をおこなった。

【方法】GFPおよびFLAGタグをC末端に付加したゲノム組込み型Hsp30p発現プラスミドを構築した。*N*-型糖鎖付加モチーフ内のAsn^{2}をGlnに置換した$Hsp30p^{N2Q}$発現プラスミドも同様に構築した。ストレス条件下におけるタンパク質レベルや糖鎖修飾状態はWestern blot解析により、Hsp30p-GFPの細胞内局在は蛍光顕微鏡解析により検討した。また、Hsp30pの糖鎖修飾の生理的意義については、熱耐性への影響を比較することで検討した。

【結果】Hsp30pは28˚Cではほとんど検出されなかったが、各種のストレス処理によってHsp30pレベルの上昇が観察され、ストレスによる発現の誘導が確認された。37˚Cでの熱ショックやグルコース枯渇条件でのWestern blot解析では、Hsp30pのバンドは1本しか検出されなかったのに対し、42˚C前後のシビアな熱ショックストレスを与えた場合には、高分子量側にも新たなバンドが検出された。$Hsp30p^{N2Q}$では高分子量側のバンドが検出されなくなったこと、さらにツニカマイシンやEndo H処理によって高分子量側のバンドは消失したことから、シビアな熱ショックストレス条件下では*N*-型糖鎖がHsp30pに付加されていることが明らかとなった。Hsp30p-GFPは多数の小さなドットを形成しながらplasma membrane上に局在した。そこで、Hsp30pの細胞内輸送や局在に及ぼす糖鎖修飾の有無の影響を検討したが、有意な差は確認されなかった。しかし、糖鎖修飾を受けない$Hsp30p^{N2Q}$を発現する株は、野生株と比較して43˚Cや44˚Cの熱ショックストレスに対して高い感受性を示したことから、高温条件下での糖鎖修飾がHsp30pの機能に何らかの影響を与えることが示唆された。

Hsp30, stress response, N-glycosylation

講演番号：2C24p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎24会場

出芽酵母の膜マイクロドメインにおけるストレス応答

Stress response in the plasma membrane microdomains of *Saccharomyces cerevisiae*

○渡邉太史, 井澤真吾 (京工繊大院工芸科・応生)
○Takafumi Watanabe, Shingo Izawa (Div. Appl. Biol., Kyoto Inst. Technol.)

【目的】細胞膜には多くのストレスセンサーやシグナルトランスデューサーが局在し、外界の環境変化やストレスを速やかに感知し、適切な応答を誘導する上で極めて重要な場所である。出芽酵母の細胞膜上には MCP (membrane compartment of Pma1p)、MCT (membrane compartment containing TORC2)、 MCC (membrane compartment of Can1p)という 3 つの膜ドメインの存在が知られているが、それぞれの機能や制御機構などについては不明な点が多い。今回、MCC を中心に膜マイクロドメインにおけるストレス応答について検討した。
【方法】マイクロドメインの構成因子にGFPあるいはmRFPを融合したゲノム組込み型の発現プラスミドを構築し、各種ストレス条件下におけるマイクロドメインの形態変化を観察した。さらに、Western blot解析によって各ドメイン構成因子のタンパク質レベルの変動を解析した。
【結果】顕微鏡解析の結果、高浸透圧ストレスに応答してMCCドメインの構成因子であるCan1pが凝集して細胞膜上に肥大化したfociを形成することを見出した。MCCドメインはpermeaseであるCan1p (arginine permease)、Tat2p (tryptophan permease)、Fur4p (uracil permease)およびeisosome構成因子であるPil1pやSur7pなどによって形成されているが、Can1p以外のMCCドメイン構成因子についても高浸透圧ストレスによる凝集と肥大化したfociの形成が確認された。一方、熱ショックなどの他のストレス条件下ではMCCドメイン構成因子の凝集は誘導されず、肥大化したfociは観察されなかった。エルゴステロール合成能を欠く*erg6*Δ株では高浸透圧ストレスによるfociの肥大化が強く抑制されたことから、MCCドメイン構成因子の凝集には特定のステロールが必要とされることが示唆された。次にMCCドメイン構成因子のエンドサイトーシスについて調べたところ、高浸透圧ストレス条件下ではCan1pのエンドサイトーシスが遅延することを見出した。同様の現象はTat2pやFur4pについても確認された。これまでに、MCCドメインではエンドサイトーシスが生じないことが示唆されている（*J. Cell Biol.* (2008) **183**, 1075-1088; *J. Cell Sci.* (2011) **124**, 328-337）。このことから、Can1pなどの凝集とエンドサイトーシスの遅延との間に何らかの関連性があると考えられた。

Microdomains, stress response, plasma membrane

講演番号：2C24p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ C校舎24会場

熱ショック/エタノール複合ストレスにおける酵母mRNP granulesの形成

Formation of yeast mRNP granules under heat shock/ethanol combined stress

○山本 陽佑、岩城 理、加藤 健太、井澤 真吾（京工繊大・応生）
○Yosuke Yamamoto, Aya Iwaki, Kenta Kato, Shingo Izawa (Div. Appl. Biol., Kyoto Inst. Technol.)

【目的】周囲の環境変化に応答して遺伝子発現を調節することは細胞の生存戦略において極めて重要である。真核細胞では、ある種のストレス条件下で翻訳抑制が起こり、非翻訳状態のmRNAとタンパク質から成るmRNP granulesが細胞質に形成される。主なmRNP granulesとしては、mRNAの分解に関わるタンパク質などから構成されるprocessing body (P-body)と翻訳開始因子(eIF)やpoly(A)結合タンパク質などから構成されるstress granule (SG)が知られており、それぞれ非翻訳状態のmRNAを含む膜を持たない構造体である。P-bodyとSGはストレス条件下での翻訳制御やストレス除去後の翻訳再開において重要な役割を担うと考えられているが、その形成機構や機能については不明な部分も多く残されている。我々は出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*のP-bodyとSGについて研究を進めており、これまでにエタノールストレスで誘導されるSGは、熱ショックストレスによって誘導されるSGと組成が一部異なることを見出している。今回、熱ショックとエタノールの複合ストレスがmRNP granulesの形成や翻訳に与える影響について検討した。
【方法】単独では比較的なマイルドな熱ショックストレスとエタノールストレスの条件を組み合わせて酵母細胞を処理し、mRNP granules形成や翻訳に及ぼす影響を解析した。
【結果】熱ショック(46˚C)で誘導したSGには翻訳開始因子eIF3サブユニットが含まれていたが、10% (v/v) エタノールストレス単独で誘導したSGには含まれていなかった。一方、5%エタノールストレスや37˚C熱ショックをそれぞれ単独で細胞に与えた場合にはP-bodyとSGの形成は誘導されなかったが、両者を同時に与えるとP-bodyとSGが顕著に形成された。また、このとき形成されたSGにはeIF3サブユニットが含まれていた。さらに、単独のストレス処理の場合と比較して、複合ストレス条件下では翻訳が強く抑制されることが、ポリソーム解析から確認された。一方、37˚Cという比較的弱い熱ショックストレスでの前処理によって、より高温のストレスに対する耐性が上昇する適応現象(adaptation)がよく知られている。今回、細胞を37˚Cで前処理した後に複合ストレス処理を行ったところ、前処理無しの場合と比較してmRNP granules形成の有意な減少が観察された。このことから、マイルドな熱ショックによるadaptationの誘導がmRNP granules形成や翻訳にも影響すると考えられた。

P-body, stress granule, polysome analysis

講演番号：2C24p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎24会場

乳酸ストレスに応答した酵母mRNP granulesの形成と翻訳制御

Formation of the yeast cytoplasmic mRNP granules and translational regulation in the response to lactic acid stress

○岩城 理、山本 陽佑、加藤 健太、井澤 真吾（京都工繊大・応用生物）
○Aya Iwaki, Yosuke Yamamoto, Kenta Kato, Shingo Izawa (Div. Appl. Biol., Kyoto Inst. Technol.)

【目的】真核細胞では様々なストレスに応答してcytoplasmic processing bodies (P-body)やstress granules (SG)と呼ばれるmRNP granulesの形成が誘導される。P-bodyやSGはリボソームから遊離した非翻訳状態のmRNAとRNA分解装置や翻訳開始因子などのタンパク質から構成される膜構造を持たないmRNA-タンパク質複合体である。これらのmRNP granulesはストレス条件下での翻訳制御やmRNAの分解・貯蔵において重要な役割を担っていると考えられているが、その形成制御機構や生理的役割については大部分が未解明のままである。一方、乳酸は酒類醸造や製パンなどの発酵食品製造に深く関わる有機酸の一つであるが、酵母の乳酸ストレス応答機構についても不明な点が多く残されている。今回、乳酸をはじめとする酸ストレスが酵母*Saccharomyces cerevisiae*のmRNP granules形成に及ぼす影響について検討を行った。
【方法】P-bodyやSGの構成因子にGFPあるいはmRFPを融合したゲノム組込み型の発現プラスミドを構築し、各種酸ストレス条件下におけるmRNP granulesの形成を観察した。さらに、ポリソーム解析によって酸ストレスが翻訳に与える影響を解析した。
【結果】これまでの解析から、乳酸ストレス条件下でP-bodyの形成が誘導されることを見出した。一方、SGの形成は乳酸によって誘導されなかった。また、乳酸を除去するとすみやかにP-bodyが減少・消失することやシクロヘキシミド処理によってその形成が阻害されたことから、P-body形成がリボソームからのmRNAのリリースに依存した可逆的な応答であることを確認した。さらにポリソーム解析の結果から、乳酸ストレス条件下ではポリソームの形成が阻害され翻訳が抑制されることが明らかとなった。また、乳酸を除去したときには翻訳抑制の解除に先立ってP-bodyの消失が誘導された。硫酸ストレスによっても乳酸同様にP-bodyの形成のみが誘導されたが、プロピオン酸や酢酸の存在下ではごくわずかなP-body形成しか確認されなかった。現在、培地中のpHや翻訳抑制との関連を中心に、各種酸ストレスがmRNP granules形成に及ぼす作用機構について解析を行なっている。

P-body, stress granule, lactic acid

講演番号：2C24p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ C校舎24会場

酵母stress granuleの分解に関与する因子の探索と解析

Study on the factors that regulate the disassembly of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*

○加藤健太、岩城理[1]、山本陽佑、井澤真吾（京工繊大院・応用生物、[1]京工繊大・応用生物）
○Kenta Kato, Aya Iwaki, Yosuke Yamamoto, Shingo Izawa (Div. Appl. Biol., Kyoto Inst. Technol.)

【目的】Stress granules (SG)はリボソームから遊離した非翻訳状態のmRNAと翻訳開始因子などのタンパク質から構成される膜構造を持たないmRNA-タンパク質複合体である。SGはストレス条件下でその形成が誘導され、翻訳制御やmRNAの分解・貯蔵において重要な役割を担っていると考えられている。我々はこれまでに、SG形成が抑制される変異株では高濃度エタノールストレスからの回復が不十分であり、ストレスからの迅速な回復にSG形成が寄与することをあきらかにしている(Kato *et al*. (2011) *Yeast*, **28**, 339)。しかし、SGの形成や分解機構については非常に限られた情報しかないのが現状である。そこで新たな知見を得るために、ストレス軽減時におけるSGの分解に関与する因子の探索と解析をおこなった

【方法】ホ乳動物のSG分解においてGrb7が重要な役割を担うことが報告されている(Tsai *et al*. (2008) *EMBO J.*, **27**, 715)。この情報を基に、酵母におけるSG分解に関連する候補因子をリストアップした。これらの候補因子にGFPを融合したゲノム組込み型の発現プラスミドを構築し、様々なストレス条件下やストレス除去時の細胞内局在を検討した。また、SGの形成や分解に対する影響について、遺伝子破壊株を用いて検討した。

【結果】候補因子の一つSdr1 (SG-disassembly regulation factor 1)は、グルコース枯渇下で細胞質内にfociを形成し、cytoplasmic processing body構成因子であるDhh1のfociと共局在を示した。さらに、Sdr1のfociはストレスの有無に応答し可逆的に形成されるが、分解についてはDhh1のfociよりも迅速に行われた。また、興味深いことに、Sdr1欠損株ではストレス除去時にみられるSGの消失に遅れが生じることを見出した。このことから、Sdr1はストレス除去時におけるSGの分解に何らかの重要な役割を担っている可能性が示唆された。現在、ストレス除去時のポリソーム再形成に対するSdr1欠損の影響を解析中である。

mRNA flux, stress granule, P-body

講演番号：2C24p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ C校舎24会場

ストレス応答性リボヌクレアーゼRny1pの機能解析

Functional analysis of yeast ribonuclease Rny1p involved in stress tolerance.

○ 大石 早希子、大本 哲也、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東大院農生化・応生工）
○ Sakiko Oishi, Tetsuya Omoto, Tetsuhiro Ogawa, Makoto Hidaka, Haruhiko Masaki (Dept. of Biotech., Univ. of Tokyo)

【目的】近年、様々な生物種において、ストレスへの曝露により、細胞内にtRNAの切断片が蓄積することが報告されている。出芽酵母では、RNase T2ファミリーに属するリボヌクレアーゼであるRny1pが、種々のストレスに応答してtRNAを切断することが分かった。RNase T2型リボヌクレアーゼは生物に普遍的に存在し、多くは分泌型であるが、生理機能については大部分が不明である。*RNY1*を破壊した出芽酵母株では、高温や浸透圧ストレスに対して感受性となることから、Rny1pがこれらストレスへの耐性に寄与すると考えられるが、その分子機構は明らかにされていない。そこで、本研究ではRny1pが宿主酵母細胞にストレス耐性を付与する分子機構の解明を目指して実験を行った。

【方法及び結果】BY4742株（α型）の野生株および*RNY1*破壊株を、高温ストレスである37℃で培養し、30℃での生育と比較した。その結果、野生株は37℃でも30℃培養時と同程度の生育を示したが、*RNY1*破壊株では 37℃での生育は著しく阻害された。また、新たにRny1pが低温ストレスおよび酸化ストレスに対しても機能することが分かった。これらのストレスは細胞のタンパク合成を阻害することから、Rny1pはストレスによるタンパク合成阻害に対して機能すると予想した。そこで、可逆的阻害剤であるシクロヘキシミドを用いて一過的にタンパク合成を阻害し、シクロヘキシミドを除去した後、生育曲線を追跡した。その結果、*RNY1*破壊株は、野生株に比べて対数増殖に入るまでの時間が遅延することが分かった。Rny1pによるtRNA切断は、ストレスに依存したタンパク合成阻害に対する防御反応であることが示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, RNase, stress

講演番号:2C24p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ C校舎24会場

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 によるストレス下での原形質膜タンパク質の品質管理機構

Rsp5-mediated quality control of plasma membrane proteins under stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*

○清水 優子、鈴木 悦子、佐々木 俊弥、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Yuko Shimizu, Etsuko Suzuki, Toshiya Sasaki, Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は発酵生産過程で高温、高濃度エタノール、高浸透圧、冷凍、乾燥など様々なストレスに曝されながら、有用機能を発揮している。しかし、長期間のまたは複合的なストレスによって、多くの細胞内タンパク質は変性し、異常タンパク質として蓄積するため、生育阻害や細胞死が引き起こされる。したがって、酵母の有用機能を維持するためにはストレス耐性の向上が課題である。我々は酵母のストレス防御機構の解明と産業酵母の育種への応用を目的に研究を進めており、これまでに Rsp5 が酵母のストレス耐性に関与していることを報告してきた。Rsp5 は酵母の HECT 型ユビキチンリガーゼの内、唯一生育に必須のタンパク質であり、多様な生命現象に関与している。Rsp5 が担う重要な機能の一つにエンドサイトーシスがある。例えば、原形質膜上のアミノ酸パーミアーゼ Gap1 は、アンモニウムイオンのような利用しやすい窒素源が存在すると、Rsp5 によるユビキチン化を受けた後、エンドサイトーシスを経て液胞で分解される。我々は、ストレス下で生じる異常タンパク質のうち、原形質膜上のものに関しては Rsp5 を介した経路で除去され、そのことがストレス耐性に重要であるという仮説を立てている。そこで本研究では、Gap1 をモデル基質としてストレス下における Rsp5 の機能を解析し、原形質膜タンパク質の品質管理機構を検証することを目的とした。
【方法と結果】ストレスに伴う Gap1 のエンドサイトーシスを解析するため、エタノール添加後、経時的に GFP を融合した Gap1 の細胞内局在を観察した。その結果、野生株ではエタノールを添加した直後から Gap1 が積極的に液胞へ輸送されていたが、Rsp5 変異株、エンドサイトーシス経路欠損株、非ユビキチン化型 Gap1 発現株では原形質膜から液胞への輸送が遅延していた。また、エタノールストレスによる Gap1 の変性を確認するため、Gap1 がシトルリンを透過する唯一のパーミアーゼであることを利用し、放射性同位元素でラベルしたシトルリンの細胞内への取り込み量を測定し、Gap1 活性を算出した。その結果、エタノール存在下で Gap1 の活性は顕著に低下しており、Gap1 が変性している可能性が考えられた。以上の結果から、エタノールストレスに伴い変性した原形質膜タンパク質が Rsp5 依存的に液胞へ輸送され、分解される品質管理機構の存在が示唆された。変性した原形質膜タンパク質をユビキチン化する機構には、１）ストレスのシグナルによって Rsp5 が活性化される、２）変性した Gap1 を Rsp5 が選択的にユビキチン化する、３）上記２つが複合的に起こる可能性が考えられる。現在、これらの可能性を検証する目的で、エラープローン PCR によって Gap1 遺伝子にランダム変異を導入したライブラリーを作製し、Gap1 の高温感受性変異体の取得を目指している。

ubiquitin ligase Rsp5, ethanol stress, general amino acid permease Gap1

講演番号：2C24p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ C校舎24会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 のリン酸化/脱リン酸化に関わる酵素の探索

Search for kinase/phosphatase involved in phosphorylation/dephosphorylation of the HECT-type ubiquitin ligase Rsp5 in *Saccharomyces cerevisiae*

○山下　由貴、佐々木　俊弥、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Yuki Yamashita, Toshiya Sasaki, Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はパン類、酒類、バイオエタノール等の発酵生産過程で様々なストレスに曝されており、有用機能の発現が制限されている。これまでに我々は、HECT 型ユビキチンリガーゼの一つで、唯一生育に必須である Rsp5 が酵母のストレス耐性に関与することを見出し、その分子機構を解析している。一方、Rsp5 は原形質膜タンパク質のエンドサイトーシスに関与することが知られており、Rsp5 による標的タンパク質のユビキチン化が引き金となる場合が多い。原形質膜上のアミノ酸パーミアーゼ Gap1 はアンモニウムイオンのような利用しやすい窒素源が存在する時やエタノールストレス下において、Rsp5 によりユビキチン化されエンドサイトーシスを経て、液胞で速やかに分解される。Rsp5 が関与するこの経路が欠損すると酵母の生存率が低下することから、ストレス耐性においても重要な機構であると考えられる。しかしながら、Rsp5 の活性そのものはどのように制御されているかは未だ明らかになっていない。我々は最近、Rsp5 の基質認識ドメイン内の Thr357 がリン酸化されること、およびこの残基がリン酸化/脱リン酸化されることによって Rsp5 の活性が制御されている可能性を見出した。そこで本研究では、Rsp5 の活性制御機構を解明すること目的として、Thr357 のリン酸化/脱リン酸化に関わる酵素（kinase/phosphatase）の同定を試みた。

【方法と結果】酵母の非必須遺伝子破壊ライブラリーから、kinase 遺伝子破壊株を 141 株、phosphatase 遺伝子破壊株を 70 株、それぞれ選抜した。我々が分離した *rsp5*^{T357A} 変異株では、プロリンを取り込む Gap1 が恒常的にユビキチン化され、液胞で分解されるため、プロリンの毒性アナログであるアゼチジン-2-カルボン酸（AZC）に対して耐性を示す。このアミノ酸置換（T357A）は脱リン酸化状態をミミックしているため、Rsp5 のリン酸化を行う kinase の遺伝子破壊株も同様の表現型を示すと予想される。一方、Rsp5 の脱リン酸化を行う phosphatase の遺伝子破壊株は AZC 感受性になると考えられる。そこで、AZC に対する表現型を指標に一次スクリーニングを行った。具体的には候補株を液体培養後、384 ウェルマイクロプレートから AZC 含有最少寒天培地にスタンプし、AZC に対する表現型を野生株と比較した。得られた候補株について、AZC 含有最少寒天培地にスポットし、二次スクリーニングを行った。一次スクリーニングの結果、AZC に耐性を示す株として kinase 遺伝子破壊株から 2 株、phosphatase 遺伝子破壊株から 5 株を取得した。計 7 株の破壊株を用いて二次スクリーニングを行い、AZC に耐性を示す 2 株の kinase 遺伝子破壊株、感受性を示す 2 株の phosphatase 遺伝子破壊株を取得した。現在、Rsp5 との関連性など詳細な解析を行っている。

Ubiquitin ligase, Rsp5, phosphorylation

講演番号：2C24p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ C校舎24会場

エリスリトール生産酵母*Trichosporonoides megachiliensis*におけるMAPK Hog1の浸透圧ストレス応答に関わる機能解析

Osmoregulatory function of MAPK Hog1 from *Trichosporonoides megachiliensis*, erythritol producing yeast

○吉田　潤次郎、小山　善幸[1]、荻原　淳[1]、加藤　順[1]、春見　隆文[1]、島　純[2]（日大院生資科・生資利用、[1]日大・生命化、[2]京大・微生物科学）

○Junjiro Yoshida, Yoshiyuki Koyama[1], Jun Ogihara[1], Jun Kato[1], Takafumi Kasumi[1], Jun Shima[2] (Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ, [1]Dept. Chem. Life. Sci., Nihon Univ, [2]Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ)

【目的】高糖濃度環境下より分離された担子菌系酵母、*Trichosporonoides megachiliensis*は、適合溶質として糖アルコールであるエリスリトールを細胞内に蓄積することで高い浸透圧に抵抗し、生存を可能としている。エリスリトールはノンカロリー甘味料などとして利用され、化学合成ではなく好気醗酵によってのみ生産されており、国内では唯一、*T. megachiliensis*を利用した工業生産が行われている。

浸透圧ストレスに応答して蓄積される適合溶質は、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*の、解糖系を介したグリセロールが最もよく知られている。*S. cerevisiae*におけるグリセロールが解糖系から生合成されるのに対して、*T. megachiliensis*におけるエリスリトールはペントースリン酸経路を経て生合成されるが、同時にグリセロールも生産しており、ペントースリン酸経路と解糖系をどのようにして調節しながら適合溶質を生産しているのか、その代謝機構は解明されていない。このため、*T. megachiiensis*における、浸透圧ストレス応答機構において中心的な役割を持つMAPK Hog1の機能を明らかにすることは、生成経路を代謝工学的に制御し、エリスリトール生産能を向上させる目的において重要である。

【方法・結果】*T. megachiliensis* SN-124Aより単離したMAPK *Hog1*ホモログ(*TmHog1*)及び*TmHog1*と*S. cerevisiae*由来*Hog1*(*ScHog1*)とのキメラ遺伝子を*S. cerevisiae Hog1*破壊株に遺伝子導入し、遺伝子導入株の浸透圧ストレス応答能を検討することでTmHog1のScHog1との浸透圧応答における機能的相同性および配列に依存した特性を検討した。これまでに、他の生物と高い相同性を示した*TmHog1*を単離した。*TmHog1*及び*TmHog1*と*ScHog1*のキメラ遺伝子を*S. cerevisiae Hog1*破壊株に遺伝子導入したところ、浸透圧耐性能が復帰した。浸透圧ストレスに応答して蓄積する菌体内グリセロール含量は、*ScHog1*を相補した遺伝子を導入したいずれの株においても*Hog1*破壊株と比較し、著しく高い値を示した。このことから、細胞内に蓄積する適合溶質が全く異なる生物間においても、そのストレスシグナルの伝達機構は非常に共通性が高いことが明らかになった。さらにTmHog1及びTmHog1のC末端を持つキメラ遺伝子導入株の菌体内グリセロール含量がScHog1導入株よりも明らかに高い結果となったことから、Hog1のC末端領域に、浸透圧ストレスに応答した核内移行を司る重要な配列があることが示唆された。

HOG1, signal transduction, Osmotic stress

講演番号：2C25p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ C校舎25会場

プラスミドが宿主に与える負荷が軽減された自然変異株の単離と解析

Isolation and characterization of the mutants having decreased plasmid fitness costs

○能登 優、高瀬 識之、高橋 裕里香、山根 久和、野尻 秀昭（東大・生物工学セ）
○ Suguru Noto, Noriyuki Takase, Yurika Takahashi, Hisakazu Yamane, Hideaki Nojiri (Biotechnology Research Center, The University of Tokyo)

【目的】可動性遺伝因子であるプラスミドは、様々な形質を宿主に付与する一方、宿主にとって生育負荷になるという報告例が古くより知られている。本研究では、プラスミドの環境中での生き残りや水平伝播の集団内での意義を考える観点から、プラスミド保持株の“集団中での生き残り”という現象に着目し、プラスミドの負荷が軽減された自然変異株の単離と解析を目的とした。
【手法・結果】IncP-7群プラスミドpCAR1は全塩基配列決定済みで、主に*Pseudomonas*属細菌を宿主とする自己伝達性プラスミドである。昨年度までに*Pseudomonas putida* KT2440株のpCAR1保持株と非保持株を混合後、コハク酸を唯一の炭素源とする液体培地で継代培養すると、144 時間（5回の継代培養）後に、保持株が集団の0.1%以下まで淘汰されることが明らかになっていた。

本年は、まず、特殊な誘導条件下でのみカナマイシン（Km）耐性を宿主に付与する遺伝子カセットをpCAR1上に挿入し、選抜用プラスミドpCAR1PKを作製した。次に、自然変異の蓄積により淘汰されにくいプラスミド保持株の取得を試みた。pCAR1PK保持株を非保持株と混合し5回の継代培養を行った後、系内に残るpCAR1PK保持株のみをKm耐性遺伝子を発現させて効率的に選抜し、新たにpCAR1非保持株との混合培養を行う過程を5 cycle繰り返した（図１）。その結果、非保持株との混合培養144 時間後に淘汰を受けず、逆に集団の90%以上まで優占化するa501株、a502株を単離した（図２）。独立した同様の実験から、さらに自然変異株b501株、b502株も取得された。現在、親株と自然変異株の間でプラスミドと宿主染色体の入れ替えを行った株の淘汰されやすさを測定することで、プラスミドと宿主染色体どちらの変異が負荷に重要かの特定を試みている。

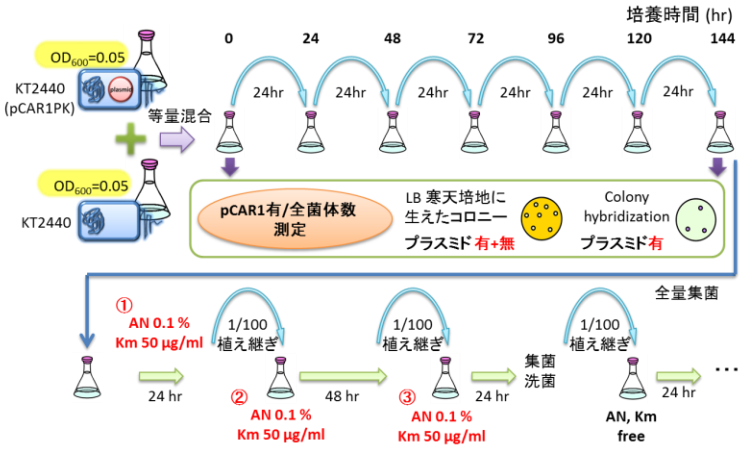


図 1: 淘汰を受けにくい自然変異株の取得

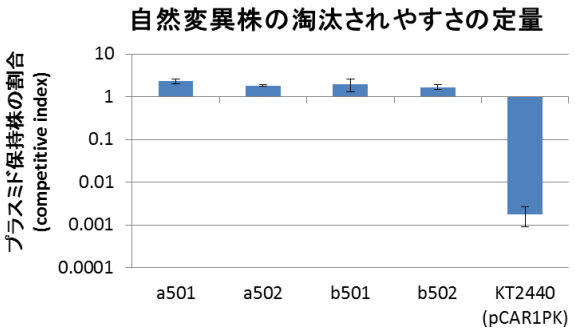


図 2: 自然変異株の淘汰されやすさの評価
縦軸は 144 時間後のプラスミド保持株の菌体比率を初期菌体比率で除した値。

fitness cost, *Pseudomonas*, plasmid

講演番号：2C25p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ C校舎25会場

プラスミドの負荷を軽減する新規遺伝因子の探索

Screening and characterization of factors which attenuate fitness costs of *Pseudomonas* host strains imposed by carbazole degradative plasmid pCAR1

○高瀬 識之、能登 優、高橋 裕里香、松本 貴嗣[1]、吉川 博文[1]、土金 恵子[2]、細山 哲[2]、藤田 信之[2]、山根 久和、野尻 秀昭（東大・生物工学セ、[1]東農大・生物資源ゲノム解析セ、[2]NITE）

○Noriyuki Takase, Suguru Noto, Yurika Takahashi, Takashi Matsumoto[1], Hirofumi Yoshikawa[1], Keiko Tsuchikane[2], Akira Hosoyama[2], Nobuyuki Fujita[2], Hisakazu Yamane, Hideaki Nojiri (Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [1]NODAI Genome Research Center, Tokyo University of Agriculture, [2]NITE)

【目的】移動性遺伝因子であるプラスミドは難分解性物質分解能、多剤耐性能といった様々な形質を宿主に付与する一方、宿主にとって生育負荷ともなり得ることが古くより知られている。この原因は、漠然と転写量・翻訳量の増加による生育速度の減少に求められることが多いが、プラスミド保持による生育速度の減少が生育負荷の増加と一致しない例も知られており[1)]、プラスミド保持株の集団内での振る舞いを知る上でも詳細な解明が望まれる。この解明を目的に、我々はプラスミド保持株の非保持株との競合試験を実施し解析してきた。*Pseudomonas putida* a501株、a502株、b501株、b502株は、*P. putida* KT2440株とカルバゾール分解プラスミドpCAR1PKを保持するKT2440(pCAR1PK)株をコハク酸を唯一の炭素源とする液体培地で混合培養し、pCAR1PK保持株を選抜しながら約350世代共培養することで取得された自然変異株である。親株であるKT2440(pCAR1PK)株はKT2440株と混合して144時間（5回の継代）培養を行うことで集団中の0.1％まで淘汰されてしまうのに対し、a501株、a502株は同様の実験により集団中の90％以上（下図）、b501株、b502株は同様の実験により集団中の60 %以上まで逆に優占化する。また、a501株とa502株、b501株とb502株はそれぞれ独立の競合試験において単離されたため、異なる自然変異の蓄積が期待される。そこで、KT2440(pCAR1PK)株と自然変異株4株の全塩基配列を解読し変異点を同定することで、pCAR1PK保持株が淘汰される過程で重要な因子の同定を行った。

【方法と結果】KT2440(pCAR1PK)株と、4株の自然変異株からそれぞれ全DNAを抽出し、Illumina社 Hi-SEQ1000を用いて各ゲノムの配列データを取得した。現在、得られた配列情報を、KT2440株とpCAR1のゲノム配列に対してマッピングしており変異点の検出を行っている。発表では、それら変異により破壊された遺伝子などの機能について紹介し、プラスミドの負荷との関連性について議論する。

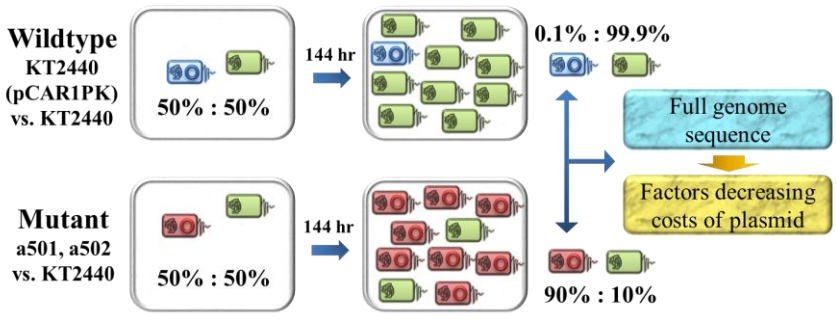


図: 本研究計画の流れ

1) 高瀬ら、日本農芸化学会2010年度大会2ASa07

plasmid, fitness cost, *Pseudomonas*

講演番号：2C25p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ C校舎25会場

Lactobacills delbrueckii の伸長細胞の構造解析

Structural analysis of the elongated cells of *Lactobacillus delbrieckii*

○石塚 和子[1]、稲葉 達也[1]、田中 尚人[2]、佐藤 英一[1]、岡田 早苗[1]（[1]東農大応生科・化学、[2]東農大・菌株）

○Kazuko Ishizuka[1], Tatsuya Inaba[1], Naoto Tanaka[2], Eiichi Satoh[1], Sanae Okada[1]

([1]Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr., [2]NRIC, Tokyo Univ. Agr.)

【目的】*Lactobacillus delbrueckii* はビタミンB_{12}に高い要求性を持ち、V.B_{12}が不足すると細胞が伸長するという興味深い現象が起こる。1966年北原により、本種がV.B_{12}の欠乏した環境下では生育は著しく弱まり細胞の増殖はほとんど見られず、通常5μm程度の細胞が、その数倍から数十倍の長さへと伸長すると報告された。さらに北原は、伸長細胞では、隔壁は無いが、原形質分離した際に細胞膜に取り囲まれた原形質が複数連なって形成すると報告した。このことから伸長細胞は、隔壁はないが細胞膜単位での分裂は行われていると考えられた。

そこで、本研究では、本種の生育機構の研究の一つとして、通常細胞と伸長細胞の構造解析を中心にその特徴を比較し、本菌種の細胞伸長現象を明らかにしていくことを目的とした。

【方法】基礎培地として、V.B_{12}定量用培地を用いた。V.B_{12}を終濃度１μg/ml の濃度で添加し、37℃で静置培養した細胞を通常細胞(細胞長10μm未満)とし、V.B_{12}無添加・同条件で培養した細胞を伸長細胞(細胞長 10μm 以上)とした。伸長細胞の構造的特徴を明らかにするため、以下の顕微鏡を用いて観察した。電子顕微鏡では通常細胞と伸長細胞の全体的な表層構造や、内部の微細構造などを観察し、蛍光顕微鏡では、細胞膜分裂面の確認、核様体の複製及び分配、ペプチドグリカン(PG)合成点に注目して観察を行い、通常細胞と伸長細胞の細胞構造の比較を行なった。また、細胞分裂関連の遺伝子について、RT-PCR 法を用いて発現解析を行なった。

【結果】V.B_{12}の欠乏により伸長した細胞を、V.B_{12}添加の培地に移すことで細胞の増殖が確認されたことから、伸長細胞は死滅していないということが確認された。電子顕微鏡観察では、伸長細胞の表層構造などが明確になったのとともに、細胞壁の厚さが不均一であり、内部構造についても変化が認められた。蛍光顕微鏡観察では、細胞膜単位での分裂が起きていないことが示唆され、また、核様体の複製及び分配も起きていないことが確認された。一方で細胞伸長点は通常と同様に中心のまま合成自体は行われており、細胞の伸長は進行していたことから、*L. delbrueckii* のこの細胞伸長は、分裂の機能は停止しているが、細胞壁合成機構は停止しないという、分裂調節系がアンバランスな状態にあることに起因する現象であることが考えられた。

そこで分裂関連遺伝子として知られる*ftsZ*, *mreB*, *divIVA* の発現解析を行なったが、通常細胞、伸長細胞ともに発現が確認された。このことから、これら遺伝子の転写ではなく、コードしているタンパク質や、その他の調節因子の変化が細胞伸長に影響していると考えられた。

Lactobacillus delbrueckii, Cell division, Morphology

講演番号:2C25p05
講演日時、会場:3月23日14:33～ C校舎25会場

Lactobacillus delbrueckii の TMP 合成に与えるビタミン B_{12} の影響

Effects of Vitamin B_{12} on TMP synthesis by *Lactobacillus delbrueckii*.

○林 徳彦、西前 七緒、田中 尚人[1]、佐藤 英一、岡田 早苗（東農大応生科･化学、[1]東農大･菌株）

○Norihiko Hayashi, Nao Nishimae, Naoto Tanaka[1], Eiichi Satoh, Sanae Okada (Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr., [1]NRIC, Tokyo Univ. Agr.)

【目的】*Lactobacillus delbrueckii* は非常に栄養要求の厳しい乳酸菌であり、ビタミンB_{12}($V.B_{12}$)を必須要求することが知られている。さらに本菌種の亜種の一つであり、長野県木曽地方の発酵食品「すんき」などから分離された *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* は $V.B_{12}$ 欠乏時には分裂･増殖しないことに加え、その細胞が通常の 2～10 倍程に伸長する事が報告されている。当研究室においても $V.B_{12}$ と本菌の関係についての研究が行われ、$V.B_{12}$ は thymidine monophosphate(TMP) 合成に関与している可能性が示唆された。加えてゲノム情報から本菌は他の多くの乳酸菌が持つ葉酸を含む経路だけでなく thymidine kinase(TK) を介する経路という二種類の TMP 合成経路を保持していることが明らかとなっており、さらにこの TK を介する経路は $V.B_{12}$ 依存的である事が示唆された(1)。

乳酸菌を含む原核生物において $V.B_{12}$ の作用機序は未知の点が多く、生育に $V.B_{12}$ を必須要求する本菌と $V.B_{12}$ の関係について研究する事は大変興味深い。そこで本研究では$V.B_{12}$ 欠乏時に変化が生じることが示唆されている *L. delbrueckii* の TMP 合成に与える $V.B_{12}$ の影響を明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】$V.B_{12}$ 定量用合成培地を基礎培地とし、$V.B_{12}$ 添加 ($V.B_{12}$+)、無添加 ($V.B_{12}$-) を作成した。さらに KEGG を参考に $V.B_{12}$ が関わると考えられた TMP 合成の中間体として thymidine, thymine, 5-methylcytosine を選抜しそれぞれの培地に添加した。培養後の生育を吸光度 (O.D.660nm) にて測定した結果、$V.B_{12}$+ ではすべて 0.8 以上となり、$V.B_{12}$- においては thymidine 添加培地でのみ 1.3 と $V.B_{12}$+ と同等以上の生育を示した。一方 $V.B_{12}$- の thymine, 5-methylcytosine 添加においては生育が見られなかった。また細胞長においても $V.B_{12}$+ のすべては平均が 10μm 未満、$V.B_{12}$- の thymidine 添加では一部伸長した細胞が見られるが平均は同じく 10μm 未満であるのに対し、他の $V.B_{12}$- では 20μm となった。この事から $V.B_{12}$ は TMP 合成経路において特に thymine から thymidine を合成する反応に影響している事が考えられた。

本発表ではこの反応に関与する酵素である nucleoside deoxyribosyltransferase と $V.B_{12}$ の関連性ついても併せて報告する。

(1)西前ら, 日本農芸化学会2010年度大会講演要旨集 P.66 2AOp02

Lactobacillus delbrueckii, Vitamin b_{12}, thymidine monophosphate

講演番号：2C25p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ C校舎25会場

β-アラビノオリゴ糖鎖の*Bifidobacterium longum*に対する増殖促進効果

Growth effect of β-arabinooligosaccharide chain on *Bifidobacterium longum*

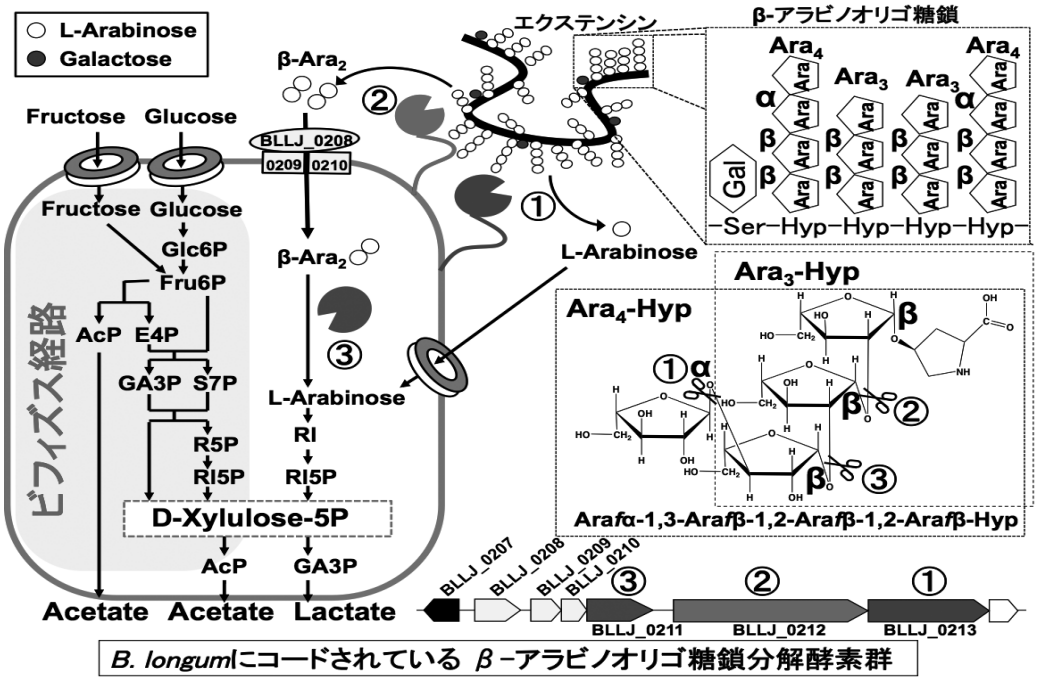
○藤田 清貴、奥山 千代美、北原 兼文、菅沼 俊彦（鹿児島大農・生資化）
○Kiyotaka Fujita, Chiyomi Okuyama, Kanefumi Kitahara, Toshihiko Suganuma (Kagoshima Univ.)

【目的】

β-アラビノオリゴ糖鎖は植物細胞壁に存在するエクステンシン等に含まれる糖タンパク質糖鎖である。最近、我々はβ-アラビノオリゴ糖鎖を分解するα-L-arabinofuranosidase（HypAA:①）及びβ-L-arabinobiosidase（HypBA2:②）を*Bifidobacterium longum* から見いだすとともに、*B. longum* がHypBA2の遊離糖であるAraf β 1,2Araf（β-Ara_2）を炭素源として生育することを報告した［K. Fujita, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **286**, 5143-5150 (2011), K. Fujita, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **286**, 38079-38085 (2011)］。そこで本研究では、β-アラビノオリゴ糖鎖[Araf α 1,3Araf β 1,2Araf β 1,2Araf β-Hyp（Ara_4-Hyp)］とともに、β-アラビノオリゴ糖鎖を多く含む糖タンパク質及び植物細胞壁画分を用いた資化性試験を行うことを目的とした。

【方法】Ara_4-Hyp を炭素源とした PYF 培地で *B. longum* JCM1217 を嫌気培養した。比較のための炭素源としてL-アラビノース、グルコースを用い、供試菌として *B. adolescentis* JCM1275 を用いて同条件で培養した。各炭素源の資化性と菌体内外における HypAA, HypBA2, β-L-arabinofuranosidase(HypBA1:③)の酵素活性の有無を HPLC で分析し、培養後の培地成分をHPAEC-PAD で分析した。

【結果】*B. longum* による Ara_4-Hyp の資化性と、培地に添加した Ara_4-Hyp の Ara-Hyp への分解が確認できた。さらに、洗菌菌体を用いての HypAA 及び HypBA2 の酵素活性と、破砕菌体を用いての HypBA1 の酵素活性が確認できた。しかし、L-アラビノース及びグルコースで培養した菌体では、酵素活性は検出されなかった。なお、*B. adolescentis* はβ-アラビノオリゴ糖鎖に対する資化性を示さなかった。この結果、図に示した *B. longum* のβ-アラビノオリゴ糖鎖分解代謝経路の存在が、酵素の反応性と資化性の両方から裏付けられた。現在、ニンジンから調製したエクステンシン及びエクステンシンが多く含まれている大豆種皮の粉砕加工品の *B. longum* に対する資化性試験を行っている。



Arabinose, *Bifidobacterium longum*, prebiotics

講演番号:2C25p07
講演日時、会場:3月23日15:05～ C校舎25会場

人工乳栄養児由来糞便培養を用いたヒトミルクオリゴ糖Lacto-N-bioseのプレバイオティック特性の評価

Evaluation of prebiotic properties of human milk oligosaccharides Lacto-N-biose using the fermentation of the feces from formula-fed infants.

○佐藤拓海、小田巻俊孝、名村真理子[1]、清水隆司[1]、西本完[2]、北岡本光[2]、清水(肖)金忠、岩附慧二(森永乳業株式会社食品基盤研究所、[1]森永乳業株式会社栄養科学研究所、[2](独)食品総合研究所)

○Takumi Satoh, Toshitaka Odamaki, Mariko Namura[1], Takashi Shimizu[1], Mamoru Nishimoto[2], Motomitsu Kitaoka[2], Jin-zhong Xiao, Keiji Iwatsuki(Morinaga Milk Industry Co., LTD., Food Science & Technology Institute, [1]Morinaga Milk Industry Co., LTD., Nutritional Science Laboratory, [2]National Food Research Institute)

【背景・目的】

ヒトミルクオリゴ糖の構成単位であるLacto-N-biose(LNB; Galβ1-3GlcNAc)はビフィズス菌の増殖促進因子として知られている。我々はこれまでに乳児腸内菌叢の多くを占めるビフィズス菌種がLNBを利用できる事を報告してきた。本研究では人工乳栄養児由来糞便を接種源に、これまでにプレバイオティクスとして報告のあるオリゴ糖を比較対照にLNBの発酵特性を評価する事を目的とした。

【方法・結果】

単一炭素源としてLNB、lactulose、raffinose、galactoologosaccharide(GOS)、mannooligosaccharide(MOS)をそれぞれ培地中に最終濃度1%になるように添加し、pH自動調整機能付きのミニジャーファーメンター内で人工乳栄養児由来糞便を発酵させた。発酵培養は乳児腸管内を再現するため、pHが5.5を下回らないようにアルカリ液を自動で添加する片側制御の中和培養にて行った。培養開始後10hでMOS以外の条件下でほとんどの糖が消費されpHが5.5に到達し、その後緩やかにpHの上昇が見られたが、LNBではpHの上昇が低い傾向にあった。また培養後5、10、24hで培養液をサンプリングし、菌叢および、短鎖脂肪酸の解析を行ったところ、MOS以外は全体的にビフィズス菌を顕著に増殖させ、中でも*B. bifidum*に関して他のオリゴ糖では見られないLNB特異的な増殖促進が観察された。また培養上清中の短鎖脂肪酸を解析したところ、LNBは他のオリゴ糖に比べ乳酸の生産量が少なく、酢酸の生産量が有意に高かった。これらの結果から、LNBは他のオリゴ糖と同様なプレバイオティクス性能を有し、かつ*B. bifidum*に対する特異的な増殖促進作用や酢酸産生能が高いなどのユニークな発酵特性を有する事が示された。

Bifidobacterium, HMO, prebiotics

講演番号：2C25p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎25会場

酸素耐性乳酸菌育種方法の開発

Development of the method for breeding of oxygen-tolerant lactic acid bacteria.

○山本　裕司、濱口　翔平、佐々木　諒子、向井　孝夫（北里大・獣）
○Yuji Yamamoto, Shohei Hamaguchi, Ryoko Sasaki, Takao Mukai (Kitasato Univ)

【目的】乳酸菌の生菌摂取による保健的効果「プロバイオティクス」では、摂取した菌が生きて腸まで届く事が重要である。このため乳酸菌の生菌数は食品中で高く維持されることが望ましいが、保存時には生菌数を低下させる幾つかの要因が存在する。これまで当研究室では、乳酸菌の低温保存時における生残性低下の要因として酸素ストレスが関与していること、酸素ストレス耐性能の高い株は高い生残性を示すことを見出した。また、生残性の低い株でも培地に抗酸化物を添加することで生残性が向上することから、酸素ストレスを低減させることが生残性の向上に繋がると考えられた。以上の背景を踏まえ本研究では、活性酸素に耐性を示す乳酸菌株を人為的に選抜することで、乳酸菌に酸素耐性能を付与し、低温生残性の向上を試みるものとした。
【方法】活性酸素耐性株の選抜には、当初過酸化水素や過酸化物を使用したが、耐性株の出現頻度が低く、生残性が向上した株をえることができなかった。そこで、新たに活性酸素発生剤でありアミノキノン系の抗腫瘍剤であるStreptonigrin (SN)を用いた。低温生残性が低い*Lactobacillus gasseri* JCM 1131と*Lactobacillus acidophilus* JCM 1132を対象とし、SNに対する最少生育阻止濃度(MIC)を決定した後、MICよりも段階的に高いSN濃度を添加したGYP培地で培養し、24時間以降に生育してきたものを耐性株として分離した。次に、得られたSN耐性株のSN耐性能、好気条件下での生育能、及び低温生残性を測定した。また、得られた株の酸素耐性能向上機構についても解析を行った。
【結果】SN耐性株は*L. gasseri*と*L. acidophilus*からそれぞれ35株、6株ずつ選抜した。SNに対する耐性能は野生株に比べ測定した限りでは、約2～8倍上昇した。次に得られたSN耐性株の好気条件下での生育能を野生株と比較した。その結果、*L. gasseri*では30株で、*L. acidophilus*では２株で、野生株よりも好気条件下での生育能が上昇していた。低温生残性を評価した結果、*L. acidophilus*のSN耐性株２株で、野生株に較べ向上が認められた。一方、*L. gasseri*では、６株のSN耐性株の生残性を評価した限りでは、生残性が向上した株が得られなかったため、現在残りの株の評価を行っている。次に、生残性の向上が確認された*L. acidophilus*のSN耐性株２株について、酸素耐性能の向上メカニズムの解析を行った。その結果、いずれのSN耐性株においても、過酸化水素の産生量が親株と比べ顕著に低下していることが判明した。推定される過酸化水素産生酵素の活性を、野生株とSN耐性株で比較したところ、過酸化水素生成型のNADHオキシダーゼ活性がSN耐性株２株で低下していた。このため、これらのＳＮ耐性株では、過酸化水素生成型NADHオキシダーゼ活性が低下することで、過酸化水素産生量が減り、酸素耐性能を獲得したと考えられる。

Probiotics, oxidative stress, lactic acid bacteria,

講演番号：2C25p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎25会場

耐冷性乳酸菌の低温増殖能力と抗酸化機構の関連

Involvement of antioxidative mechanism in the low-temperature growth of a cold-tolerant lactic acid bacterium

○後藤 清太郎、川本 純[1]、佐藤　智[2]、壱岐 隆、工藤 和幸、江崎 信芳[1]、栗原 達夫[1]（日本ハム（株）商開研、[1]京大化研、[2]京大LTMセンター）

○Seitaro Goto, Jun Kawamoto[1], Satoshi Sato[2], Takashi Iki, Kazuyuki Kudo, Nobuyoshi Esaki[1], Tatsuo Kurihara[1] (Prod. Dev. Lab., Nippon Meat Packers, Inc., [1]Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., [2]Res. Cent. Low Temp. Mat. Sci., Kyoto Univ.)

【目的】　食品に有効活用される乳酸菌だが、いくつかの乳酸菌種は食肉加工品に付着した場合には、適正な低温管理状況下においても急速に増殖し、製品の品質を劣化させることが以前から知られている。そのため、食肉加工品メーカーにおいて、健康危害はないものの品質を著しく劣化させるこの乳酸菌種の性状を知ることは、品質管理の観点から非常に重要である。先の試験にて、実際に変敗した食肉加工品から分離した *Leuconostoc mesenteroides* 野生株（NH04 株）の性状を調べたところ、低温環境では細胞膜の脂肪酸組成は分岐脂肪酸や飽和脂肪酸が多く存在した。また、細胞内には抗酸化に働くタンパク質（ペルオキシレドキシン）が、他の株に比べて高発現しており、低温増殖性の高い NH04 株は酸化ストレス耐性機構を発達させている可能性が示唆された。本研究は、食肉製品を変敗させる乳酸菌 NH04 株の低温増殖能力と、本株が有する抗酸化機構の関連性について解析した。

【方法・結果】　低温環境での増殖性が異なる *L. mesenteroides* NH04 株と標準株（NH01）を10°C で培養した菌体を調製し、ジヒドロエチジウム（DHE）を用いて、菌体内のスーパーオキシドアニオンの蓄積量を解析した。その結果、低温増殖性の高い NH04 株には、NH01 株に比べて 1.7 倍のスーパーオキシドアニオンが蓄積していることがわかった。スーパーオキシドアニオンは、呼吸代謝の副生成物として生じ、より反応性の高いヒドロキシラジカルへと変換される可能性があるフリーラジカルである。NH04 株の細胞内には、細胞毒性を示す活性酸素種が多く存在するにもかかわらず、他の株に比べて高い増殖性を示すことから、本株には活性酸素種による細胞毒性に対する防御機構が存在していることが示唆された。本株を 10°C で培養した時、グルタチオン代謝酵素の1つとして知られているペルオキシレドキシン（NH04AhpC）が高生産されることが分かっている。NH04 株の AhpC が乳酸菌の低温増殖性におよぼす影響を解析するために、NH04AhpC の過剰発現用ベクターを構築し、NH01 にエレクトロポレーションにより導入した。NH04AhpC 高発現株は、野生型 NH01 株に比べて低温での増殖速度が増加することがわかった。以上の結果から、NH04 株由来の AhpC による細胞内抗酸化機構が、食品変敗性乳酸菌の低温での増殖性に関与している可能性が示された。

lactic acid bacteria, cold tolerance, oxidative stress

講演番号：2C25p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎25会場

大腸菌のコロニー形成能を失った変異株の分離

Isolation of *Escherichia coli* mutants defective in the colony formation activity

安原 幸司、池端 佑仁、三井 智玄、小川 哲弘、日高 真誠、○正木 春彦（東大院農生科・応生工）

Koji Yasuhara, Yuto Ikehata, Tomohiro Mii, Tetsuhiro Ogawa, Makoto Hidaka, ○Haruhiko Masaki (Dept. of Biotech., Univ. of Tokyo)

【目的】微生物は一般に，コロニーを分離することからその菌の研究が始まる。またコロニー形成能は，生菌数を定量化する最も一般的手法となっている。しかし近年，環境中のほとんどのバクテリアは，生きている証拠はあってもコロニーを形成できないことが認識されるようになった。大腸菌ですら例えば最少培地でコロニー形成率はかなり低くなる。これらは，バクテリアにとってコロニー形成が，生きていることと同値ではなく，極めて特殊な状態であることを意味している。コロニー形成とはいったい何か？コロニーを作らない状態とは何か？これらの問いに遺伝学的に答えるために，我々は，コロニー形成能を失った変異体を分離して，その遺伝子とコロニー形成への関わり方を解明したいと考えた。しかし，今までのすべての変異体はコロニーとして分離されているので，新しいアプローチが必要となる。我々は，環境からバクテリアを分離する際，液体培養限界希釈法がコロニー法より一桁高い数値を示す経験をもとに，液体培養法を基礎にして，「液体培養が可能で固体培地上にコロニーを作らない株」の分離を試みた。

【方法と結果】大腸菌遺伝子の必須/非必須は，その欠損株がコロニーを形成するか否かで定義される。大腸菌の必須遺伝子に変異のあることが期待される温度感受性(ts)株は，制限温度でコロニーを作らないことを意味する。そこで tsライブラリーの中から，制限温度でも液体培地なら生育できる株として，コロニー形成に必要な遺伝子の変異が取得できるのではないかと考えた。また様々な試みを通じ，コロニー形成は確率的過程であると考えられたので，個々のts株を段階希釈したものを一定量ずつ接種し，制限温度(41℃あるいは39℃)において，L-brothの液体培地で増殖する頻度が同寒天培地でコロニーを形成する頻度よりも有意に高い株をスクリーニングした。典型的な液体培養では，U字底96穴マイクロタイタープレートに分注した150 µLの培地で 3日間静置培養した後，濁りあるいは菌の沈殿を認めたものを液体培地で生育したと見なした。

制限温度で液体培養の可能であったそれぞれの候補株について，大腸菌の全遺伝子を一つずつ挿入した可動化プラスミドをもつ大腸菌ライブラリーと接合させ， ts性を相補(41℃でコロニー形成)する遺伝子を特定し，さらにts株のそのORFに点変異のあることを確認した3遺伝子を同定した。このうち，脂肪酸生合成系に必要な*fabB*遺伝子に関しては独立に2つの異なったts株が得られ，スクリーニング法の信頼性が示された。2つの*fabB*(ts)株について，液体培地での生育度をMPN法で，また固体培地での生育度をコロニー形成率CFUで評価すると， MPN/CFUの値が30℃ではほぼ1なのに対し，39℃では約10^3となり，液体培地での生育に比べて，固体培地で極めてコロニーを作りにくい性質が確認された。

Escherichia coli, colony formation, temperature sensitivity

講演番号：2C25p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ C校舎25会場

大腸菌のコロニー形成能を失った変異株の分析

Characterization of an *Escherichia coli* mutant defective in the colony formation activity

○三井 智玄、池端 佑仁、安原 幸司、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東大院農生科・応生工）

○Tomohiro Mii, Yuto Ikehata, Koji Yasuhara, Tetsuhiro Ogawa, Makoto Hidaka, Haruhiko Masaki (Dept. of Biotech., Univ. of Tokyo)

【目的】バクテリアのコロニー形成は，生きていることと同値ではなく，その特殊な状態である。我々はコロニー形成に必要な遺伝子の発現を知るため，コロニー形成に欠陥のある変異体を求め，非制限温度において「 L-broth液体培地では生育できるが固体培地ではコロニーを作りにくい」大腸菌の温度感受性(ts)変異を分離した。そのうち1つの責任遺伝子として脂肪酸生合成系に必要な*fabB*を見いだした。しかし，用いたts株は重度に変異原処理されているので，表現型は他の変異の影響を受けうる。そこで，野生株MG1655をもとに*fabB*のみを欠失させた大腸菌株を以下の2つの方法で作製し，コロニー形成能を調べた。①プラスミドから*fabB*を誘導的に発現できる条件下で，ゲノム上の*fabB*を欠失させた。②*fabB*(ts)株では培地にオレイン酸を加えると制限温度での生育が回復することが知られている。そこでオレイン酸添加培地を用いて*fabB*を欠失した株を作製した。このうちおもに，②について報告する。

【方法と結果】オレイン酸をTritonX-100で分散させて添加したL-broth培地を用い，Red/ET組換え法により，ゲノム上の*fabB*遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子と置換した*ΔfabB*株を作製した。オレイン酸存在下で前培養した菌の，オレイン酸不添加の液体培地と固体培地での生育度を，MPN法とコロニー数で測定すると，野生株ではMPN/CFUの比はほぼ1となるが，*ΔfabB*株ではその比が約10^6となり，液体培地と固体培地での生育の違い，つまりほとんどコロニーを作らない性質が明確になった。しかし野生株に比べると，*ΔfabB*株の液体培地での生育も非常に低かった。

*ΔfabB*株を塗り広げた固体培地ではミクロコロニーも観察されないが，さらに，固体培地上での菌の増殖の程度を経時的に評価するため，37℃の固体平板培地上でインキュベートした菌を液体培地で洗い出し，オレイン酸添加培地にまいて出現したコロニーから生菌数を追跡した。野生株では典型的な対数増殖を示すのに対し，*ΔfabB*株では10^2あるいは10^5 cells/plateで接種しても，見かけ上の増殖がほとんど見られないまま生菌数は減少していった。一方，10 mLの液体培地に約30個の菌を接種して振盪培養した時の生菌数を，同様の方法で追跡すると，*ΔfabB*株でも対数的に増殖が見られたが，培養後約13時間で10^5-10^6 cells/mlに達したのち,減少していった。

L-broth液体培地から酵母エキスを抜くと増殖が見られなくなるので，*fabB*破壊株はL-broth液体培地において，酵母エキス中に微量に含まれる長鎖脂肪酸を利用して生育していることが推定された。しかし， L-brothであっても液体培地での増殖と固体培地での増殖は歴然と異なり，その原因の解析を進めている。

Escherichia coli, colony formation, fatty acid synthesis

講演番号：2C25p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎25会場

硫黄酸化細菌と共生している深海底生生物の長期飼育装置の開発

Development of rearing tank for deep-sea benthos and symbiotic sulfur-oxidizing bacteria.

○小西正朗[1], 和辻智郎[1], 武田美雪[1], 中川聡[1,2], 秦田勇二[1], 高井研[1], 豊福高志[1]（[1]海洋研究開発機構,[2]北大院水産）

○Masaaki Konishi[1], Tomo-o Watsuji[1], Miyuki Takeda[1], Satoshi Nakagawa[1, 2], Yuji Hatada[1], Ken Takai[1], Takashi Toyofuku[1] (JAMSTEC, [1]Hokkaido Univ.)

【目的】深海には、熱水噴出孔やメタン冷湧水など地殻内から噴出する硫化水素やメタンなどの化学物質を一次エネルギー源とする化学合成生態系が存在する。そこには軟体動物・環形動物・節足動物に属する特異な生物種がみられる。それらの生物の多くはその細胞内外にガス成分を資化する共生菌を持つことが知られており、これらの微生物が宿主の生命活動を支えられている。これらの生物を詳細に研究するためには、実験室において共生細菌とともに飼育維持し、任意の環境条件でその動態を比較観察したり、生理機能の変化を比較観測したりすることが必要である。そのためには、実験室において、ガスを供給可能な飼育システムを構築しなければならない。特に、硫化水素は水への溶解度が高く、生物毒性・還元性が高いため、飼育水中の濃度を低濃度で維持することが難しかった。そこで、ガスセンサーを利用したフィードバック制御システムを考案し、硫化水素ガスを安全かつ適切に供給する飼育装置について検討した。

【方法】100から200L容量の飼育水槽を使用した。温度は5.2±0.3℃で維持した。溶存酸素は光学式溶存酸素計を用いて監視し、脱気モジュールと給気用水流ポンプをon/off動作させ、1 mg/L程度に維持した。硫化水素ガスを脱気モジュール(MHF0504MBFT, 三菱レイヨン)を介して、飼育水中に供給した。気相中硫化水素はガスセンサー(TGS825, フィガロ技研)で検出した。硫化水素供給はon/offリレーを介して、硫化水素ガスの供給を制御する電磁弁とガス供給用モジュールへの循環ポンプの動作を制御した。水中の硫化水素濃度の検定にはメチレンブルー法を用いた。

【結果】200L容量の水槽を用いて、硫化水素ガスの供給制御を検討した。センサーシグナルと飼育水中の硫化水素濃度に相関があり、リレーの設定値をコントロールすることで50 ～1000 μmol/Lの範囲で供給制御可能であることが確認できた。しかしながら、脱気モジュールを介して直接飼育水中に硫化水素を供給する方法では、気化した液化硫化水素のガス圧の微妙な増減により、気体の硫化水素が直接水槽中に過剰供給されるトラブルが頻繁に起こることがわかった。そこで、硫化水素供給用の脱気モジュールに導入される飼育水を直接水槽に供給せず、多孔質テフロンチューブを介して、間接的に供給するなどの改良を行うことで、安定的に硫化水素供給が可能となった。現在、改良した飼育装置を用いて、沖縄沖で採取したゴエモンコシオリエビ（*Shinkaia crosnieri*）の飼育を試みている。

rearing tank, sulfur-oxidizing bacteria, *Shinkaia crosnieri*

講演番号：2C25p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎25会場

Development of multifunctional microbial fertilizers by applying indigenous nitrogen-fixing bacteria and photosynthetic bacteria in Taiwan

Waitak Wong[1,2], Jin-Han Tseng[1], Zhu-Ning Huang[1],Huu-Sheng Lur[2], ○Chi-Te Liu[1,3]

[1]Institute of Biotechnology, National Taiwan University
[2]Department of Agronomy, National Taiwan University
[3]Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica, Taipei, 115, Taiwan

Nowadays, the pursuit of quality, fresh, non-toxic and safe has become the trend of global agricultural production. In recent years, microbial technologies have been widely used to solve agricultural and environmental problems. Biofertilizers, such as microbial inoculants, which can help to improve soil quality, promote growth of crops, and prevent some soil-born diseases. Therefore, the new approach to farming is regarded as environmental friendly, and can be used to reduce excessive amount of chemical fertilizer application, and ensures a sustainable crop production. Fertilizer efficiency and safety are important factors for high-quality biofertilizers, which result in success and acceptance by its end-user, the farmers. However, the R&D of commercial biofertilizera requires a variety of key bio-technologies and the capability for industrial production. To put biofertilizer from bench to practical use, it needs close collaboration between academia and industry. The aim of this study is to develop a novel, multi-functional biofertilizer product, which can provide N-PK nuitrients, sustain soil fertility, promote crop yield, and also reduce plant diseases. We isolated two groups of domestic microorganism (associative nitrogen-fixing bacteria and photosynthetic bacteria) from various agricultural lands located in Taiwan. Nitrogen-fixing bacteria can convert the nitrogen gas into available form to sustain the nitrogen requirement of host plants. They are potent microbial inoculants, and are now universally used for growth promotion of plants. Photosynthetic bacteria (also called phototrophic bacteria) are capable of photoautotrophy, and possess diverse capacities for dark metabolism and growth. They synthesize useful substances from secretions of roots, and these molecules are directly absorbed by plants. Furthermore, their second metabolites have been reported to suppress some soil borne pathogens. We selected the candidates which are physiologically and ecologically compatible with each other, and that can be introduced as mixed cultures or co-inoculants into soils, where their beneficial effects can be demonstrated.

Keywords: biofertilizer, nitrogen-fixing bacteria, photosynthetic bacteria

講演番号：2C25p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ C校舎25会場

タイトル　ゲニステインで共生初期に強く誘導されるダイズ根粒菌の共生領域外ゲノム領域の解析

Title　Analysis of *Bradyrhizobium japonicum* genomic locus outside symbiosis island induced by genistein in the initial stage of symbiosis

○武島　圭介、日高　達夫、魏　敏[1]、横山　正[2]、南沢　究[3]、三井　久幸[3]、板倉　学[3]、金子　貴一[4]、田畑　哲之[5]、佐伯　和彦[6]、大森　博文[7]、田島　茂行[8]、内海　俊樹[9]、阿部　美紀子[9]、大和田　琢二（帯畜大・食品科学、[1]蘭州大・生命科学、[2]東京農工大・農、[3]東北大・院生命科、[4]京都産業大・工、[5]かずさDNA研、[6]奈良女子大・理、[7]大阪大・院理、[8]香川大・農、[9]鹿児島大・院理工）

○Keisuke Takeshima, Tatsuo Hidaka, Min Wei[1], Tadashi Yokoyama[2], Kiwamu Minamisawa[3], Hisayuki Mitsui[3], Manabu Itakura[3], Takakazu Kaneko[4], Satoshi Tabata[5], Kazuhiko Saeki[6], Hirofumi Oomori[7], Shigeyuki Tajima[8], Toshiki Uchiumi[9], Mikiko Abe[9], Takuji Ohwada (Department of Food Science, Obihiro Univ. of Agriculture and Veterinary Medicine, [1]School of Life Science, Lanzhou Univ., [2]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [3]Graduate School of Life Science, Tohoku Univ., [4]Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo Univ., [5]Kazusa DNA Res. Inst., [6]Faculty of Science, Nara Women's Univ., [7]Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka Univ., [8]Departmemt of Life Science, Kagawa Univ., [9]Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima Univ.)

【目的】ダイズ根粒菌（*Bradyrhizobium japonicum*）は、宿主ダイズ(*Glycine max* L.)の根に根粒を形成し窒素固定を行う農業上重要な窒素固定細菌である。宿主ダイズから検出されるフラボノイド［genistein(GEN)、daidzein(DAI)等］により、根粒菌ゲノムの共生領域に存在する *nod* 遺伝子群が誘導発現し、その産物（Nod factor）により根粒形成が誘導される。以前の研究で、ダイズ根粒菌遺伝子の網羅的な発現解析を行なった結果、共生領域外のゲノム領域（BjG30：7.73~7.75Mb）に位置する遺伝子群が、*nod* 遺伝子群よりも著しく早く誘導されることが見い出された。本研究では、BjG30 に含まれる 17 個の遺伝子の誘導発現プロファイルを詳細に調べるとともに、共生における役割を推察した。

【方法および結果】菌体を GEN (5μM) 或いは DAI (5μM) で 30℃、30 分間処理し、BjG30 の 17 個の遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR で測定した。その結果、GEN 等の 5'-hydroxy フラボノイドにより強く誘導されたが、DAI 等の 5'-deoxy フラボノイドでは発現量が著しく低いこと、GEN 処理後 5 分で顕著に発現し 15 分で発現量が最大になること、更に、GEN の終濃度が 7.5μM の時に発現量が最大になることが明らかになり、*nod* 遺伝子群の発現プロファイルとは全く異なることが明らかになった。BjG30 には多剤排出ポンプをコードする遺伝子群が含まれていることから、GEN の排出が共生の初期過程に関わっている可能性が示唆された。

Symbiosis, Rhizobium, Flavonoid

講演番号：2C25p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ C校舎25会場

*Agrobacterium*から出芽酵母へのT-DNA輸送システムに関わる遺伝子の探索

Genome wide screening of yeast genes required for the T-DNA transfer from *Agrobacterium* to yeast.

○大嶺 悠太、佐藤 由香里、清川 一矢、山本 真司、守口 和基、鈴木 克周（広島大院・理）
○Yuta Ohmine, Yukari Sato, Kazuya Kiyokawa, Shinji Yamamoto, Kazuki Moriguchi, Katsunori Suzuki
(Hiroshima Univ)

【目的】植物病原菌である*Agrobacterium*はT-DNAを植物細胞へ輸送することにより、根頭癌腫病を引き起こす。このT-DNA輸送機構を利用した形質転換法は植物で活用されているだけでなく、出芽酵母を含む多くの菌類の形質転換への適用が報告されている。T-DNA輸送の分子機構に関しては、*Agrobacterium*細胞で遺伝子発現誘発メカニズムと輸送装置の構成分子など詳しい解析が行われており、最近では宿主植物側において*Agrobacterium*から輸送される分子と相互作用するVIP1やVBFといった因子が同定されている。しかし、菌類においては受容に関わる因子についての解析がほとんど行われていない。そこで、T-DNA輸送受容に重要な因子の同定を目的とし、モデル真核生物の出芽酵母を用いてT-DNA輸送による形質転換効率の低い変異株のスクリーニングを試みた。
【方法】酵母人工染色体（YAC）を挿入したT-DNAをもつ*Agrobacterium*菌株を供与菌とし、受容菌として出芽酵母の非必須遺伝子破壊株コレクションを用いた。T-DNA輸送はYACの*URA3*遺伝子を受け取ってウラシル要求性が非要求性となりウラシルを添加しない培地で増殖することで判定した。先ず、Ura^+コロニーを見る定性的な評価で選抜した。次に、総細胞数あたりのUra^+コロニー数の比を基準にした評価を行い、野生株の10%以下の形質転換効率を示す変異株を選抜した。候補変異株で破壊している遺伝子の野生型遺伝子をプラスミドベクターにクローニングして変異株に導入し、T-DNA形質転換効率の回復がみられた変異株をT-DNA受容能力低下株とした。
【結果】DNA修復に関わる*SRS2*、*RAD52*や細胞壁の整合性に関わる*SMI1*の欠失変異株では野生型株BY4742に比べて、3%～8%の効率に低下していた。他のDNA修復に関する変異株では*MRE11*で13%、*XRS2*と*RAD59*で38%であった。大腸菌から出芽酵母への生物界間接合においては*vma*遺伝子他の変異株が大幅に形質転換効率を低下させるが、今回のスクリーニングではそれらの変異株は得られなかった。供与菌として*Agrobacterium*（T-DNA輸送）を用いた場合と大腸菌（tra_{RK2}生物界間接合）を用いた場合では酵母内で受容に関わる因子が異なることが示唆された。

conjugation, Saccharomyces cerevisiae

講演番号:2C25p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ C校舎25会場

清酒酵母と乳酸菌の複合バイオフィルム形成と共凝集に関する研究

Mixed-species biofilm formation and co-aggregation between sake-yeasts and lactic acid bacteria

○土屋典子[1]・古川壮一[1]・荻原博和[1]・森永康[1]（[1]日大院・生資科）
○ Noriko Tsuchiya[1], Soichi Furukawa[1], Hirokazu Ogihara[1], Yasushi Morinaga[1] ([1]Coll.Bioresource Sci.,Nihon Univ.)

【目的】鹿児島県福山地方の福山酢より分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11（以下 ML）と出芽酵母を共培養すると顕著な複合バイオフィルム（BF）を形成し、その形成に酵母と乳酸菌の共凝集が重要な役割を持つことが明らかとなった。そこで、清酒酵母を含む複数の酵母を用いて ML との複合 BF 形成と共凝集性を検討した結果、特に清酒酵母に関して興味深い知見が得られたので報告する。
【方法】＜使用菌株＞酒類総研よりの分譲清酒酵母 10 株を含む酵母 32 株及び乳酸菌 6 株を使用。＜BF 形成量評価＞マイクロタイタープレートに菌液を接種し 30℃、24 h 培養した。洗浄後、0.1% クリスタルバイオレットで染色を行い、70% エタノールで抽出後 590 nm の吸光度を測定した。＜共凝集試験＞乳酸菌・酵母の 24 h 培養菌体を洗浄後、YPD 培地に懸濁したものを各 1 ml ずつ小型シャーレ中にて混合し、静置 10 min 後の凝集塊形成を観察した。加熱（121℃、15 min）及びプロテイナーゼ K（37℃、1 h）処理した菌体の共凝集性評価も同様の方法で行った。
【結果・考察】ML との共培養により、供試酵母のほとんどで BF 形成量が増大したが、菌株によってその程度が異なった。とりわけ清酒酵母においては、泡あり酵母に比べて、対応する泡なし酵母変異株が有意に高い複合 BF 形成量を示すとともに、高い共凝集活性を示した。また、泡あり酵母の菌体を加熱処理あるいはプロテイナーゼ処理すると共凝集性が増加した。泡あり酵母の細胞表層には Awa1 タンパク質が存在するが、泡なし変異株には Awa１が存在しないことが知られている。Awa1 は清酒酵母の泡形成に関与する表層タンパク質だが、上記の結果より、Awa1 の欠失、変性あるいは分解によって、ML との共凝集性が高まることが確認された。これらの結果は、Awa1 を保有する清酒酵母では Awa1 が ML との細胞間接着を妨害するため共凝集性が低下していることを示唆している。
また、実験室酵母BY4741との各種乳酸菌の共培養により複合BF形成量が顕著に増大した乳酸菌6株を選び、共凝集試験を行った。*Leuconostoc mesenteroides* K01以外は酵母との共凝集性を示し、中でも新たに発酵食品から分離した*L. plantarum* HM23、HP9は高い共凝集性を示した。これらの乳酸菌の場合も、MLの場合と同様、加熱処理で共凝集性を失う一方で、加熱処理酵母に対しては共凝集性を示した。したがって、これら新規乳酸菌においても、MLの場合同様、表層タンパク質が酵母との接着、凝集に関与していると考えられる。

biofilm, coaggregation, sake yeast

講演番号:2C25p18
講演日時、会場:3月23日17:26～ C校舎25会場

酵母と乳酸菌の複合バイオフィルムを利用したアルコール発酵

Alcohol fermentaion adopting mixed-species biofilm formed by yeasts and lactic acid bacteria

○阿部 侑[1]、今井 巧大[1]、深瀬 栄[1]、古川 壮一[1]、荻原 博和[1]、森永 康[1]（[1]日大院・生資科）
○Atsumu Abe[1], Kouta Imai[1], Sakae Fukase[1], Soichi Furukawa[1], Hirokazu Ogihara[1], Yasushi Morinaga[1]（[1]Coll・Bioresource Sci,Nihon University）

【目的】一般に伝統的発酵はその管理は厳密でないにもかかわらず、物質生産と製品の安全性の確保を同じプロセスの中で同時に達成している。これは、有用菌の優先化に伴うエタノールや乳酸等の有機酸などによる抗菌物質の生産もそのプロセスに貢献しているものと推察される。我々は福山酢から分離された乳酸菌*Lactobacillus plantarum* ML11-11と出芽酵母を共培養すると両菌の菌体で構成される顕著な複合バイオフィルム（複合BF）が形成されることを明らかにしてきた。この複合BFは洗浄において剥がれにくいことが明らかになっており、複合BFをもちいた担体への酵母菌体の固定化が可能であると考えている。本研究では、この複合BFを利用したアルコール発酵システムを構築し、固定化菌体としての安定性を評価するとともに、雑菌汚染に対する抑制効果を検討し、発酵システムとしての優位性を明らかにすること目的としている。
【方法】（発酵能試験）セルロースビーズを担体とし*Saccharomyces cerevisiae* BY4741と*L. plantarum* ML11-11あるいは新規に分離した*L. plantarum* HM23を組み合わせてバイオフィルムを形成させ、反復回分発酵及び連続発酵のシステムを用いて培養し、24 h毎にアルコール発酵能を測定した。（雑菌抑制試験）大腸菌をモデル雑菌として酵母、乳酸菌共培養系に共存させ、24 h培養後、適宜希釈、塗抹後各菌の生菌数を測定した。
【結果】反復回分発酵試験では、グルコース量10％（w/v）及び20％(w/v)おける10日間の発酵試験ではアルコール発酵能の立ち上がりに差が見られたが、その後のアルコール収率は安定した。また、新規乳酸菌のHM23をもちいた系はML11-11の場合と同等の発酵成績を示し、酵母単独系とも同等の発酵能をしめした。連続発酵試験においてアルコール濃度は回分式に比べ低下したがアルコール収率は安定していた。大腸菌をモデルとした雑菌抑制試験で、HM23を使用した系では、大腸菌の生菌数が24h後5オーダー程度減少した。HM23の系の大腸菌増殖阻止作用は、ML11-11を用いた系よりも約10倍強いことが明らかとなった。HM23はエタノールや乳酸以外の抗菌性物質を産生している可能性が示唆された。

biofilm, ethanol fermentation, immobilized cells

講演番号：2C25p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ C校舎25会場

酵母と乳酸菌の複合バイオフィルム形成プロセスの解析

Analysis of the yeast-LAB mixed-species biofilm formation process

○平山 悟、吉田 可奈子、能島 菜積、古川 壮一、新井 直人、荻原 博和、森永 康（日大院・生資科）

○Satoru Hirayama, Kanako Yoshida, Natsumi Nojima, Soichi Furukawa, Naoto Arai, Hirokazu Ogihara, Yasushi Morinaga (Coll. Bioresource Sci., Nihon Univ.)

【目的】伝統的な発酵食品の製造工程には酵母と乳酸菌が共存している例が数多く見られ、両者の間には何らかの相互作用が存在すると考えられる。福山酢のもろみから分離された乳酸菌*Lactobacillus plantarum* ML11-11は出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*と共存すると、顕著な共凝集性や複合バイオフィルム(BF)形成を示す。これまでの研究により、本共凝集は乳酸菌の表層タンパク質と酵母の表層マンナンとを介して起こることが明らかにされている。本検討では、*L. plantarum* ML11-11と*S. cerevisiae* BY4741による複合BFの経時的な定量や菌数測定、顕微鏡観察、また走査型プローブ顕微鏡(SPM)を用いた構造解析を行い、複合BF形成プロセスの解明を目指した。

【方法】〈BFの定量〉酵母及び乳酸菌の前培養菌液を単独培養時は1/100量、複合培養時は1/200量ずつYPD培地に接種し、それらを96 well micro-titer plateに100 µlずつ分注した。30℃にて培養後、crystal violet法によってBF形成量を評価した。〈菌数測定〉定量と同様にmicro-titer plateに培養後、wellを生理食塩水で2回洗浄し、well底部に残った細胞を100 µlの生理食塩水に懸濁した。この懸濁液を適宜希釈し、酵母及び乳酸菌分離培地を用いた塗抹法により菌数を測定した。〈BFの観察〉YPD培地を入れたシャーレにスライドガラスを沈め、酵母と乳酸菌の前培養菌液をそれぞれ1/200量ずつ接種し、30℃にて培養した。培地を取り除き、0.1 M リン酸バッファーで2回洗浄し、ガラス表面に付着しているものを複合BFの細胞として位相差顕微鏡で観察した。〈SPM〉YPD培地を入れたシャーレにカバーガラスを沈め、酵母と乳酸菌の前培養菌液をそれぞれ1/200量ずつ接種し、30℃、24 h培養した。カバーガラスに形成された複合BFを試料とし、SPMを用いて解析した。

【結果】複合BF形成を経時的に解析したところ、初期には乳酸菌*L. plantarum* ML11-11が担体に付着し、12 hほど経過すると酵母を含む複合BF形成が際立つようになった。*L. plantarum* ML11-11は出芽酵母との高い共凝集性を有することから、乳酸菌・酵母の濃度が上昇するのに伴って凝集体が形成され、それが複合BF形成に寄与したものと考えられる。また菌数に関しては、初期に菌数が優勢な乳酸菌が酵母と共に増殖し、やがて乳酸菌の増殖が頭打ちになると、酵母との菌数がほぼ等しくなった。SPMを用いた解析では、複合BFを形成した酵母と乳酸菌の細胞は互いに密着している様子が観察され、両菌の高い共凝集性は細胞間の強い接着力により維持されていることが示唆された。

yeast, lactic acid bacteria, biofilm

講演番号:2C26p02
講演日時、会場:3月23日14:00～ C校舎26会場

タイトル　タンパク質栄養条件の違いにより変動する表皮タンパク質のプロテオーム解析

Title Proteomic analysis of epidermal proteins changed by the difference in protein nutrition conditions

○藤田 尚子、岡田 歩美、町田 千代美、服部 一夫、大石 祐一（東農大・応生科）

○Naoko Fujita, Ayumi Okada, Chiyomi Machida, Kazuo Hattori, Yuichi Oishi (tounodai)

【背景・目的】タンパク質栄養条件の悪化は、体重の減少や体タンパク質代謝への影響だけでなく、皮膚中のコラーゲンやヒアルロナンの代謝にも影響を及ぼすことが分かっている。しかし、タンパク質栄養条件の悪化による表皮のタンパク質量の変化を網羅的に解析した研究は行われていない。そこで我々は、タンパク質栄養条件が異なる食餌をラットに与えた後、プロテオーム解析を用いて、表皮タンパク質の変動を網羅的に解析することを検討した。

【方法・結果】実験には6週齢Wistar系雄性ラットを用いた。1週間の馴化飼育後、AIN-93Gを基本組成としたコントロール食群（C群)、タンパク質をグルテンに置換したグルテン食群（G群)、タンパク質源を除いた無タンパク食群（PF群）の3群に分け、2週間飼育した。その後、背部より表皮を採取し、二次元電気泳動を行った。条件検討の結果、二次元電気泳動のスポット単離にはタンパク質抽出時での60mM DTT添加が有効であった。また、75μｇのタンパク質を添加することによって、低分子量のタンパク質を可視化することができた。18cmのpH3-10NLドライストリップを用いた等電点電気泳動後、二次元目に12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEでの解析を行うこととした。以上の条件で実験を行った結果、C群と比較して、G群で12個、PF群で22個の変動したタンパク質が認められた。現在、MALDI-TOF-MSを用いてタンパク質の同定を行っている。

Keyword1 protein nutrition , Keyword2 proteomic analysis , Keyword3 epidermis

講演番号：2C26p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ C校舎26会場

人工甘味料の長期的摂取によるラット生体への影響

Effects of long term ingestion of artificial sweeteners on rat body

○原田尚志[1]、牛尼翔太[1]、石島智子[1]、阿部啓子[12]、中井雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]KAST）
○Takashi Harada[1], Shota Ushiama[1], Tomoko Ishijima[1], Keiko Abe[12], Yuji Nakai[1]
([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci.,Univ. Tokyo, [2]KAST)

【背景】

近年、摂取エネルギー過多による肥満を防ぐため、甘味料を従来の糖質から人工甘味料に置換する取り組みがなされている。一方、人工甘味料を含む飼料を投与したラットは、グルコースを甘味料とする通常飼料を投与したラットに比べ、体重増加量・白色脂肪組織重量が有意に増大するという報告(*Behavioral Neuroscience,* 2008, 161–173)がある。さらに、飲料として人工甘味料を長期間摂取したラットは糖質を摂取したものと比べ体重増加量が有意に増大するという報告(*Appetite 55,*2010,528-533)もある。これらの結果は、従来の糖質を人工甘味料に置換することが必ずしも生活習慣病の予防に寄与しない可能性を示唆している。その原因として「食欲の増加」や「代謝の変化」が挙げられているが、その詳細は未解明である。

【目的】

本研究では、「人工甘味料の長期間摂取が代謝に何らかの影響を及ぼす。」という仮説のもと、ラットに長期間人工甘味料を与えて飼育し、摂餌量の計測・遺伝子発現変動の解析を通してその生体に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

9週齢のSD系雄性ラットを、水(W)群・10%グルコース(G)群・0.3%サッカリン(S)群の3群(n=5)に分け毎日 3 時間ずつ各々を飲料として与え、その他の時間は水を *Ad lib* で与えた。餌は、AIN93G をベースに全てのスクロースをコーンスターチに置換したものを *Ad lib* で与えた。17日間の飼育期間中の体重変化量・摂餌量を計測し、飼育期間終了後、肝臓・精巣上体白色脂肪組織を摘出した。

【結果および考察】

体重増加量・臓器重量に有意差は見られなかったが、先行研究と同様S群がG群よりも両者の体が大きくなる傾向が見られた。S群とW群との比較ではほとんど差が見られなかった。摂食量は、飲料からエネルギーを得るG群では低下していたが、総摂取カロリーに有意差はなかった。これらの結果から、サッカリンにより食欲は変化せず、体重変化の原因はカロリーの有無によることが示唆された。また、先行研究では設定されていなかったW群も合わせて実験を行ったため、サッカリンで体重が増加するというよりもグルコースで減少する可能性が示唆された。今後、DNAマイクロアレイによって遺伝子発現変動を解析する予定である。

artificial sweeteners, rat, body weight

講演番号:2C26p04
講演日時、会場:3月23日14:22～ C校舎26会場

摂食によりラット末梢組織で生じる遺伝子発現変動の時系列解析

Time-course analyses of gene expression profiles in peripheral tissues of rats refed after fasting

○牛尼翔太[1]、石島智子[1]、阿部啓子[12]、中井雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]KAST）

○Shota Ushiama[1], Tomoko Ishijima[1], Keiko Abe, [12] Yuji Nakai[1]

([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]KAST)

【背景】

動物は生体内の栄養状態の変化に呼応して、肝臓や脂肪組織、筋肉などを中心にエネルギー恒常性を維持する。摂食により栄養素が十分に摂り入れられている状態では主に糖質をエネルギー源として利用し、余剰分をグリコーゲンや脂肪として蓄積する。一方、絶食により摂取エネルギーが不足すると、蓄積していた脂肪を利用しエネルギーを産生する。これらの変化はホルモン等による調節を受け、遺伝子発現の変動を伴うことが知られている。

絶食の進行に伴って生じる遺伝子発現変動についての報告は多いが、絶食後再び摂食した時に生じる経時的な摂食応答の変化については報告が少なく、その全体像は未解明であった。これまでに我々は、18時間絶食後6時間再摂食を行ったときに肝臓で生じる遺伝子発現変動についてDNAマイクロアレイを用いた網羅的解析を行い、免疫プロテアソームの変化を報告した[Ushiama *et al*, BBB(2010)74(6):1320-3]が、経時的な変化については依然不明であった。

【目的】

本研究は、絶食処理後再給餌を行い、肝臓と白色脂肪組織(WAT)の遺伝子発現プロファイルの変化を網羅的かつ経時的に捉えることを目的とする。

【結果と考察】

制限給餌条件下でラットを飼育した後、1・3・6時間給餌群(それぞれ1hR, 3hR, 6hR)と24時間絶食群(24hF) を設定した。各群のラットより肝臓とWATを摘出し、DNAマイクロアレイに供した。サンプル間クラスタリングの結果、両臓器とも各給餌群で明確なクラスターを形成し、給餌時間によって遺伝子発現プロファイルが大きく変化していることが示唆された。さらに発現変動遺伝子を抽出し、各臓器でGene Ontologyに基づいた機能解析を行った。

その結果、先行研究で報告されているエネルギー代謝関連遺伝子の発現変動が両組織で確認された。しかし、発現変動が生じるタイミングは肝臓に比べ WAT の方が遅く、肝臓の方が WAT より摂食に対してより早く応答することが示唆された。一方で、1hR における転写因子遺伝子の発現変動や免疫関連遺伝子の発現低下は両組織で共通して見られた。これらの結果は、末梢組織における摂食応答には一部共通する機構が存在する可能性を示すものであると考えられる。今後、本研究の成果を基に摂食応答で生じるプロテアソームや免疫機構の変化が転写物だけでなく、機能自体が変化しているか検討し、エネルギー恒常性維持機構において果たす役割について明らかにしたい。

refeeding, DNA microarray, peripheral tissues

講演番号：2C26p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ C校舎26会場

ザクロ抽出物およびエラグ酸によるタンパク質分解亢進を介したレジスチン分泌抑制効果

Pomegranate ellagic acid suppresses resistin secretion through the protein degradation

〇若木　泰子、吉村 征浩、鵜澤　有希、財満　信宏、森山　達哉、河村　幸雄（近大院・農・応生化）

〇Yasuko Wakagi, Yukihiro Yoshimura, Yuki Uzawa, Nobuhiro Zaima, Tatsuya Moriyama, and Yukio Kawamura (Kinki Univ.)

【目的】ザクロは生活習慣病に対する予防・改善効果を有する機能成分に富む植物であり、ザクロ果汁の摂取は２型糖尿病患者の血管疾患を改善させることが報告されていた。しかし、２型糖尿病の発症機構におけるザクロの直接的な予防・改善効果については報告されていない。レジスチンは、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの一つであり、２型糖尿病の発症過程である炎症やインスリン抵抗性の発症に寄与することが報告されている。そこで本研究ではザクロのレジスチン分泌に及ぼす影響を調べ、インスリン感受性アディポサイトカインであるアディポネクチンへの影響との比較と共に、その作用機序や関与成分の同定を行った。
【方法】初めに、血中レジスチン上昇モデルとして卵巣摘出（OVX）マウスを用いて、ザクロ抽出物（PFE）の給餌実験を行なった。OVXマウスにPFEを12週間摂取させ（30 mg/kg/day)、血清中のレジスチン、アディポネクチン量を測定した。また、分化させたマウス由来3T3-L1脂肪細胞にPFEを添加し、培地中および細胞中の経時的なレジスチン、アディポネクチン量をELISA法およびWestern blotting法により検出した。また、PFE添加時のレジスチンmRNA発現量をリアルタイムPCR法により解析した。
【結果】12週間の PFEの摂取は、OVXマウスにおける血清中レジスチン濃度の上昇を有意に抑制した。また、PFEは3T3-L1脂肪細胞からのレジスチンの分泌量を、濃度および時間依存的に顕著に抑制した。しかし、PFEは脂肪細胞でのレジスチンmRNA発現量には影響を及ぼさなかった。一方、レジスチンタンパク質発現量ではPFEの添加による有意な減少がみられた。そこで、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドをPFEと同時に添加し、細胞内のレジスチンタンパク質量を調べたところ、有意な減少がみられた。一方、PFEは、OVXマウスおよび3T3-L1脂肪細胞のいずれにおいてもアディポネクチンの分泌量に対して影響を及ぼさなかった。また、3T3-L1脂肪細胞においてザクロに含まれる代表的な成分によるレジスチンへの影響を検討したところ、エラグ酸は脂肪細胞からのレジスチン分泌量および細胞内レジスチンタンパク質量について、PFEと同様に顕著に顕著な抑制効果を示し、アディポネクチンには影響を及ぼさなかった。これらの結果から、ザクロおよびその一成分であるエラグ酸は、血中へのレジスチン分泌量を、脂肪細胞内のレジスチンタンパク質の分解を促進することによって抑制することが示唆された。本研究結果は、これまで報告されてきたmRNA制御を介したレジスチンの調節機構とは異なるレジスチンの分泌抑制の機構を示した初の報告となる。

Pomegranate, Resistin, Ellagic acid

講演番号：2C26p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ C校舎26会場

脂質代謝改善作用を有するトマト由来機能性成分の品種間含有量比較及び安定性評価

Quantitative and stability analysis of effective tomato-derived compounds ameliorating abnormal lipid metabolism

○高橋 春弥、金 英一、平井 静、後藤 剛、大矢根 智恵、津金 胤昭[1]、小西 千秋[2]、藤井 崇[2]、稲井 秀二[2]、飯島 陽子[3]、青木 考[3]、柴田 大輔[3]、高橋 信之、河田 照雄（京大院農・食品生物、[1]千葉農林総研、[2]日本デルモンテ、[3]かずさDNA研）

○Haruya Takahashi, Young-Il Kim, Shizuka Hirai, Tsuyoshi Goto, Chie Ohyane, Taneaki Tugane[1], Chiaki Konishi[2], Takashi Fujii[2], Shuji Inai[2], Yoko Iijima[3], Koh Aoki[3], Daisuke Shibata[3], Nobuyuki Takahashi and Teruo Kawada （Kyoudai, [1]Chibanourinsouken, [2]Nipponderumonte, [3]KazusaDNAken）

［目的］現在、我が国を含む先進諸国を中心に、脂質異常症や脂肪肝などの生活習慣病が深刻な問題として認識されている。そのため、これらの病気の根幹である脂質代謝異常の発症メカニズムの解明は重要な課題である。幅広い脂質代謝関連遺伝子群の転写を制御しているペルオキシソーム増殖剤応答性受容体（PPAR）αの活性化は、脂肪酸酸化を促すことが知られている。そのため、PPARα活性化は脂質代謝異常が主因である生活習慣病の予防・改善につながると期待されている。近年では、日常の食生活における生活習慣病予防を目的とした食品由来成分の探索について重要性が広く認識されている。本研究では当研究室で同定されたPPARαを活性化するトマト由来機能性成分のトマト品種間及びトマト加工食品中における含有量の相違について検討を行った。また、耐熱性及び耐酸性について検討し、機能性成分の安定性について評価を行った。

［方法と結果］(1) 機能性成分の品種間含有量比較実験：当研究室においてPPARα 活性化成分としてトマト果実（ふりこま）中から同定された9-oxo-octadecadienoic acid (9-oxo-ODA) について、各品種のトマト果実及びトマトジュース中の含有量比較をLC/MSを用いて行った。その結果、9-oxo-ODAはふりこま以外の幅広い品種のトマト果実にも含まれていることを明らかにした。一方、トマト加工食品（トマトジュース）中からは、9-oxo-ODAだけでなく、その構造異性体である13-oxo-ODAも検出された。13-oxo-ODAは、ルシフェラーゼレポーターアッセイによる解析から、PPARα 活性化能を有し、また、マウス肝臓初代培養細胞及び動物実験結果より、脂肪酸酸化を亢進させ、血糖値及び肝臓中脂肪量を減少させることが明らかとなった。以上の結果から、9-oxo-ODA 及び13-oxo-ODA は PPARα 活性化能を有する機能性成分として、脂質代謝の改善に有用であることが示唆された。(2) 機能性成分の安定性評価実験：同定された各種の機能性成分の標品を用いて、これらの成分の耐熱性及び耐酸性について検討を行った。その結果、ほとんどの機能性成分において、耐熱及び耐酸性の性質を有することを明らかとした。これは、本機能性成分が食品加工や調理等による損失が軽微であることを意味し、日常生活において比較的容易に摂取することが可能な機能性成分であることを示唆している。

lipid metabolism, PPARα, tomato

講演番号：2C26p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ C校舎26会場

マウス第12番染色体上の脂肪肝感受性に関与する遺伝子の探索

Searching for the gene involved in the susceptibility of fatty liver on mouse chromosome 12.

○小林美里、立石壮志、都築佳奈、大野民生[1]、村井篤嗣、堀尾文彦
（名大院・生命農・応用分子生命科、[1]名大院・医）
○Misato Kobayashi, Soushi Tateishi, Kana Tsuduki, Tamio Ohno[1], Atsushi Murai, Fumihiko Horio
(Graduate School of Bioagricultural Sci. Nagoya Univ., [1]Graduate School of Med. Nagoya Univ.)

【目的】SMXA-5マウスはSM/JとA/Jの2つの系統の交配によって作出された組換え近交系統群の1系統であり、高脂肪食摂取による脂肪肝感受性を示すマウスである。我々はこのSMXA-5の脂肪肝感受性に関わる遺伝子座を複数の染色体にマップしている。この中で脂肪肝形質と最も強い連鎖を示す遺伝子座（*Fl1sa*:Fatty liver 1 in SMXA)は第12番染色体(Chr.12)に存在し、A/J由来アレルを保有する場合に脂肪肝感受性を導く。次いで、A/Jマウスを背景系統としてChr.12のみをSM/Jマウスに置換した第12番染色体コンソミックマウス(A/J-12^{SM})が、A/Jマウスに比べて脂肪肝抵抗性であることから、Chr.12に脂肪肝感受性を決定する遺伝子が存在することを明らかにした。本研究では、**実験1**:第12番染色体上の*Fl1sa*候補遺伝子のDNA塩基配列と発現量との関連の検討、**実験2**:肝脂質蓄積の成因を明らかにするために脂質代謝関連遺伝子の発現量の変化の検討を行った。

【方法】**実験1**：6週齢のA/JマウスとA/J-12^{SM}マウスを高脂肪食で7週間飼育し、両系統の肝臓での遺伝子発現量変化をDNAマイクロアレイで比較した。Chr.12上で2倍以上の発現変動がみられた*Fl1sa*の候補遺伝子のDNA塩基配列を決定し、その結果から同定された塩基配列の変異とこの遺伝子の発現量との関連について他のマウス近交系統を用いて検討した。
実験2：DNAマイクロアレイの結果から両系統間で2倍以上の変動の見られた既知の脂質代謝関連遺伝子を選抜した。また、脂質代謝関連遺伝子(脂肪酸合成、脂肪酸酸化、脂肪酸の取り込み、トリグリセリド合成、トリグリセリド分解)を中心に両系統の発現量の解析を行った。

【結果】**実験1**：候補遺伝子上流の119bp欠失と２つのアミノ酸置換を伴う変異がA/Jマウスで確認された。このA/Jタイプの変異が複数のマウス近交系統にも存在することを見出し、これらの変異系統ではSM/J(A/J-12^{SM})タイプの正常系統に比べて候補遺伝子の発現量は明らかな低値を示した。このことから、候補遺伝子のA/Jマウスでの変異がこの遺伝子の発現量を低下させることが示唆された。
実験2:A/J-12^{SM}マウスの肝臓では、A/Jマウスに比べて脂肪酸輸送タンパク質であるCD36の発現が1/2以下の低値を示した。よって、コンソミックマウスにおける肝臓への脂肪酸取り込みの低下が肝脂質蓄積低下に寄与している可能性が示された。

fatty liver, high-fat diet, genetic analysis

講演番号：2C26p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎26会場

ABCG5に変異のあるWKY/NCrlCrljラットの植物ステロール蓄積へのT0901317摂取の影響

Effect of T0901317 treatment on plant sterol deposition in WKY/NCrlCrlj rats having a missense mutation in ABCG5

○加藤 正樹、村田 みのり、井上　奈穂、都築　毅、池田　郁男（東北大院農・食品化学）
○Masaki Kato, Minori Murata, Nao Inoue, Tsuyoshi Tsuzuki, Ikuo Ikeda (Grad. Sch. of Agr. Sci. Tohoku Univ.)

【目的】ATP-binding cassette transporter（ABC）G5およびABCG8は肝臓および小腸で発現し、細胞からのステロール排泄に関与すると考えられている。ABCG5/ABCG8はLXRアゴニストによって発現が増加することが知られており、これにより体内の植物ステロール蓄積が抑制される。正常ラットであるWistarラットに比べ、ABCG5に変異のあるSHRSP/Izm は植物ステロールを体内に高蓄積するが、LXRアゴニスト摂取による植物ステロール蓄積の抑制は穏やかであった。このことから、SHRSP/IzmではABCG5の変異によりABCG5/ABCG8の機能不全を生じていることが示唆された。しかし、LXRアゴニスト摂取による植物ステロール吸収の抑制はSHRSP/IzmとWistarラット間で有意な違いはなく、植物ステロール蓄積の原因は明らかではなかった。近年我々はWKY/NCrlCrljラットにはABCG5に変異があるが、WKY/Izmラットには変異がないことを示した。WKY/IzmとWKY/NCrlCrljは同じWKY系であることから、我々はこれらのラットの比較によりABCG5の変異の影響をより明確にできると考えた。そこで本研究では、WKY/IzmラットとWKY/NCrlCrljラットにLXRアゴニストであるT0901317（T0）を与えた際の植物ステロール蓄積の違いを調べた。
【方法】4週齢雄性WKY/IzmおよびWKY/NCrlCrljラットに、体内の植物ステロールをできる限り排除するために、AIN-93Gに準じた10%ラード食を4週間与えた。
実験1：その後、各系統のラットを2群に分け、0.5%植物ステロール食を1週間与えた。その間、1群には0.5%カルボキシメチルセルロース（CMC）溶液を、もう1群には0.5%CMC+T0（5mg/kg/B.W.）溶液を毎日経口投与した。実験2：同様に、各系統のラットを2群に分け、0.5%植物ステロール食または0.5%植物ステロール+T0（2.5mg/kg/B.W.）食を1週間与えた。
【結果および考察】実験1、2共に、T0投与により摂食量が低下した。そのため、組織中の植物ステロール量を摂取植物ステロール量で割った値で比較した。実験1、2共に、血清および肝臓カンペステロール+シトステロール（Camp+Sito）蓄積率はWKY/Izmラットに比べWKY/NCrlCrljラットで高かった。実験1、2共に、血清Camp+Sito蓄積率はT0摂取によりWKY/Izmラットでは低下したが、WKY/NCrlCrljラットでは増加した。肝臓Camp+Sito蓄積率はT0摂取によりWKY/Izmラットでは実験1、2共に低下したが、WKY/NCrlCrljラットでは実験1では変化せず、実験2では低下した。しかし、その低下はWKY/Izmラットに比べ穏やかであった。以上の結果から、WKY/NCrlCrljラットにおいてもABCG5の変異によりABCG5/ABCG8の機能不全を生じることが示唆された。

ABCG5/ABCG8, plant sterol, LXR agonist

講演番号：2C26p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎26会場

高コレステロール食摂取ラットにおける肝臓脂質代謝に及ぼす乳酸発酵豆乳の影響

Effects of Lactic Acid-fermented Soymilk on Hepatic Lipid Metabolism in Rats Fed a High Cholesterol Diet

○小林麻貴、平畑理映[1]、小野三起子[1]、江草信太郎[2]、都築公子[2]、福田滿
（武庫川女子大生環・食栄、[1]武庫川女子大院生環・食栄、[2]マルサンアイ・開発統括部）
○Maki Kobayashi, Rie Hirahata[1], Mikiko Ono[1], Shintaro Egusa[2], Kimiko Tsuzuki[2], Mitsuru Fukuda
(Dept. Food Sci. and Nutr., Mukogawa Women's Univ., [1]Graduate School of Human Environ. Sci., Mukogawa Women's Univ., [2]Res. Inst. Marusan-Ai Co., Ltd.)

【目的】近年食生活の欧米化や運動不足により脂質異常症が増加している。最近の食生活では脂質異常症予防に有効な大豆食品の摂取量は不足しがちである。大豆には機能性因子である大豆タンパク質、イソフラボンが豊富に含まれ、血中コレステロール上昇抑制作用や肝臓脂質蓄積抑制作用等の脂質代謝改善効果が報告されている。本研究室では大豆食品の中でも容易に食生活に取り入れられる豆乳に注目し、さらに植物性食品由来乳酸菌で発酵させた乳酸発酵豆乳（LFS）を作製した。本研究室ではすでに、普通食摂取ラットにおいて、大豆タンパク質換算10%相当のLFS食投与時に血中コレステロール低下作用、肝臓脂質蓄積抑制作用を示すことを報告した。さらに豆乳の乳酸発酵処理により肝臓コレステロール異化代謝経路の律速酵素cytochrome p450 family 7 subfamily a polypeptide 1（Cyp7a1）の遺伝子発現量の顕著な増加を認め、乳酸発酵で生成した生理活性物質がCyp7a1の発現を誘導すると報告した。そこで今回、高コレステロール食摂取時におけるLFSの有効濃度と肝臓脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

【方法】7週齢SD系雄性ラットをAIN-93G 組成飼料で1週間予備飼育した後、AIN-93G組成飼料の1%をコレステロールで置換したC群、C群飼料を大豆タンパク質換算5%相当にLFSで置換したF-5群、同様に大豆タンパク質換算10%相当にLFSで置換したF-10群の3群（各群n=8）に分け5週間飼育した。毎週尾動脈採血を行い、血液成分の分析を行った。飼育終了後、肝臓脂質をFolch法で抽出し、肝臓Chol濃度、TG濃度を測定した。さらに肝臓の脂質代謝関連遺伝子の発現量変化をReal time RT-PCR法で調べ比較した。

【結果】C群と比較してLFS投与の両F群では肝臓脂質量、肝臓Chol濃度、肝臓TG濃度がLFS投与濃度依存的に低下した。血中TC濃度もLFS投与濃度依存的に上昇を抑制した。また肝臓脂質代謝改善効果は大豆タンパク質濃度5%相当以上で効果があることが示唆された。両F群の肝臓脂質代謝関連遺伝子発現については、LXRα遺伝子の発現量が増加し、Cyp7a1遺伝子の発現量が有意に増加した。SREBP-2遺伝子の発現量も有意に増加した。一方FAS遺伝子、SREBP-1遺伝子の発現量は減少した。以上の結果より、高コレステロール食摂取ラットにおける肝臓脂質代謝改善作用を示すLFSの有効濃度は飼料中大豆タンパク質換算5%相当以上であった。また肝臓LXRα、Cyp7a1遺伝子発現量の増加により、肝臓Chol濃度、血中TC濃度が低下し、肝臓SREBP-1、FAS遺伝子発現量の減少により、肝臓TG濃度が低下することが推定された。

Fermented soymilk, Isoflavone, Hypocholesterolemic effect

講演番号：2C26p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎26会場

Allyl isothiocyanateの投与による糖質代謝亢進の作用機序の解明

The mechanisms for a increase in carbohydrate oxidation by administration of AITC

○ 森紀之、倉田真奈美[1]、山崎英恵[1]、灘本知憲、伏木亨[1]（滋賀県大・人間文化、[1]京大・農）
○Noriyuki Mori, Manami Kurata[1], Hanae Yamazaki[1], Tomonori Nadamoto, Tohru Fushiki[1] (Shigakendai, [1]Kyodai)

【目的】　Allyl isothiocyanate(AITC)はマスタードやわさびの主要な辛味成分である．これまでに，AITCはマウスへの胃内投与により熱刺激受容体であるTRPV1を介して糖質酸化量を増加させることが明らかになった．さらに糖負荷試験では，AITCの胃内投与により血中グルコースの利用を亢進し血糖値上昇が抑制すること，また糖負荷の有無に関わらず血中インスリン濃度が上昇することが明らかになった．しかしながら，AITCの胃内投与による糖質代謝亢進の作用機序についてはいまだ不明な点が多い．これまでの検討において，AITCの胃内投与によるインスリン等の液性因子の変動は確認されたが，神経系の関与については明らかとなっていない．そこで，AITCの胃内投与による糖質代謝の亢進に自律神経系が寄与する可能性を明らかにすることを目的とし，アドレナリン受容体阻害剤を用いた化学的神経遮断がAITC投与による糖質酸化量増加に与える影響を呼気ガス分析により検討した．

【方法】　実験動物として6～9週齢のC57BL/6雄マウスを用いた．交感神経の化学的遮断を行うため，β1，β2-アドレナリン受容体の非選択的阻害剤としてpropranololを用いた．呼気ガス分析ではマウスを2時間絶食させた後，アドレナリン受容体アンタゴニストを腹腔内投与し，さらに1時間後にAITC(25mg/kg-wt)の胃内投与を行い，投与後2時間の酸素消費量，呼吸交換比，脂質酸化量，糖質酸化量を測定した．

【結果と考察】　β1，β2-アドレナリン受容体の非選択的阻害剤であるpropranololの投与により，AITC胃内投与による糖質酸化量の増加が抑制された．　またpropranololの単独投与による，血糖値や血中インスリン濃度への影響は確認されなかった．従って，AITC胃内投与による糖質酸化量の増加には交感神経-アドレナリン受容体の経路が関与している可能性が示唆された．さらに詳細な機序を明らかにするためβ1，β2選択的阻害剤やβ3さらにα受容体の阻害剤の投与による影響について検討を進めている．

allyl isothiocyanate, carbohydrate oxidation, sympathetic nerve system

講演番号：2C26p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ C校舎26会場

タイトル　カロリー制限による脂質代謝制御機構の解析
Title Regulation mechanism of lipid metabolism by calorie restriction
○松本　知大、小森　邦弘、小田　裕昭（名大院生命農・応用分子生命科）
○Tomohiro Matsumoto, Kunihiro Komori, Hiroaki Oda (Lab.Nutr.Biochem.,Nagoya Univ.)

【目的】カロリー制限は寿命延長や老化遅延、そしてそれに伴う疾患の発病、進行の遅延をもたらすことが知られている。これまでの研究ではカロリー制限により変動する様々な遺伝子が同定され、寿命を決定する遺伝子の同定が行われてきた。しかし、どのような代謝変動が疾患の発病、進行の遅延に働いているかはほとんど研究されてきていない。今回、脂質代謝の変動に着目し、炭水化物のカロリーのみを制限し、その他栄養素が体重あたりに同じ摂取量になるように「厳密に制御した」カロリー制限を行う実験系を考案した。
【方法】Wistar系雄ラットに高コレステロール食を与えることで高コレステロール血症誘導後、炭水化物のみを制限した80%カロリー制限食または60%カロリー制限食を127日間与えた。カロリー制限食は炭水化物以外の栄養素の体重あたり摂取量が対照群と同じになるようにした。対照群の摂取量を体重あたりに換算して、カロリー制限食群の食餌量を計算して与えた。実験終了後、肝臓からRNAを抽出し、ノーザンブロット法を用いてmRNAの定量を行った。また、飼育期間中に採取した糞の胆汁酸量を測定した。また、肝臓からのVLDL放出速度を検討するために、チロキサポールを投与した。
【結果】体重は、対照群では実験開始から増加し続けたのに対して、80%カロリー制限群ではほとんど増加は見られなかった。60%カロリー制限群は減少し続けた。60%カロリー制限群では106日目までに全てのラットが死亡したことから、本実験で考案した厳密な60%カロリー制限食は過激な制限であることがわかった。80%カロリー制限群において血中コレステロール濃度、血中トリグリセリド濃度、血中リン脂質濃度の有意な低下が見られた。血中コレステロールは全てのリポタンパク質画分において減少が見られ、特にVLDL画分において大きな減少が見られた。VLDLコレステロール、VLDLトリグリセリドの肝臓からの放出速度は、80%カロリー制限群で有意に低下していた。体全体のステロイドバランスを考えるため、糞中胆汁酸を定量した。食餌摂取を体重あたりで制御したため、体重あたりの糞中胆汁酸排泄量を計算したところ、カロリー制限食の影響は見られなかった。肝臓におけるコレステロール異化代謝の律速酵素であるCYP7A1のmRNA量に有意な差は見られなかった。また、CYP7A1遺伝子発現を制御し脂肪酸代謝も制御するLXRの遺伝子発現に変化は見られなかった。以上の結果から、カロリー制限による血中コレステロール濃度の低下は、肝臓における胆汁酸合成に関わる遺伝子発現の変化ではなく、肝臓からのVLDL放出速度の低下によることが示された。また体重あたりの胆汁酸摂取量と糞中胆汁酸排泄量が群間で差がないことから、体内コレステロールの分布に変化が生じていると推測された。

calorie restriction, lipid metabolism, cholesterol

講演番号：2C26p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎26会場

Bcl11bによる脂肪細胞分化制御機構の解析

Regulation of adipocyte differentiation by Bcl11b

○井原 悠介、神田 美里、篠田旭弘、Shimizu Makoto、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）

○Yusuke Ihara, Misato Kanda, Akihiro Shinoda, Makoto Shimizu, Jun Inoue, Ryuichiro Sato (Dept. of Applied Biol. Chem., Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】Bcl11bはT細胞の初期分化を制御する、C2H2型Znフィンガーモチーフを持つ転写因子である。Bcl11bノックアウトマウスを出生直後に観察すると、肩甲間の白色脂肪組織の顕著な萎縮が確認されることから、Bcl11bが脂肪細胞分化を制御している可能性が考えられる。そこで本研究では、Bcl11bの脂肪細胞分化における機能の解明を目的とした。

【方法】マウスの脂肪組織におけるBcl11bの発現をリアルタイムPCRおよびウエスタンブロッティングによって確認した。次にウイルスベクターを用いて、マウス前駆脂肪細胞である3T3-L1細胞におけるBcl11bの発現をノックダウンして脂肪細胞分化への影響を調べた。また、マウス胎児線維芽細胞（MEF）においても同様の手法でBcl11bの発現を低下させ、脂肪細胞分化への影響を調べた。最後に、脂肪細胞分化において中心的な役割を担う転写因子であるC/EBPファミリーやPPARγの活性に与える、Bcl11bの影響を、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイにより検討した。

【結果】Bcl11bは脂肪組織および脂肪細胞にmRNAレベルで発現しており、またタンパク質レベルでも検出することができた。Bcl11bのノックダウンによって脂肪細胞分化が抑制された。更にこの時、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであるPPARγおよびその標的遺伝子の発現が抑制されていた。またレポーターアッセイにより、Bcl11bはC/EBPαおよびC/EBPβによる転写を促進することが明らかとなった。以上の結果から、Bcl11bがPPARγの発現調節を介して脂肪細胞分化を制御している可能性が示唆された。現在はBcl11bの過剰発現が脂肪細胞分化に及ぼす影響についての検証を行なっている。

Bcl11b, differentiation, adipogenesis

講演番号：2C26p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ C校舎26会場

MIG12による脂肪酸合成制御機構の解明

Mechanism of lipogenesis regulation by MIG12

○宮田 慎吾、池内 江美奈、 Shimizu Makoto、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Shingo Miyata, Emina Ikeuchi, Makoto Shimizu, Jun Inoue, Ryuichiro Sato
(Dept. of Applied Biol. Chem., Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】LXR(Liver X Receptor)は脂質代謝における転写制御に関与する核内受容体である。我々はLXRの新規標的遺伝子としてMIG12を同定し、脂肪酸合成に関与することを示してきた[1)]。本研究では、MIG12による脂肪酸合成亢進の機構を解明することを目的とした。
【方法】脂肪酸合成の律速酵素であるACC(Acetyl-CoA Carboxylase)はポリマー化によって活性促進されることから、MIG12の過剰発現によりACCがポリマー化を受けるかどうかについてBlue-Native PAGE法を用いて検証した。さらに、ラット肝癌由来H4ⅡE細胞、マウス個体においてMIG12をノックダウンすることによりACCのポリマー化が抑制されるかどうかを調べた。
【結果】MIG12を過剰発現するとACCのポリマー化が促進され、ノックダウンすると抑制された。以上の結果から、MIG12はACCのポリマー化を介して脂肪酸合成を亢進することが明らかとなった。現在、MIG12が脂肪酸合成を亢進するために重要なドメイン構造について検証を行っている。

1) J. Inoue *et al.* Mol. Endocrinol. **25**, 995-1005. (2011)

MIG12, LXR, ACC

講演番号：2C26p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎26会場

小胞体ストレス関連因子ATF6による脂質代謝制御機構の解析

Regulation of lipid metabolism by an ER stress sensor ATF6.

○丸山　竜人、鴨志田　祐己、Makoto Shimizu、井上　順、佐藤　隆一郎（東大院農生科・応生化）

○Ryuto Maruyama, Yuki Kamoshida, Makoto Shimizu, Jun Inoue, Ryuichiro Sato (Dept. of Applied Biol. Chem., Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo,)

【目的】ATF6 は小胞体ストレスによって活性化される転写因子である。小胞体ストレスを感知すると、小胞体膜に存在している ATF6 はゴルジ体に移行し、転写活性化領域を含む部分が切断され、核内へ移行する(プロセシング)。ATF6 は BiP などのシャペロン関連遺伝子を標的としており、小胞体ストレス状態の改善に寄与する。また、ATF6 のプロセシング機構はコレステロール生合成の主要な制御因子として知られる SREBP2 と類似している。このことから、本研究では、ATF6 と SREBP の機能相関を想定し、小胞体ストレスと脂質代謝の関連性について解析することを目的としている。

【方法及び結果】コレステロール合成に関わる遺伝子である HMG-CoA Synthase(HMGS)、HMG-CoA Reductase(HMGR)のプロモーター配列を組み込んだプラスミドを用い、核内型 ATF6 を HEK293 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ルシフェラーゼ活性の増加が見られた。また、ヒト肝癌細胞である Huh7 細胞にアデノウイルスを用いて核内型 ATF6 を過剰発現し、リアルタイム PCR により mRNA を解析したところ、ルシフェラーゼアッセイと同様に HMGS と HMGR の発現が増加していた。さらに、コレステロール代謝に関連する内因性遺伝子の発現変動を解析した結果、コレステロール合成経路の複数の遺伝子発現が ATF6 により増加していた。以上のことから、ATF6 がコレステロール生合成を促進する可能性が考えられる。現在、ラジオアイソトープを用いたコレステロール合成実験を進めている。

ATF6,ER stress,cholesterol

講演番号：2C26p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ C校舎26会場

小腸における新規小胞体ストレス応答遺伝子の解析

Novel genes in response to ER stress in small intestine

○Makoto Shimizu、李　娟、丸山　竜人、井上　順、佐藤　隆一郎（東大院・農生化・応生化・食生化）

○Makoto Shimizu, Juan Li, Ryuto Maruyama, Jun Inoue, Ryuichiro Sato (Dept. of Applied Biol. Chem., Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】小胞体ストレスとは、正常な高次構造に折りたたまれなかった異常タンパク質が小胞体に過剰に蓄積する状態である。小胞体ストレスが生じると、ATF6、IRE1、PERKといった小胞体ストレス関連因子が活性化される。これらの因子により、タンパク質の折りたたみ機構の活性化や異常タンパク質の分解・除去などにより、細胞は小胞体の恒常性を維持している。一方、小胞体ストレスは糖尿病や動脈硬化など様々な疾患の発症に関わっている事が報告されている。例えば、パルミチン酸などの飽和脂肪酸は小胞体ストレスを惹起する事が知られており、また肥満・糖尿病のモデルマウスでは、肝臓や小腸などの組織で小胞体ストレスが見られると報告されている。さらに、小胞体ストレスを軽減するケミカルシャペロンと呼ばれる低分子化合物の投与により、肥満・糖尿病モデルマウスのインスリン感受性改善が報告されている。我々は小腸における小胞体ストレスの標的遺伝子が、エネルギー代謝や肥満・糖尿病に対し重要な機能を有しているのではないかと考えた。小腸は脂質成分の吸収を担う組織であり、食事由来の脂質成分が高濃度存在し得る部位である。以上の観点から、小腸細胞における新規小胞体ストレス標的遺伝子の探索及びその機能解析を行った。

【方法】ヒト小腸上皮様細胞Caco-2をモデルとして、小腸細胞の新規小胞体ストレス標的遺伝子の探索を行った。分化させたCaco-2細胞に、小胞体ストレスを惹起する事が知られているThapsigarginを添加し、RNAを回収した。そして、リアルタイムPCR法により脂質代謝に関与する様々な遺伝子の発現を解析した。

【結果】リアルタイムPCR法による解析の結果、Caco-2細胞においてThapsigarginにより従来報告されていなかったいくつかの遺伝子発現が変動する事を確認した。また、小胞体ストレスを惹起する他の因子（Tunicamycin、パルミチン酸）によっても同様に遺伝子発現が変動する事を確認した。その中の１つの遺伝子は、Caco-2細胞においてタンパク質レベルで増加し、マウス小腸においてはmRNAの増加を確認した。さらに、この遺伝子のプロモーター解析を行い、遺伝子上流域に小胞体ストレス応答領域があることを見出した。現在、この遺伝子のプロモーター領域の詳細な検討、及びこの遺伝子の小胞体ストレス経路やエネルギー代謝への関与について解析を行っている。

ER stress, intestine, transcription

講演番号:2C26p16
講演日時、会場:3月23日16:54～ C校舎26会場

核内受容体SHP mRNA安定性に及ぼすブドウ種子プロシアニジン抽出物の効果

Stabilization of small heterodimer partner mRNA by grape seed procyanidins extract in cultured hepatocytes

○井上　順、田中　美奈子、南木　麻奈美、八代　拓也、 Shimizu Makoto、佐藤　隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Jun Inoue, Minako Tanaka, Manami Nanmoku, Takuya Yashiro, Ryuichiro Sato (Dept. of Applied Biol. Chem., Grad.Sch. of Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】ブドウ種子プロシアニジン抽出物(grape seed procyanidins extract, GSPE)は、血中脂質プロファイルの改善効果を有することが知られている。マウスへのGSPE処理により肝臓における核内受容体SHP mRNAレベルが上昇すること、およびSHP欠損マウスではGSPEによる血中脂質プロファイルの改善が見られないことから、GSPEによる血中脂質低下作用はSHP遺伝子の発現亢進を介していると考えられる。しかしながら、その発現亢進機構は明らかになっていない。本研究では、GSPEによるSHP遺伝子の発現亢進機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】ヒト肝ガン由来細胞株であるHepG2細胞にGSPEを処理し、SHP mRNAレベルをリアルタイムPCR法により測定した。GSPE処理後、短時間（1時間）でSHP mRNAレベルが上昇したことから、次に、GSPEがSHP mRNAを安定化させている可能性を検証した。GSPE処理した細胞をアクチノマイシンD存在下でRNA合成を阻害し、SHP mRNAの分解速度をリアルタイムPCR法により測定した。
【結果】HepG2細胞におけるSHP mRNA半減期は約30分であった。HepG2細胞へのGSPE処理はSHP mRNAを安定化した。この安定化は一過的であり、GSPE処理後2時間でその効果は消失した。効果が消失したGSPEを含む培地を新しい細胞に処理すると、SHP mRNAの安定化が再び観察されたことから、GSPEの一過的な効果はその有効成分が消失するためではなく、細胞側の応答が消失することにより起こると考えられる[1)]。

1) J. Inoue *et al. Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 1052-1058. (2011)

SHP, GSPE, mRNA

講演番号:2C26p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ C校舎26会場

培養骨格筋細胞におけるAMPKの機能解析

Functional analysis of AMPK in cultured skeletal muscle cell

○佐々木　崇、Shimizu Makoto、井上　順、佐藤　隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Takashi Sasaki,Makoto shimizu,Jun Inoue,Ryuichiro Sato
(Dept. of Applied Biol. Chem., Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】AMPKは飢餓や運動などの刺激により活性化し、脂質代謝や糖代謝を調節する働きを持つセリン・スレオニンキナーゼである。それゆえ、抗肥満、抗糖尿病効果が想定され、現在注目を浴びている。今回我々は人体で最大のエネルギー消費器官である骨格筋に着目し、骨格筋中のAMPKの新たな機能を解明する事を目的として研究を行った。
【方法】マウス由来筋細胞C2C12において、AMPK活性化剤AICARの投与や、低グルコース培養によりAMPKを活性化させ、遺伝子発現、タンパク質発現の変化を解析した。また、レンチウィルスを用いてPPARγの過剰発現、及びノックダウンを行い、筋細胞におけるPPARγの機能を解析した。
【結果】未分化C2C12筋芽細胞、および分化後C2C12筋管細胞の双方において、AMPKの活性化が核内受容体PPARγの発現を亢進する事を明らかにした。骨格筋で発現上昇したPPARγはLPLの発現を誘導するため、AMPK活性化による脂質代謝改善作用においてPPARγが重要な役割を担う事が示唆された。更にPPARγは筋細胞におけるIL-6の発現調節にも寄与する事が分かったが、これは分化前の筋芽細胞特異的な応答であり、筋分化の前後でPPARγの機能が変化した事によるものと考えられる。

AMPK,PPARγ,skeletal muscle

講演番号：2C26p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ C校舎26会場

Lactobacillus reuteri 腸管付着因子と受容体様因子の相互作用

Interaction of adhesion factor of *Lactobacillus reuteri* with the receptor-like molecules

○上野　仁美、松尾　洋輔、小林　達哉、岡田　早苗、佐藤　英一（東農大応生科・化学）
○Hitomi Ueno、Yosuke Matsuo、Tatsuya Kobayashi、Sanae Okada、Eiichi Satoh
(Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr.,)

【目的】*L. reuteri* は腸管付着因子の一つとしてブタ胃粘液に付着性を示すMapAを有している。すでに粘液とMapAが結合することは明らかであるものの、その結合様式の詳細は未だ不明である。MapAが塩基性タンパク質であること、ABCトランスポーターの構成要素の一つであることから、筆者はMapAと粘液の結合がレクチン様の作用とは異なる結合を示すのではないかと考えた。そこで、本研究ではBIACOREを用いた表明プラズモン共鳴解析により、粘液に対するMapAの親和性や解離速度を求めることで結合の詳細を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】まず、アナライトとして使用するMapAを*E. coli* M15に発現させ、アフィニティークロマトグラフィーおよび限外濾過膜を用いて精製した。リガンドの調製にはブタ胃ムチン粗精製品を使用し、アルカリ還元分解法で粘液構成糖鎖を分離後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより糖鎖画分を回収した。その後、ブタ胃ムチン、粘液構成糖鎖をそれぞれセンサーチップC1へ固定化した。37℃、pH7.5の条件におけるMapA(20μg/ml)との相互作用解析の結果、ブタ胃ムチンに対するMapAの結合量が23.7RU(ブタ胃ムチン1000RUあたり66.3RU)、粘液構成糖鎖に対するMapAの結合量が6.2RU(粘液構成糖鎖1000RUあたり473.3RU)であった。以上の結果から、MapAと粘液との結合に糖鎖が重要な役割を示すことが示唆された。さらに各pHにおけるMapAとブタ胃ムチンの結合量の変化を検討した結果、pH6.8付近で最大の結合量を示した。また、pHの低下にともない結合量は減少し、pH4.5以下でネガティブコントロールとして用いたBSAと変わらない程度に結合性が消失した。一般的に粘液構成糖鎖の末端にはシアル酸が多く存在しており、粘液は負に帯電することが知られている。また、今回行ったブタ胃ムチンをセンサーチップに固定化する際の条件検討においても、ブタ胃ムチンの等電点がpH5.5~6.0であると推測され、MapAと最大の結合量を示したpH6.8付近においてブタ胃ムチンが負に帯電していることが示唆された。以上のことから等電点の高いMapAが粘液に対して電気的な結合をすると推察され、レクチン様の結合機構とは異なり、柔軟性に富んだ分子間結合を示すことが示唆された。現在、各pH条件におけるMapAと、ブタ胃ムチンおよび粘液構成糖鎖との結合について現在更なる解析を進めている。

Lactobacillus reuteri,Mucin,Adhesion

講演番号:2C26p19
講演日時、会場:3月23日17:37～ C校舎26会場

慢性閉塞性肺疾患（COPD）動物モデルを用いた病態進行における栄養状態の変化

Change of blood nutritional state in COPD animal models

○大塩 和孝、中村 浩彦、難波 和美、関根 一則、高瀬 光徳（森永乳業・栄科研）
○Kazutaka Oshio, Hirohiko Nakamura, Kazuyoshi Namba, Kazunori Sekine, Mitsukonri Takase (Nutritional Science Institute, Morinaga Milk Industry co.,Ltd)

【背景と目的】

COPDは肺胞破壊を発端として呼吸不全に至る疾患であり，作用機序が解明されていない部分も多い。

病態進行においては肺組織の炎症が直接的な原因であるが，栄養不良，全身性炎症等の関与も大きい。COPD動物モデルにおいては，気管支肺胞洗浄液(BALF)や呼吸機能検査による評価が行われるが，栄養状態の報告は稀である。今回実験動物を用いて，COPDの病態進行に伴う栄養指標の変化を検討した。

【方法】

エラスターゼ投与モデルと喫煙モデルを用い肺気腫(COPD)の病態進行について検討を行った。エラスターゼ投与モデルでは，Wistarラット（オス,7週齢）を用い，投与群に34unit/匹の豚膵臓由来エラスターゼを気管内に投与，対照群に生理食塩水を気管内に投与し，3週間後に解剖を実施した。喫煙モデルでは， Wistarラット（オス,30週齢）を用い，煙暴露群に1時間/日，5日/週，30週間のたばこ煙暴露を行い，対照群に外気暴露を行った。それぞれ，肺組織の病理，血清アミノ酸組成，血算（白血球数，赤血球数，血小板数等），白血球分画（好中球等，リンパ球，単球）等について検討を行った。

【結果と考察】

エラスターゼ投与群の33%において，組織評価により肺気腫を確認した。肺気腫発症個体（肺気腫群），エラスターゼ投与したが肺気腫が確認されなかった個体（前肺気腫群），生理食塩水を投与した個体（対照群）において比較を行った。血算結果より，肺気腫群，前肺気腫群は対照群と比べて白血球数の減少が観察され，血小板数においても減少傾向が観察された。白血球分画では，肺気腫群，前肺気腫群は対照群と比べてやや好中球比率が増え，リンパ球比率の減少傾向が見られたが統計的な差は認められなかった。血清アミノ酸組成では，肺気腫群は前肺気腫群に比べ，BCAAやいくつかの特定のアミノ酸に減少傾向が観察された。

喫煙モデルでは肺気腫の誘導を確認できなかったが，喫煙の継続により徐々に脂肪量・筋肉量等の減少が観察され，アミノ酸組成（BCAA），白血球分画に変化が見られた。

以上の結果から，これらのCOPDモデルにおいてもヒト同様にBCAA等の変化が観察され，アミノ酸組成や血算等の変化を伴い，病態進行に伴い栄養状態が悪化する可能性が示唆された。

copd, nutrition, animal model

講演番号：2C27a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ C校舎27会場

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来鉄結合タンパク質 TTHA1628 のＸ線結晶構造解析

Crystal Structure of TTHA1628, a Ferric Ion-Binding Protein from *Thermus thermophilus* HB8, Reveals a Novel Mechanism of Coordination to a Ferric Ion

尾方　美沙樹、○堀田　彰一朗、大塚　淳、岡田　晃季[1]、永田　宏次、田之倉　優
（東大院農生科・応生化、[1]東大院理・生化）

Misaki Ogata, Shoichiro Horita, Jun Ohtsuka, Akitoshi Okada, Koji Nagata and Masaru Tanokura (Univ. of Tokyo)

【目的】鉄は酸素運搬、電子伝達、エネルギー生産、DNA合成など、種々の生命現象を担う重要タンパク質の必須成分であり、生物にとって必要不可欠である。生物は鉄を細胞外から細胞内に効率的に取り込む手段として、鉄輸送体タンパク質を利用している。本研究は、高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8由来の推定鉄輸送体のリガンド結合サブユニットTTHA1628の分子構造と機能に着目した。TTHA1628と類似のアミノ酸配列をもつタンパク質は、ヒトなどの高等生物にはなく、病原菌等の原核生物にのみ保存されているため、TTHA1628の構造情報は薬剤開発に役立つと期待される。そこで、TTHA1628の立体構造を決定すべく、Ｘ線結晶構造解析を行った。
【方法・結果】TTHA1628について発現系の構築、発現、精製、結晶化を行った。Ｘ線照射実験により、鉄結合型、鉄非結合型の結晶においてそれぞれ最高分解能1.7 Å 、1.8 Åの回折データを取得した。分子置換法を用いた解析によりTTHA1628の鉄結合型、鉄非結合型の構造決定に成功した。さらに、ICP発光分光法（ICP-AES）とX線吸収微細構造測定（XAFS）による含有金属成分分析により、TTHA1628が鉄結合能を有していることを実証した。本発表では、ホモログとの構造比較を通して、TTHA1628の特徴的な鉄認識機構について報告する。

ABC transporter, ferric ion-binding protein, X-ray crystallography.

講演番号：2C27a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ C校舎27会場

ALG-2とCOPⅡ小胞構成因子 Sec31Aの結合領域ペプチドとの複合体のX線結晶構造解析

X-ray crystal structural analyses of the complex between ALG-2 and its binding region peptide of COPⅡ vesicle component Sec31A

○高橋　健、犬塚　達俊、鈴木　博紀[1]、伊藤　優、川崎　政人[1]、
若槻　壮市[1]、柴田　秀樹、牧　正敏（名大院生命農・応用分子生命科、[1]高エネ研・物構研）
○Takeshi Takahashi, Tatsutoshi Inuzuka, Hironori Suzuki[1], Masaru Ito, Masato Kawasaki[1], Soichi Wakatsuki[1], Hideki Shibata, and Masatoshi Maki
(Dept.Appl.Mol.Biosci.,Grad.Sch.Bioagric.,Sci.,Nagoya Univ. [1]Struct. Biol. Res. Cen., KEK)

【目的】カルシウム結合モチーフの 1 つである EF-hand 構造を分子内に 5 回繰り返してもつ Ca^{2+}結合タンパク質 ALG-2 (apoptosis linked gene-2) は，カルシウムの結合により 5 番目の EF-hand (EF5) を介してダイマーを形成する．また，ALG-2 は細胞内小胞輸送に関与している Alix や小胞体-ゴルジ体間輸送の被覆小胞（COPⅡ小胞）構成因子である Sec31A を始めとする様々な因子とカルシウム依存的に相互作用することが報告されている．これらの ALG-2 結合タンパク質は一般に Pro に富んだ疎水性領域をもつが，その領域に含まれる ALG-2 結合モチーフ (ABM：ALG-2 biding motif) は大きく 2 つのタイプに分類される．一つ目は PPYP モチーフをもつ ABM-1 タイプ，二つ目は PXPGF モチーフを持つ ABM-2 タイプである．我々は ABM-1 を含む Alix ペプチドと ALG-2 複合体結晶構造をすでに解明している．(H.Suzuki *et al.* (2008) ***Structure***）しかし, ABM-2 を含むタンパク質がどのようなメカニズムで ALG-2 と結合するか，その構造的基盤は不明であった．そこで，ABM-2 の認識機構を分子レベルで明らかにするために，ABM-2 を含む Sec31A ペプチドと ALG-2 複合体の X 線結晶構造解析を行なった．
【方法】BL21(DE3) pLysSにN端を切断したALG-2 (des3-20ALG-2)を発現させ，アフィニティクロマトグラフィー，ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した．des3-20ALG-2とSec31Aペプチド（NPPPPGFIMHGN）を 1：2 のモル比で混合した試料を，蒸気拡散平衡法により結晶化し，Photon Factory AR-NE3A にてX線回折測定を行なった．
【結果】X線回折実験の結果，2.36 Å分解能で構造解析に成功した．今回，明らかにしたSec31Aペプチド/des3-20ALG-2複合体結晶構造をAlixペプチド/des3-23ALG-2複合体結晶構造と比較すると，両者の間で結合様式に相違がみられた．Alixペプチド結合領域は EF3-EF5 間で形成される疎水性ポケットであるのに対し, Sec31Aペプチドは 主としてEF1-EF3 間に存在するLeu52, Phe85，Trp89，Ile92，Phe148によって形成される疎水性ポケットに深く入り込んでいた．この結果により， 121番目のGlyと122番目のPheが欠損した選択的スプライシングアイソフォームである$ALG\text{-}2^{\Delta GF122}$がAlixとは結合しないのに対し，Sec31Aとは結合する理由が構造生物学的に説明できる．現在，ALG-2 単体構造との比較から，ALG-2 のALG-2/Sec31Aペプチド間の結合メカニズムについて解析中である．

ALG-2, Sec31A, X-ray crystal structure

講演番号：2C27a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ C校舎27会場

クラゲコラーゲンペプチドの皮膚への効果

Effect of jellyfish collagen peptides for skin

○猪爪 優子[1,2]、番戸 博友[2]、益田 晶子[1]、松田 光夫[2]、堂前 直[1]（[1]理研バイオ解析、[2]日華化学）
○Yuko Inotsume[1,2], Hirotomo Banko[2], Akiko Masuda[1], Mitsuo Matsuda[2], Naoshi Dohmae[1]
([1]RIKEN ASI, [2]NICCA CHEMICAL)

【目的】

コラーゲンをペプチド化することで、様々な生理活性ペプチドが生じることが判明している。廃棄物の資源物化を目的として、発電所等から生じる産業廃棄物であるクラゲからコラーゲンを抽出し、有用ペプチドを得るプロジェクトをスタートした。

我々は、固体酸触媒によるタンパク質からアミノ酸への分解方法を確立している。その手法を応用し、固体酸触媒により分子量を制御したクラゲコラーゲンペプチドを得た。また、複数の酵素を組み合わせることによって、単独分解とは異なる特徴を有するクラゲコラーゲンペプチドを得ることができた。本研究では、固体酸触媒分解、酵素複合分解によるクラゲコラーゲンペプチドの皮膚への効果を検討した。

【方法】

スルホプロピル基を有する陽イオン交換樹脂を固体酸触媒として用いてクラゲコラーゲンを分解し、その反応温度、時間を変化させて分子量分布の異なるクラゲコラーゲンペプチドを作製した。酵素によるクラゲコラーゲンの分解は、数種の酵素を組み合わせて、分解状態の異なるクラゲコラーゲンペプチドを作製した。

ペプチドの機能は、不死化したケラチノサイト（PHK16-0b）にて細胞増殖試験、角質層の架橋タンパク質をウエスタンブロットによるタンパク質定量や real-time PCR 法を用いた mRNA 発現量測定にて確認した。

【結果】

クラゲコラーゲンを固体酸触媒分解、酵素複合分解することで得られたコラーゲンペプチドは、不死化したケラチノサイトにおいて高い細胞増殖効果、架橋タンパク質の発現が認められた。老化や炎症によるターンオーバー速度異常、架橋タンパク質の減少に伴う、皮膚バリア機能の低下の回復に効果が期待できる。今後、皮膚バリアに関する機能をさらに検討する予定である。

Collagen, Jellyfish, Keratinocyte

講演番号：2C27a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ C校舎27会場

ニワトリpeptidylarginine deiminase type Ⅰの酵素化学的性質の解析と組織発現

Characterization and tissue expression of chicken peptidylarginine deiminase type Ⅰ

○清水 明[1]、小島 俊雄[1,2]、高原 英成[1,2]（[1]東農工大院・連合農学、[2]茨城大・農）
○Akira Shimizu[1], Toshio Kojima[1,2], Hidenari Takahara[1,2]（[1]Tokyo Univ. Agri. and Tech., [2]Ibaraki Univ.）

【目的】Peptidylarginine deiminase（PAD）は脊椎動物に広く存在する翻訳後修飾酵素であり、Caイオン存在下でタンパク質中のArg残基をCit残基に変換することにより、多様な機能を発揮している。鳥類（ニワトリ）では3つのPAD遺伝子が存在し、これらはそれぞれ哺乳類が有する5つのPAD遺伝子のうちのtype Ⅰ、Ⅱ、Ⅲと相同する。先に我々は、ニワトリ脳および網膜の視細胞にtype Ⅲが発現していること、また、Cit化した標的タンパク質が視細胞に存在することを明らかにした。しかしながら、type Ⅲ以外の鳥類PADについては全く研究がなされていない。最近、我々はニワトリ網膜においてtype Ⅰおよびtype Ⅱも転写レベルで発現していることが確認されたことから、これらのPADのcDNAクローニングによる全塩基配列の決定および組換え型酵素の発現系の構築を行った。その結果、type Ⅰは活性を持つ組換え型酵素の作製に成功したが、type Ⅱでは活性のある酵素を得ることが出来なかった。そこで本研究では、ニワトリPAD type Ⅰの機能、性質および組織局在性を調べ、他のPADと相互比較することによりニワトリPAD type Ⅰの役割を解明することを目的とした。
【方法および結果】バキュロウィルスを用いた6×His-tag融合型組換え酵素の昆虫細胞発現系の構築を行い、Niカラムアフィニティークロマトグラフィーにより精製した結果、高純度かつ高活性を有する組換え型酵素の調製に成功した。ついで作製した組換え型酵素の酵素化学的性質として、Caイオンに対する反応性および基質特異性について調べた結果、既知のPADと同様、Caイオン完全要求性であり、哺乳類PAD type Ⅰと類似した基質特異性を有していることがわかった。また、半定量的RT-PCRを用いてtype Ⅰの転写レベルでの組織発現分布を調べた結果、脳、網膜以外にも多くの組織で転写されていることがわかった。一方、翻訳レベルでの発現をtype Ⅰ特異抗体を作成しウエスタン分析をした結果、type Ⅰは脳および網膜でのみ翻訳されていることが明らかとなった。加えて、同分析で検出された抗体陽性バンドはSDS-PAGE上で推定分子量よりも見かけ上約9.4 kDa小さく、このSDS-PAGE上における抗体陽性バンドの挙動は還元剤の有無では変化がなかった。そこで現在、type Ⅰ特異的抗体を用いた免疫沈降法により組織抽出液から本酵素タンパク質を分離精製し、その酵素の構造、活性等について検討を進めている。

Peptidylarginine deiminase, post-translational modification, chicken

講演番号:2C27a05
講演日時、会場:3月23日09:44～ C校舎27会場

importinα断片をタグに用いた生細胞内での蛍光蛋白質の2量体形成傾向の簡便な評価法

A rapid and simple method to evaluate dimeric tendency of fluorescent proteins in living cells using a truncated protein of importin α as a fusion tag

○中川　千雅、西村　重徳、村田　香織、杉本　憲治(阪府大院・生命環境)
○Chika Nakagawa, Shigenori Nishimura, Kaori Murata, Kenji Sugimoto (Grad. sch. of life and environ. sci., Osaka pref. univ.)

【目的】緑色蛍光蛋白質 EGFP や黄色蛍光蛋白質 Venus は細胞内で弱いながらも相互作用し 2 量体を形成することが知られている。以前、我々は、importinαの N 末欠損断片(251-529 aa)と赤色蛍光蛋白質 DsRed との融合蛋白質を細胞内で発現させると、核膜(周縁)に局在性を示すことを報告している[1-3]。この importinαの N 末欠損断片と各種蛍光蛋白質との融合蛋白質が核膜に局在性を示す細胞の割合は、その蛍光蛋白質の自己会合能に依存するように思われた。そこで、この importinαの N 末欠損断片をタグに用いる評価系を構築し、Venus のモノマー変異体を作製することを試みた。
【方法】Venus の立体構造を基に、ダイマーインタフェース間に存在し、2 量体形成での疎水性相互作用にかかわるアミノ酸(A206、L221、F223)を予想した。これらは、黄色蛍光蛋白質 YFP の 2 量体形成を抑制し、その *in vitro* での結合定数が報告されている変異体(A206K、L221K、F223R)[4]のアミノ酸残基と一致していた。そこで、これらの塩基性アミノ酸に置換した Venus 変異体を作製し、マウス C3H 細胞に発現させ、importinαの N 末欠損断片との融合蛋白質が核膜に局在性を示す細胞の割合を調べた。続いて、これらの疎水性アミノ酸を側鎖長が大きく異なる別の疎水性アミノ酸[5](A206L、L221A、F223A)に置換し、同様に、核膜に局在性を示す細胞の割合を調べた。
【結果】4 量体の赤色蛍光蛋白質 DsRed、弱い 2 量体を形成する EGFP、Venus、単量体とされる赤色蛍光蛋白質 mCherry、オレンジ蛍光蛋白質 mOrange に融合させた importinαの N 末欠損断片が核膜に局在性を示す細胞の割合は、それぞれ 100%、64%、71%、37%、32%であった。Venus の塩基性アミノ酸置換型変異体(A206K、L221K、F223R)と疎水性アミノ酸置換型変異体(A206L、L221A、F223A)の核膜に局在性を示す細胞の割合は 53-58%まで減少した。新たな疎水性アミノ酸置換型変異体(A206L)は、既知の塩基性アミノ酸置換型変異体(A206K)と同程度に Venus の 2 量体形成を抑制した(Nakagawa et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., in press)。

1. Sugimoto et al., Cell Struct. Funct., 27:457-467 (2002)
2. Fukada et al., BioTechniques, 37:552-556 (2004)
3. Sugimoto et al., Mut. Res., 657:56-62 (2008)
4. Heim et al., Nature 373:663-664 (1995)
5. Nakagawa et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 75:1399-1401 (2011)

fluorescent protein, dimer, importin alpha (importin α)

講演番号：2C27a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ C校舎27会場

ヒト ABCG1 の精製および活性評価

Purification of human ABCG1 and it's functional analysis.

○平山裕士[1)]、木村泰久[1)]、松尾道憲[1)]、木岡紀幸[1)]、植田和光[1),2)]（[1)]京大院農・応用生命,[2)]京大 iCeMS）

○Hiroshi Hirayama[1)]、Yasuhisa Kimura[1)]、Michinori Matsuo[1)]、Noriyuki Kioka[1)]、 Kazumitsu Ueda[1),2)]（[1)]Division of Applied Life Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.、[2)]Kyoto Univ. iCeMs）

【背景・目的】末梢組織における過剰なコレステロールの蓄積は動脈硬化症の一因となる。ABCG1 は末梢組織において HDL 前駆体にコレステロールやスフィンゴミエリンを排出し、過剰なコレステロールの蓄積の抑制に重要であることから、高脂血症の治療薬の開発ターゲットとして注目されている。ABCG1 は ABC タンパク質ファミリーに属する膜タンパク質であり、2 量体を形成して機能する。これまでの ABCG1 の研究は主に遺伝子欠損動物や培養細胞などの系が中心であるが、ABCG1 の機能を理解し高脂血症の治療薬開発につなげるためにはさらに精製タンパク質を用いた解析が必須である。しかし膜タンパク質である ABCG1 の発現には高度な品質管理機構が必要であり、大腸菌や昆虫細胞などを用いた発現系では発現が困難であった。また、適切な界面活性剤を選抜するための方法が確立されていないこともあり、精製に成功した報告はない。

本研究では大量培養が可能な哺乳類細胞と蛍光ゲルろ過を用いた界面活性剤選別法に（FSEC）より、ヒト ABCG1 の精製の最適化を行った。さらに精製標品を用いた解析により ABCG1 の生化学的特徴を明らかにすることを試みた。

【方法・結果】浮遊培養が可能なヒト由来 FreeStyle293 細胞にヒト ABCG1 を一過性の遺伝子導入手法により発現させた。さらにバイオリアクターを用いた培養技術の開発から培養量を 3 L まで増大させた。また GFP 融合型 ABCG1 と蛍光ゲルろ過法により精製に用いる界面活性剤を選抜した。次いで界面活性剤 DDM で可溶化した膜画分を抗 Flag 抗体による 1 段階精製したところ、純度 90%での精製標品が得られ、精製後も 2 量体構造を維持していた。収量は培養細胞 1 L あたり 30μg であった。

精製 ABCG1 はリポソームに再構成した ABCG1 場合にのみ ATP 加水分解活性を示し、150 nmol/min/mg 程度の活性を示した。また精製標品は、リポソームに再構成した場合にのみ活性を示したことから、ABCG1 の活性には脂質二重膜環境が必要であることが明らかとなった。さらにリポソームにスフィンゴミエリンを加えた場合に ABCG1 の ATP 加水分解活性が上昇した。他の ABC タンパク質において輸送基質の添加により ATP 加水分解活性が上昇することが報告されており、スフィンゴミエリンが ABCG1 の基質であることが示唆された。

ABCG1, ABC transpoter, ATPase activity

講演番号：2C27a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ C校舎27会場

ヒト培養細胞を用いた哺乳類膜タンパク質大量生産系-K_{ATP}チャネル複合体の精製-

Large scale production and purification of mammalian membrane proteins in human cells – purification of K_{ATP} channel complex –

○木村泰久[1]、菅野亮[2]、松尾道憲[1]、木岡紀幸[1]、光岡薫[3]、加藤博章[4]、植田和光[1,5]([1]京大院・農・応用生命、[2]JBiC、[3]産総研、[4]京大院・薬、[5]京大iCeMS)

○Yasuhisa Kimura[1], Ryo Kanno[2], Michinori Matsuo[1], Noriyuki Kioka[1], Kaoru Mitsuoka[3], Hiroaki Kato[4], Kazumitsu Ueda[1,5]([1]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch.of Agri., Kyoto Univ.、[2]JBiC、[3]AIST., BIRC、[4]Grad.Sch.of Pharm., Kyoto Univ.、[5]iCeMS., Kyoto Univ.)

【目的】膜タンパク質はヒトの遺伝子の約30%を占め、生体内の多くの反応で重要な役割を果たしている。また既存の薬剤の実に50%が膜タンパク質を作用点とする事からも明らかなように、重要な創薬対象でもある。膜タンパク質の機能を理解し、創薬に応用するにはタンパク質の生化学的、構造生物学的な解析が必須である。しかし哺乳類の膜タンパク質の発現には高度な翻訳後修飾機構が必要であり、大腸菌や昆虫細胞など既存の発現系では発現自体が困難である事が多い。我々は浮遊培養が可能なヒト培養細胞を用いて大量発現系の構築を行い、哺乳類膜タンパク質およびその複合体に適した大量発現、精製系を構築した。本研究で解析の対象としたATP感受性カリウムチャネル（K_{ATP}チャネル）はチャネルサブユニットと制御サブユニットが4分子ずつ結合した巨大な膜タンパク質複合体(分子量900kDa)であり、インスリン分泌など生理的に重要な反応を担う。このため創薬等の分野からも生化学的な解析が希求されていたが、有効な精製手法は開発されていなかった。本研究ではヒト培養細胞大量発現系を用いてK_{ATP}チャネルを精製し、電子顕微鏡単粒子解析によりチャネル複合体の全体構造の決定を行った。

【方法・結果】本研究では大量の発現細胞を取得するため、浮遊培養が可能なヒト培養細胞FreeStyle293細胞を用いて大量発現系の構築を行った。まず一過性発現に用いる遺伝子導入試薬の検討を行った。その結果、カチオン性ポリマーであるポリエチレンイミンを用いた場合に最も導入遺伝子の発現が高く、ほぼ市販試薬に匹敵する発現量を得られる事が明らかとなった。同時に遺伝子導入に必要なコストを1/500に抑制することに成功した。次いでバイオリアクターを用いた発現系の培養システムの開発から3Lの培養スケールを達成した。

精製はFlag-tagを用いた一段階の抗体精製によって行った。精製標品の純度は約90%であり、1段階の精製としては比較的高純度の精製手法が確立できた。精製標品の生化学的解析から、精製K_{ATP}チャネルは8量体構造を維持している事が明らかとなった。また精製標品はATP結合能を有していたことから、機能的な3次元構造を保持している事が示唆された。次いで精製標品の電子顕微鏡像から平均像を作成し全体構造の決定を行った。この結果K_{ATP}チャネルの制御サブユニットが2つのドメインから形成されることが明らかとなり、チャネルサブユニットと相互作用している様子を捉えることに成功した。本研究で構築した手法は多くの膜タンパク質に応用可能であり、哺乳類の膜タンパク質およびその複合体の発現手法として期待される。

Membrane protein, ABC transporter, purification

講演番号：2C27a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ C校舎27会場

カイコ絹糸腺由来転写制御因子FMBP-1の蛍光相関分光法による解析

FCS analysis of transcription factor FMBP-1 derived from silkworm silk gland

○堤 元佐、明庭 昇平、武藤 秀樹[1]、木本 舞[2]、神谷昌克、菊川峰志、相沢 智康、滝谷 重治[2]、金城 政孝[1]、出村 誠、河野 敬一（北大院生命・生命科学、[1]北大院先端生命・細胞機能、[2]北大院理・生物科学）

○Motosuke Tsutsumi, Shohei Myoba, Hideki Muto, Mai Kimoto, Masakatsu Kamiya, Takashi Kikukawa, Tomoyasu Aizawa, Shigeharu Takiya, Masataka Kinjo, Makoto Demura, Keiichi Kawano (Dept. Life Sci., Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ., [2]Lab. Mol. Cell. Dyn., Fac. Adv. Life Sci., Hokkaido Univ., [3]Dept. Biol. Sci.,Fac. Sci., Hokkaido Univ.)

【目的】カイコガ*Bombyx mori*の絹糸腺から見出されたfibroin-modulator-binding protein-1 (FMBP-1)は、フィブロインH鎖遺伝子の上流とイントロン内の転写制御領域に結合する因子である。FMBP-1は218個のアミノ酸から成り、その配列の特性からいくつかの部位に区分される。C末端側に含まれる相同性の高い4つの23アミノ酸残基のリピート配列から成るタンデムリピート構造は特に興味深い。この部位はone score and three amino acid peptide repeat (STPR)ドメインと呼ばれ、FMBP-1のDNA結合能に関わることがこれまでの研究で示唆されている。これほど相同性の高いタンデムリピート構造を持つ転写調節因子は知られておらず、STPRドメインは新奇のDNA結合モチーフとして非常に興味深い。本研究では、蛍光相関分光法（FCS）を用いることで細胞内におけるSTPRドメイン等のFMBP-1の各部位の機能に関する検討を行うことを目的とした。
【方法】高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP）とFMBP-1の融合タンパク質(EGFP-FMBP-1)及びその変異体を作製し、FCSを用いて生細胞内でFMBP-1の動態解析を行った。本研究ではHeLa細胞での解析に加えて、天然でFMBP-1が発現される絹糸腺細胞でのFCS解析を試みた。
【結果】HeLa細胞での観察の結果、EGFP-FMBP-1は核に局在し、それぞれ異なる拡散特性を持つ3つの成分が存在することが示された。このうち蛍光褪色成分はEGFP-FMBP-1がDNAと特異的に結合し、FCS測定のタイムスケールにおいて殆ど動かない成分である可能性が示唆された。EGFP-FMBP-1の変異体を用いて野生型と同様の方法で各部位の機能を検証した結果、STPRドメインはDNAとの相互作用に重要であることが明確に示され、さらに隣接するhyper-basic regionとともにFMBP-1の核移行にも関わることが示唆された。また、*Bombyx mori*後部絹糸腺細胞でのEGFP-FMBP-1野生型及び変異体のFCS解析の結果でもHeLa細胞における解析と同様の傾向が確認され、FMBP-1の各部位の機能を同定することに成功した。

silkworm, transcription factor, FCS

講演番号：2C27a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ C校舎27会場

UHRF1は受動的DNA脱メチル化後のDNA損傷誘導に関与する

UHRF1 is involved in DNA damage-induction after passive DNA demethylation

○杉村　和人[1]、来馬　啓介[2]、杉浦　健太[2]、緒方　正人[1]、奥村　克純[1、3]（[1]三重大院・生資、[2]三重大院・医、[3]三重大院・地域イノベ）

○Kazuto Sugimura[1], Keisuke Kuruma[2], Kenta Sugiura[2], Masato Ogata, Katsuzumi Okumura[1,3] ([1]Grad. Sch. Med, [2]Grad. Sch. Biores., [3]Grad. Sch. Regional Innov., Mie Univ.)

【目的】DNAのメチル化は，遺伝子発現やクロマチン構造の制御に関わるエピジェネティック修飾のひとつである。一方、DNA methyltransferase 1 (DNMT1) の欠損や減少によりゲノムワイドなDNAの脱メチル化（受動的DNA脱メチル化）が引き起こされるが、同時にDNA損傷が誘導される。このことから、DNAメチル化はゲノム安定性に寄与していると考えられている。しかし、DNMT1の欠損や減少がどのようなメカニズムによりDNA損傷を誘導するかについては不明である。

【方法】 DNMT1をノックダウンした細胞、またはDNMT阻害剤5-aza-2’-deoxycytidine (5-aza-dC)で処理した細胞を用いて、DNA損傷マーカーであるγ-H2AXの免疫染色、またはコメットアッセイによりDNA損傷レベルを解析した。受動的DNA脱メチル化のDNA複製への影響を解析するために、Molecular Combing法により複製フォーク進行速度の解析を行った。UHRF1の関与が考えられたため、UHRF1をノックダウンした細胞でも同様の解析を行った。

【結果】 DNMT1をノックダウン、または5-aza-dCで阻害した細胞では、DNA損傷マーカーであるγ-H2AXレベルが有意に上昇し、細胞増殖活性はp53依存的に遅延した。また、DNA損傷が誘導されるのは、主にDNA複製中のS期の核であることから、S期特異的にDNA損傷が誘導されていることが示唆された。そこで、複製フォーク進行への影響を解析したところ、DNMT1をノックダウン、または5-aza-dCで阻害した細胞では複製フォークの進行速度が有意に遅延していた。DNMT1阻害後、どのようなタイミングでDNA損傷が誘導されるかを、細胞周期を同調した細胞で解析したところ、DNMT1阻害後2度目のS期でDNA損傷が誘導されていることがわかった。このタイミングは、親鎖のみがメチル化されたヘミメチル化DNAがDNA複製の鋳型として生じる時期と一致した。このことから、ヘミメチル化特異的結合タンパク質UHRF1の関与を推測した。DNMT1ノックダウン、阻害剤処理細胞ではUHRF1のクロマチン結合量が増加し、DNA損傷領域とも共局在した。そこで、DNMT1とUHRF1を同時にノックダウンした細胞でDNA損傷レベルを解析したところ、有意にDNA損傷レベルは低下した。また、DNMT1ノックダウンにより遅延した複製フォークは、UHRF1を同時にノックダウンすることにより有意に回復した。さらに、DNMT1阻害後のDNA損傷誘導には、UHRF1のヘミメチル化DNA結合ドメイン、SRAドメインが重要であることがわかった。以上のことから、受動的DNA脱メチル化により生じたヘミメチル化DNAへの異常なUHRF1の結合が複製フォーク進行を阻害し、それに引き続いて起こるDNA複製依存的DNA損傷を誘導していることが示唆された。

Passive DNA demethylation, DNA damage, UHRF1

講演番号:2C27a10
講演日時、会場:3月23日10:49～ C校舎27会場

タイトル　『ウナギシトクロムP450の機能解析』

○山本　貢平[1]、梶　悟[1]、小倉　千佳[1]、金丸　研吾[1]、山形　裕士[1]、上西　由翁[2]、板倉　隆夫[2]、宇野　知秀[1]([1]神戸大・農、[2]鹿大・水)

【目的】環境中に放出された汚染物質は、空気中や土壌中のものも雨の働きで最終的には水圏に移行するため、魚類を含む水生生物は、陸生生物と比べて特にこれらの化学物質による影響を受けやすい。シトクロムP450(Cytochorome P450:CYP)は、多様な化学物質を代謝する酵素として知られており、その中でもCYP1ファミリーは、哺乳動物において、汚染物質の化学物質の代謝を触媒することが知られている。しかし、汚染物質に対する魚類P450の分子種ごとの代謝の報告はない。また、魚類のCYP1ファミリーは、様々な化学物質によりその発現が誘導される。そのため、環境汚染物質に対するバイオマーカーとしてCYP1ファミリーは着目されている。以上の流れから、本研究では、ニホンウナギ(*Anguillus japonica*)のシトクロムP450の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】

(1)ウナギのシトクロームP450であるCYP1A9、CYP1C1、CYP1B1を大腸菌で発現させた。この菌体溶液を用い、薬物であるphenacetin、農薬であるchlorotoluron、diuron、linuron、atrazine、simazineをバイオコンバージョンさせた後、反応産物を酢酸エチルで抽出し、その抽出物をHPLCに供して代謝物を解析した。

(2)抗CYP1A9ペプチド抗血清を作製し、これを用いて、CYP1Aファミリーの代表的な誘導剤であるβ-naphthoflavoneで処理したウナギ、処理していないウナギの肝臓でのCYP1A9タンパク質をイムノブロッティングで解析した。また、ELISAにより肝臓内のCYP1A9タンパク質を定量した。

【結果】

(1)CYP1A9、CYP1C1、CYP1B1は全てphenacetinを代謝した。また、CYP1A9とCYP1C1はchlorotoluron、diuron、linuronのウレア系農薬を代謝したが、atrazine、simazineのトリアジン系農薬はほとんど代謝しなかった。このことからCYP1A9、CYP1C1は実際に汚染物質を代謝することが明らかになった。

(2)CYP1A9を特異的に認識する抗血清が得られ、イムノブロッティングとELISAどちらの方法でも、ウナギ肝臓内でCYP1A9がβ-naphthoflavoneにより強く誘導されることが明らかになった。

以上の結果から、CYP1A9、CYP1C1はウナギ生体内でも汚染物質を代謝することが示唆された。また、CYP1A9は通常ほとんど存在せず、外来性の化学物質によって誘導されるため、汚染物質のバイオマーカーとして有用であることが示唆された。現在、CYP1B1において、農薬であるchlorotoluron、diuron、linuron、atrazine、simazineについての機能解析を行っている。

Keyword1, Keyword2, Keyword3

講演番号：2C27a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ C校舎27会場

上皮組織特異的Lgr4欠損マウスは不妊を示す

Epithelial tissue specific Lgr4 deficient mice showed infertility.

○曽根瑞季、毛利泰彰、大山一徳、加藤成樹、那波明宏[1]、西森克彦（東北大院農・応生科、[1]愛媛大医・生殖病態外科学）

○Mizuki Sone, Yasuaki Mohri, Kazunori Oyama, Shigeki Kato, Akihiro Nawa[1], Katsuhiko Nishimori (Grad. Sch. of Agric. Science, Univ. of Tohoku, [1]Dept. of ObGyn, Grad. Sch. of Med., Univ. of Ehime)

【目的】Lgr4(Leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor)は、近年分泌性 Wnt シグナル経路のアゴニストである R-spondidns をリガンドとすることが報告された GPCR の一種である。Lgr4 以外の Lgr ファミリーとして同定されている FSHR、LHR、relaxin ファミリーのレセプター(Lgr7、Lgr8)は生殖機能に関与することが明らかとなっているが、Lgr4 の詳細な機能は不明である。本研究室において作製された、全身で Lgr4 を欠損させたマウス($Lgr4^{-/-}$)の解析により、$Lgr4^{-/-}$において腎臓発生不全による新生児致死や眼瞼、頭頂部毛包の発生異常などの表現型が初めて見出され、Lgr4 が様々な器官、特に上皮組織において重要な機能を持つことが強く示唆された。しかし新生児致死を示す $Lgr4^{-/-}$では、出生後における表現型の解析が不可能であるため Keratin-5(K5) Cre TG マウスを導入し、上皮組織特異的 Lgr4 欠損マウス($Lgr4^{K5\ KO}$)を作製したところ、歯やマイボーム腺、乳腺の発生不全、さらに雌の不妊という新たな表現型が確認された。そこで雌の不妊に着目し、Lgr4 の雌生殖器官における機能解明を試みた。

【方法】各組織における遺伝子発現は、RT-PCRにより確認した。またK5 Creの活性化部位は、Rosa 26 reporterマウスを用いて、β-galactosidaseの活性をX-gal染色により同定した。組織形態の確認は、HE染色および各細胞のマーカーを用いた免疫染色により行った。

【結果】まず雌生殖器官における Lgr4 の発現を確認したところ、Lgr4 は卵巣、輸卵管、子宮において発現していた。輸卵管および子宮に関しては、K5 Cre の活性化も確認できたことから、輸卵管、子宮に着目し解析を進めた。輸卵管に関しては、$Lgr4^{K5\ KO}$ においても受精は正常に起こるが、卵割が阻害されることにより受精卵が正常に発生できず異常卵になることを明らかとした。一方で野生型マウスの精子と $Lgr4^{K5\ KO}$ の卵を体外受精させたとき、受精卵は正常に発生が進むこと、$Lgr4^{K5\ KO}$ の輸卵管上皮細胞の構造は正常に維持されていることを確認した。従って受精卵の成熟不全は、輸卵管上皮細胞からの成長因子の分泌異常に伴う微小環境の変化によるものであると推測した(Mohri et al.,2010)。我々は子宮についても興味深いデータを得ており、それについても論究する予定である。

Lgr4, infertility, oviduct

講演番号:2C27a12
講演日時、会場:3月23日11:21～ C校舎27会場

RNAi実験を用いた、線虫*C. elegans*のRNA結合タンパク質であるCeMBL遺伝子の選択的スプライシング発現産物が持つ機能の追及

An RNAi experiment for *C. elegans* to knockdown specific splicing isoforms of CeMBL.

○鈴木 俊輔、笹川 昇[1]（東海大工・生命化学）
○Shunsuke Suzuki, Noboru Sasagawa [1] (Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University)

【目的】CeMBL (Muscleblind-like)はCCCH型のジンクフィンガーを持つRNA結合タンパク質である。また、ヒトMBNLと58%の相同性を持っており、ヒトMBNLは筋強直性ジストロフィー(Myotonic Dystrophy ： DM)の症状との関わりが示唆されている。このことから、CeMBLの機能を追究することによってDMの分子機構に何らかの知見が得られると期待される。

CeMBLには選択的スプライシングによって6種類のアイソフォームが存在することが判明している。その中のひとつにはRNA結合ドメインを持たないアイソフォームが存在しており、このアイソフォームはRNA結合能を失っているが、その具体的な機能は不明である。また先行研究により、CeMBL遺伝子破壊株は通常に発生し、寿命が短くなるという表現型を示すことが判明しているが、他国の報告ではCeMBLのRNAiノックダウンによって致死や行動異常という表現型が見られるとされ、得られる表現型に矛盾が生じている。そこで本研究では、CeMBLのエキソン単位でRNAiを行い、その結果得られる表現型の解析を通じて上記の矛盾を解決するとともに、ジンクフィンガーを持たないタイプを含めた各選択的スプライシング産物の機能を追究することを目的としている。

【方法】CeMBLにはエキソンが8個存在する。今回、そのうちの第1エキソンと第2エキソンの配列をそれぞれプラスミドDNA(L4440)にクローニングした。L4440はインサートの両端がT7プロモーターによって挟まれる構造をしており、これによって標的配列のdsRNAを発現することが可能になる。このコンストラクトを大腸菌HT115株に形質転換した後に、IPTG添加のもと発現誘導を行ったものを餌にしてfeeding法によるRNAi実験を行った。そしてその結果得られる表現型変化を注意深く観察するとともに、表現型変化の指標のひとつである寿命を計測するため、ノックダウンした線虫から生まれた卵を0日目と定め、その3日目に5-Fluoro-2'-deoxyuridineを用いて不妊処理を行った。

【展望】現在、ジンクフィンガーを持たないアイソフォームの機能をRNAiを使って解析しているところである。生存確認の計測は線虫に負担をかけないように隔日で行い生死の判断は白金のピッカーで突付いて判断する。今後はCeMBLの各エキソン配列を標的としたRNAiコンストラクトを全て作成し、残った5種類のアイソフォームに対して特異的にRNAiで発現制御を行い機能を追求していきたい。

C. elegans, CeMBL, RNAi

講演番号：2C27a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ C校舎27会場

骨分化誘導タンパク質 NELL1 の多量体形成機構の解析

Analysis of multimer formation of bone-inducing protein, NELL1

○長谷部愛，黒田俊一，新美友章（名大院・生命農）
○Ai Hasebe, Shun'ichi Kuroda, Tomoaki Niimi (Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】脊椎損傷や骨欠損における治療法として，人工骨や人工関節が使用されているが，拒絶反応などの問題から，近年，骨再生医療に注目が集まっている．頭蓋骨縫合線早期癒合症（CS, Craniosynostosis）の患部に高発現する遺伝子として単離された *NELL1* は，同遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスは胎生期に CS 症状を誘導し，また同遺伝子欠失マウスも胎生期に頭蓋骨の形成異常を示すことから，NELL1 は骨分化誘導タンパク質と考えられた．その後，NELL1 組換えタンパク質が，各種骨芽細胞株で骨形成を誘導するとともに，ラットの骨欠損モデルにおいて，硬骨からなる頭蓋骨と，軟骨を経て硬骨へ分化する大腿骨の双方で正常な骨形成を誘導した．以上から，NELL1 タンパク質の骨再生医療への応用が期待されているが，NELL1 の関与する細胞内シグナル伝達機構は，MAPK カスケードが関与する以外，受容体も含めて未解明である．

NELL1 タンパク質は，laminin G (LG) ドメイン, coiled-coil (CC)領域, 4 つの von Willebrand factor C (VWC) ドメイン，6 つの epidermal growth factor (EGF)様ドメインを有し，細胞内で分子間ジスルフィド結合により二量体及び三量体を形成した後，細胞外へ分泌されると考えられている．本研究では，NELL1 タンパク質の多量体形成機構を解明し，NELL1 の骨誘導活性との関係を明らかにすることを目的とした．

【方法】NELL1は，細胞外マトリックスタンパク質であるトロンボスポンジンにドメイン構造が類似していることから，CC領域を介して多量体化していると考えられた．そこで，NELL1の全長を発現するプラスミド，CC領域付近を欠損させた変異体，CC領域内に存在する5つのシステイン残基（Cys220, 227, 230, 267, 269）をそれぞれセリン残基に置換した変異体，また2～4か所をそれぞれセリン残基に置換した変異体を作製した．各プラスミドをヒト293-F細胞に遺伝子導入し，その培養上清を還元および非還元条件のSDS-PAGEとnative PAGEにて解析した．

【結果】全長 NELL1 は二量体および三量体を形成したが，4 つのシステイン残基（Cys227, 230, 267, 269）のうち 3 カ所をセリン残基に置換した変異体は三量体が形成されず，二量体がおもに形成された．CC 領域欠損変異体および 4 つのシステイン残基をすべてセリン残基に置換した変異体では単量体のみとなった．これより，NELL1 は CC 領域を介して多量体化し，4 カ所のシステイン残基が分子間ジスルフィド結合の形成に関与していることがわかった。また，native PAGE においてジスルフィド結合形成の有無に関わらない多量体形成を調べたところ，これらのシステイン変異体の挙動は非還元条件の SDS-PAGE と一致していた．すなわち， NELL1 タンパク質の多量体化には分子間ジスルフィド結合の形成が必須であることが示唆された．現在，多量体構造の骨誘導活性への影響を調べている．

NELL1, Osteogenesis, multimer formation

講演番号：2C27p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ C校舎27会場

CREBとErkの活性化を指標とした恐怖記憶強化及び消去を制御するニューロン集団の同定

Neuronal populations displaying distinct molecular signatures in the hippocampus, amygdala and mPFC in reconsolidation and extinction phases of inhibitory avoidance memory

○張悦、福島穂高、喜田聡（東京農大・農・バイオ、CREST）
○Yue Zhang, Hotaka Fukushima, Satoshi Kida (Dept. of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, CREST)

恐怖記憶想起後には、恐怖記憶を維持させる再固定化と、一方、逆に恐怖記憶を減弱させる消去の二つの相反するプロセスが誘導される。特に、我々の解析から、受動的回避反応課題では、想起後の再固定化は恐怖記憶強化に貢献することが示されている。我々は、想起後の強化（再固定化）と消去が誘導されるメカニズムを解明するために、免疫組織学的発現解析を用いて、受動的回避反応課題における恐怖記憶強化及び消去制御に関わる脳領域の解析を進めてきた。現在までに、恐怖記憶強化及び消去誘導時には、前頭前野、扁桃体において遺伝子発現が誘導され、一方で、海馬では強化誘導時にのみ遺伝子発現が誘導されることを示し、これら３つの脳領域が恐怖記憶強化及び消去において重要な役割を担うことを示唆してきた。現在、これらの脳領域において恐怖記憶強化及び消去を制御するニューロン集団の同定を試みており、本年度はこの結果を報告する。恐怖記憶強化及び消去誘導時の前頭前野、扁桃体、海馬において、蛍光二重免疫染色法を用いてcAMP-responsive element-binding protein (CREB) 及び extracellular signal-regulated kinase (Erk) の活性化マーカーとなるリン酸化を検出することで、生化学的に差異を示すニューロン集団の同定を試みた。その結果、前頭前野では、強化誘導時にはCREB、消去誘導時にはCREBとErkのリン酸化レベルが増加していた。特に、消去誘導時には、CREBあるいはErkの一方のみのリン酸化が検出されるニューロン集団（pCREB+/pErk-あるいはpCREB-/pErk+）と、両者のリン酸化が共に検出されるニューロン集団(pCREB+/pErk+)の存在が示された。従って、強化誘導時にはCREBのリン酸化のみが誘導された１種類のニューロン集団（pCREB+/pErk-）のみが出現するのに対して、消去誘導時には生化学的に差異を示す３種類のニューロン集団が出現することが示唆された。また、扁桃体では、強化誘導時にはCREBのみがリン酸化されたニューロン集団(pCREB+/pErk-)、消去誘導時にはCREBのみがリン酸化されたニューロン集団（pCREB+/pErk-)、及び、CREBとErkの両者がリン酸化されたニューロン集団（pCREB+/pErk+）が観察された。最後に、海馬では、強化誘導時には、CREBのみがリン酸化されたニューロン集団（pCREB+/pErk-)、対照的に、消去誘導時にはErkのみがリン酸化されたニューロン集団（pCREB-/pErk+)が観察された。今後、これらのニューロン集団の生化学的・機能的差異の解析を進める予定である。

reconsolidation, extinction, neuronal population

講演番号：2C27p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ C校舎27会場

社会的認知記憶固定化と再固定化を制御する脳領域の同定

Brain regions required for consolidation and reconsolidation of social recognition memory

○谷水俊之[1]、門間和音[1]、岡野絵美子[1]、張悦[1,2]、福島穂高[1,2]、喜田聡[1,2]（1東京農大院・農・バイオ、２JST, CREST）

○Toshiyuki TANIMIZU[1], Kazune KADOMA[1], Emiko OKANO[1], Yue ZHANG[1,2], Hotaka FUKUSHIMA[1,2], Satoshi KIDA[1,2]（1. Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 2. JST, CREST）

記憶は数時間程度しか保持されない不安定な短期記憶と最長一生保持される長期記憶に分けられる。不安定な記憶は新規遺伝子発現依存的な固定化のプロセスを経ることによって、安定な長期記憶として保持される。さらに、固定化された長期記憶は想起されると不安定な状態となり、新規遺伝子発現依存的な再固定化のプロセスを経ることによって、再び安定な長期記憶として保持される。これまでの我々の解析から、恐怖記憶及び空間記憶固定化及び再固定化には転写因子c-AMP-responsive element-binding protein (CREB)による転写活性化が必要とされることが明らかにされている。本研究では、社会的認知記憶課題を用いて、他のマウスを記憶する社会認知記憶固定化のメカニズムを組織学的に解析した。まず、薬剤依存的に前脳領域のCREBによる転写を阻害可能なCREB-IRマウス（Kida et al., 2002）を用いて、社会的認知記憶固定化に対するCREBの役割を解析した。その結果、薬剤投与によるCREBの転写不活性化によって、社会的認知記憶に障害が観察され、社会的認知記憶固定化にCREBによる転写活性化が必要であることが示された。続いて、この結果に基づいて、CREB標的遺伝子c-fos及びArcの発現誘導を指標とする免疫組織化学染色法を用いて、社会的認知記憶固定化時に遺伝子発現が誘導される脳領域を同定した。その結果、固定化誘導時に前頭前野、前帯状皮質、扁桃体基底外側部、海馬において、顕著なc-fos及びArc発現誘導が観察され、これら脳領域が社会的認知記憶固定化に関与することが示唆された。一方、同様に、社会的認知記憶再固定化時に遺伝子発現が誘導される脳領域をc-fos発現を指標にして解析した。その結果、固定化時と類似したc-fos発現誘導パターンが観察されたものの、海馬では、固定化時よりもc-fos発現レベルは低く、固定化と再固定化ではそのメカニズムが異なることが示唆された。

memory, consolidation, reconsolidation

講演番号：2C27p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ C校舎27会場

転写因子 CREB 情報伝達系活性化による学習能力の向上

Up-regulation of CREB-mediated transcription enhances learning and short-term memory

○芹田龍郎[1]、福島穂高[1,2]、喜田聡[1,2]（1.東農大院・農・バイオ、2. JST・CREST）
○Tatsurou SERITA[1], Hotaka FUKUSHIMA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] (1. Dep.of Bioscience,Tokyo Univ.of Agriculture, 2. JST,CREST)

長期記憶形成には新規タンパク質合成が必須である。転写因子 CREB の loss of function により長期記憶に障害が生じることから、CREB は長期記憶形成の正の制御因子と捉えられてきた。我々は、記憶形成に対する CREB の gain of function の効果を明らかにするために、リン酸化非依存的に転写活性化を誘導する活性化型 CREB 変異体 (CREB DIEDML) を前脳領域で発現する変異型マウス(DIEDML マウス)を作製し、行動学的・生理学的解析を進めてきた。現在までに、DIEDML マウスでは長期記憶だけでなく、短期記憶も顕著に向上していることを報告してきた（Suzuki et al., J, Neurosci., 2011）。今回の発表では、DIEDML マウスを用いて、学習能力に対する CREB の gain of function の効果を解析した結果を報告する。時間間隔を空けて条件刺激(Conditioned Stimulus (CS); 音)と非条件刺激(Unconditioned Stimulus (US); 電気ショック)を提示して、CS と US の関連付けを学習させる痕跡恐怖条件付け課題(trace fear conditioning)を用いて、DIEDML マウスの学習能力を解析した。その結果、強い非条件刺激（0.2 mA）で条件付けを行った場合には、DIEDML マウスは野生型マウスと同程度の条件付け学習を示した。しかし、弱い非条件刺激(0.05 mA) で条件付けを行った場合には、DIEDML マウスは野生型マウスよりも短時間で音と電気ショックの関連を学習することが示された。また、DIEDML マウスには痕跡恐怖条件付けの長期記憶にも向上が観察された。さらに、他のマウスを記憶させる社会的認知学習課題（social recognition test）を用いて、同じ幼若マウスを複数回提示することで学習能力を評価した。その結果、恐怖条件付け学習の場合と同様に、DIEDML マウスでは野生型マウスよりも短時間で相手幼若マウスを学習することが示された。以上の結果から、DIEDML マウスは長期記憶・短期記憶のみならず学習能力も向上していることが示唆された。現在、リン酸化により CREB 活性化を誘導するカルシウム-カルモジュリン依存性キナーゼⅣ(CaMKⅣ)を前脳領域で過剰発現させた変異型マウス(CaMKⅣマウス)と、プロテインキナーゼＡ(PKA)に対して高感受性を示す活性化型 CREB 変異体(CREB Y134F)を前脳領域で発現させた変異型マウス(Y134F マウス)の学習能力についても解析を行っており、これらの結果をまとめて報告する。

memory, learning, CREB

講演番号：2C27p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ C校舎27会場

恐怖記憶再固定化と消去誘導時の海馬と扁桃体における細胞内情報伝達機構の解析

Analyses of signal transduction in reconsolidation and extinction phases of contextual fear memory in the hippocampus and amygdala

○稲葉洋芳[1]、張悦[1,2]、金亮[1]、間宮則[1]、喜田聡[1,2]
（[1]東京農大院・農・バイオ、[2]CREST・JST）
○Hiroyoshi Inaba[1], Yue Zhang[1,2], Ryang Kim[1], Nori Mamiya[1], Satoshi Kida[1,2]
（[1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST, JST）

恐怖記憶想起後には、一見相反する再固定化と消去の二つのプロセスが誘導される。再固定化は想起された恐怖記憶を再貯蔵するプロセスであり、恐怖記憶の維持に働くのに対し、消去は恐怖記憶から恐怖を感じる必要のないことを新たに再学習するプロセスであり、恐怖記憶の軽減に働く。我々は現在までに、恐怖条件付け文脈記憶では想起時間の長さに応じて、再固定化あるいは消去が誘導されることを示し、再固定化と消去は独立したプロセスではなく、消去が誘導されれば再固定化は起こらなくなるなど、両プロセスは相互作用していることを明らかにしてきた。さらに、恐怖条件付け記憶再固定化誘導時には海馬と扁桃体において、一方、消去誘導時には扁桃体と前頭前野において、リン酸化型転写因子CREBレベルがそれぞれ増加することを示し、想起後の恐怖記憶制御にCREBリン酸化酵素群が重要な役割を果たすことを明らかにした。そこで、本発表では、リン酸化反応と共に、細胞内タンパク質群のリン酸化レベルを決定する脱リン酸化反応に着目し、想起後の恐怖記憶制御に対する脱リン酸化酵素カルシニューリンの役割を解析した結果を中心に報告する。再固定化時に、カルシニューリン阻害剤FK506を扁桃体に注入した場合、タンパク質合成阻害による恐怖記憶破壊が阻止されたことから、扁桃体におけるカルシニューリンの活性化は恐怖記憶の不安定化に必須であることが示唆された。一方、消去誘導前に扁桃体にFK506を注入した場合には消去獲得には影響が観察されなかったのに対して、24時間後には消去の維持が観察されなかったことから、扁桃体におけるカルシニューリンの活性化は恐怖記憶消去の固定化に必須であることが明らかとなった。一方、海馬にFK506を注入した場合、再固定化誘導時には扁桃体と同様に不安定化が阻害されたものの、消去誘導時には扁桃体とは対照的に消去の獲得が阻害された。さらに、消去誘導の直後、または30分後に海馬と扁桃体におけるカルシニューリン活性を測定した結果、海馬では消去誘導直後、一方、扁桃体では消去誘導30分後に、カルシニューリン活性の上昇が観察された。以上の結果から、扁桃体と海馬におけるカルシニューリンは共に恐怖記憶の不安定化と消去に必須であるものの、カルシニューリンは海馬では消去の獲得、一方、扁桃体では消去記憶を維持するための固定化に貢献していることが初めて明らかとなった。現在、恐怖記憶再固定化と消去時の海馬におけるシグナル伝達因子群の発現変動の解析をしており、今大会ではこの結果についても併せて報告する。

fear memory, reconsolidation, extinction

講演番号：2C27p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ C校舎27会場

転写調節因子PU.1によるMHC class II発現調節機構

Role of PU.1 in MHC class II expression via transcriptional regulation of CIITA pI in dendritic cells

○西山　千春[1]、北村　奈緒[1]、八代　拓也[1]、吉田　彩子[1,2]、横山　北斗[1,2]、中野　信浩[1]、原　むつ子[1]、金田　俊介[1]、小川　秀興[1]、西山　真[2]、奥村　康[1]（[1]順天堂大・医・アトピー疾患研究センター、[2]東大・生物生産工学研究センター）

○Chiharu Nishiyama[1], Nao Kitamura[1], Takuya Yashiro[1], Ayako Yoshida[1,2], Hokuto Yokoyama[1,2], Nobuhiro Nakano[1], Mutsuko Hara[1], Shunsuke Kanada[1], Hideoki Ogawa[1], Makoto Nishiyama[2], Ko Okumura[1] ([1]Juntendo University School of Medicine, [2]The University of Tokyo)

【目的】私達はGATA1/2と共にマスト細胞特異的遺伝子発現を制御する転写調節因子として同定したPU.1について、その発現量がマスト細胞と樹状細胞(DC)の分岐を決定することを見出し(Nishiyama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Review, 2006)、DCにおけるPU.1の機能解析に研究を展開してきている。DCは、取り込んだ抗原をMHC class IIを介して提示することによりT細胞の分化誘導を制御するプロフェッショナル抗原提示細胞である。その重要性にも関わらず、DCにおけるMHC class II発現制御について細胞特異性を説明できる分子は同定されていなかった。私達はPU.1 siRNA導入によりDC上のCD80、86の発現と共にMHC class II発現も低下することを観察したことから(Kanada et al., *Blood*, 2011)、発現調節の分子機構解析に着手した。
【方法】Balb/cマウス骨髄よりGM-CSF添加培地を用いてDCを分化誘導し、MHC class II発現のマスターレギュレーターである転写共役因子CIITAの遺伝子発現に対するPU.1の機能をsiRNA、クロマチン免疫沈降法（ChIP）、レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ（EMSA）、定量的PCR、フローサイトメトリー等の手法を用いて解析した。
【結果】DCへのPU.1 siRNA導入により、PU.1と共にMHC class IIのmRNAも抑制され、これに伴いDC表面のMHC class II発現やT細胞活性化能も低下し、また、DCで強く機能する第1プロモーター（pI）由来のCIITA mRNA量がPU.1 siRNA導入により低下していることが確認された。DCはLPS刺激により細胞表面のMHC class IIタンパク質発現は増加する一方、転写はシャットダウンする。ChIPアッセイの結果から、LPS刺激に呼応したmRNA抑制はpIのヒストンH3アセチル化と連動しており、一方PU.1は刺激の有無に関わらずpIに結合していたことから恒常的に転写活性化を行う可能性が考えられた。レポーターアッセイとEMSAにより、PU.1はpIの-47/-44にあるGGAA配列、-30/-27のAGAA配列に直接結合し転写活性化することが判明した。PU.1は単量体として働く以外にIRF4やIRF8とのヘテロ二量体としても機能するが、IRF4や8のsiRNAはCIITAやMHC class II発現に影響を及ぼさないことから、PU.1単量体がpIを転写活性化すると考えられた。また、PU.1 siRNA導入によりpIのH3、H4アセチル化が低下したことから、PU.1はpI領域のヒストンアセチル化を促進することによっても、CIITA発現に関わることが示唆された。一方、IRF4や8との相互作用に必要なPESTドメインを欠失したPU.1変異体はより強くDC特異的遺伝子発現を引き起こすことも観察しており、GATA1/2との協調作用も含め、構造生物学的な解析も検討しつつある。

dendritic cell, MHC class II, PU.1

講演番号：2C27p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ C校舎27会場

PU.1によるTh2サイトカイン発現抑止機構の解析

PU.1 stops Th2 cytokine expression in dendritic cells

○八代　拓也、小川　秀興、奥村　康、西山　千春（順天堂大・医・アトピー疾患研究センター）
○Takuya Yashiro, Hideoki Ogawa, Ko Okumura, Chiharu Nishiyama (Juntendo University School of Medicine)

【目的】PU.1は血球系細胞に特異的に発現する転写因子である。PU.1は樹状細胞 (DC)に高発現していることや、マスト細胞にPU.1を過剰発現するとDC特異的遺伝子群の発現が誘導されることから、PU.1はDCの機能発現に重要であることが示唆されている。これまでに我々は、DCにおけるLPS刺激に応じたTNFαやIL-12 p40の高産生が、PU.1のノックダウンによって抑制されることを明らかにしており、DCにおけるサイトカインの産生にPU.1が関与することを示している。本研究では、DCにおけるTh2サイトカインの産生にPU.1が及ぼす影響を解析した。
【方法】マウス骨随細胞をGM-CSF存在下で培養し、BMDC (bone marrow-derived DC)を得た。エレクトロポレーションによりsiRNAまたは発現ベクターを導入した後、LPSで刺激して、IL-5およびIL-13のmRNA量の変化をReal-time RT-PCR法により解析した。また、培地中へのIL-13の産生量の変化をELISA法により解析した。
【結果】PU.1をノックダウンしたBMDCでは、LPS刺激によってIL-5およびIL-13のmRNA量が増加することが示された。また、同様に培地中のIL-13量の増加が確認された。PU.1をノックダウンしたBMDCでは、GATA2およびGATA3の発現が顕著に増加していることが示されたため、LPS刺激に応じたIL-5およびIL-13遺伝子の転写活性化にこれらが関与するかについて検討した。その結果、PU.1とGATA2のダブルノックダウンでは、LPS刺激によってIL-5およびIL-13のmRNA量が依然増加するのに対し、PU.1とGATA3のダブルノックダウンでは、LPS刺激によるIL-5およびIL-13のmRNA量の増加が抑制された。さらに、BMDCにGATA3を過剰発現すると、LPS刺激によってIL-5およびIL-13のmRNA量が増加することが確認された。
以上の結果から、DCにおいてPU.1は、GATA3の発現抑制を介して、Th2サイトカイン産生を抑止していることが明らかとなった。PU.1は、DCが本来産生し得るTNFα、IL-12 p40の発現には正の、産生し得ないTh2サイトカインの発現には負の制御因子として働くことが示唆された。

Dendritic cells, PU.1, Th2 cytokine

講演番号：2C27p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎27会場

情動行動制御に対するレチノイン酸情報伝達系の役割の解析

Regulation of emotional behavior by retinoic acid signaling pathway

○齋藤香織[1]、野本真順[1,2]、内田周作[1]、喜田聡[1,2]（[1]東京農大院・農・バイオ、[2]CREST・JST）
○Kaori SAITO[1], Masanori NOMOTO[1,2], Shusaku UCHIDA[1],Satoshi KIDA[1,2]([1] Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2] CREST・JST)

ビタミンAの活性本体であるレチノイン酸は転写調節因子レチノイン酸受容体 (RAR) の特異的なリガンドとして機能している。このRARはレチノイドX受容体 (RXR) とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子の転写を調節することで生体機能を制御している。特に、RARは脳内に多く発現していることから、脳機能において重要な役割を果たしていると考えられる。これまでに、我々は、RARαのアゴニストを投与されたマウスが不安行動、うつ様行動および社会行動の異常を示すことを報告した。本年度は、ドミナントネガティブ変異型RARα (dnRAR) を前脳領域特異的に発現するトランスジェニックマウス (TgM) を用いて、情動行動制御に対する前脳領域レチノイン酸情報伝達系のloss-of-functionの効果を行動学的および生化学的に解析した結果を報告する。まず、前脳領域レチノイン酸情報伝達系に対するdnRAR発現の影響を解析するために、RARαの標的遺伝子であるドーパミンレセプターD2 (Drd2) の発現量をノザンブロット解析により検討した。その結果、TgM群の前脳領域ではDrd2 mRNA発現量の顕著な発現低下が観察され、dnRARの発現により前脳領域レチノイン酸情報伝達系の阻害（loss-of-function）が誘導されたことが強く示唆された。そこで、このloss-of-functionの効果を行動学的に評価した。社会行動を評価するSocial interaction test を行なった結果、TgM群では野生型マウスに比較して社会行動の有意な増加が観察され、社会行動の異常が観察された。一方、気分行動を評価する強制水泳試験 (Forced swim test) および尾懸垂試験 (Tail suspension test) を行なった結果、それぞれの試験において、TgM群では、躁様行動の顕著な増加が観察された。さらに、不安行動を評価するオープンフィールド試験 (Open field test) および明暗選択試験 (Light/dark transition test) を行なった結果、TgM群において行動活性の低下および不安行動の増加が観察された。最後に、TgM群において観察された気分行動の異常をさらに評価するため、快感感受性を評価するショ糖嗜好性試験 (Sucrose preference test) を行なったが、予想に反して、TgM群には快感消失が観察され、躁様行動を反映した結果は認められなかった。以上の結果から、前脳領域レチノイン酸情報伝達系の不活性化は様々なレベルの情動行動に顕著な異常を導くことが明らかとなった。このような情動行動の変化には、Drd2発現低下によるドーパミン情報伝達系の異常が関与すると考察している。

retinoic acid receptor, emotional behavior, dopamine receptor d2

講演番号：2C27p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎27会場

メマンチン投与による成体海馬神経新生促進と海馬依存的学習・記憶形成能力の向上

Promoting adult hippocampal neurogenesis and enhanced hippocampus-dependent learning and memory after the treatment with NMDA glutamate receptor antagonist Memantine

○石川理絵[1]、金亮[1]、難波隆志[2]、高坂新一[2]、内野茂夫[2]、喜田聡[1,3]（[1]東農大院・農・バイオ、[2]（独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所、[3] CREST, JST）

○Rie ISHIKAWA[1], Ryang KIM[1], Takashi NAMBA[2], Shinichi KOHSAKA[2], Shigeo UCHINO[2], Satoshi KIDA[1,3]([1] Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, Japan, [2] National Institute of Neuroscience, NCNP, [3] CREST. JST)

成体神経新生は側脳室下帯と海馬歯状回顆粒細胞下層において認められる。成体海馬神経新生と記憶形成能力との関連性が数多く研究されているが、記憶形成能力に対する成体海馬神経新生亢進の影響はほとんど解析されていない。これまでの我々のグループの解析から、NMDA型グルタミン酸受容体阻害剤であるメマンチン(50mg/kg)を投与すると成体海馬神経新生が促進されることが報告されている。そこで、本研究では、このメマンチン投与系を用いて、学習記憶に対する成体海馬神経新生亢進の影響を解析した。3カ月齢の成体雄マウスにメマンチンを投与し、その3日、3週間、あるいは、4ヶ月後に、海馬依存的記憶を評価する社会的認知記憶課題およびモリス水迷路課題を行った。3日後あるいは4ヶ月後に行動解析を行った場合には、コントロール群に比べ社会記憶及び空間記憶共に変化は観察されなかった。しかし、メマンチン投与によりその増殖が亢進された神経幹細胞が成熟ニューロンにまで分化した時期に一致する、メマンチン投与3週間後の行動解析では、メマンチン群では社会的認知記憶と空間記憶の顕著な向上が観察された。一方、メマンチン投与2日後に分裂細胞マーカー5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) を投与して、メマンチン群の新生神経細胞数を解析した結果、行動解析に用いた全てのメマンチン群において新生細胞数が劇的に増加していることが示された。興味深いことに、メマンチン投与3週間後に記憶を評価されたメマンチン群においてのみ、BrdU陽性細胞数と空間記憶課題のトレーニング時のescape latency（プラットフォームにたどり着くまでの時間）との両者の間に有意な相関関係が観察され、神経新生と学習記憶能力との間に正の相関関係が観察されることが示唆された。以上の結果から、メマンチン投与による成体海馬神経新生の促進が海馬依存的記憶能力を向上させることが示唆された。

adult hippocampal neurogenesis , memantine , learning and memory

講演番号：2C27p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎27会場

前脳領域サーカディアン転写リズムによる時間帯依存的な記憶想起制御

Circadian regulation of memory retrieval by BMAL1 in the forebrain.

○長谷川俊介[1,2]、太田美穂[1]、中村あずみ[1]、齋藤香織[1]、細田浩司[1]、喜田聡[1,2]　（1. 東農大・応生科・バイオ、 2 . CREST・JST）

○Shunsuke HASEGAWA[1,2], Miho OHTA[1], Azumi NAKAMURA[1], Kaori SAITO[1], Hiroshi HOSODA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1] Dept. of Bio, Tokyo Univ. of Agri, [2] CREST, JST)

bHLH-PAS型転写調節因子BMAL1は、CLOCKまたはNPAS2とヘテロダイマーを形成して時計遺伝子群のプロモーター上のE-box配列に結合し、転写制御を行い、サーカディアンリズムを産生する。我々は、前脳領域におけるリズム制御と学習・記憶能力との関係を明らかにするために、テトラサイクリン依存性発現誘導システムを用いて前脳特異的にドミナントネガティブ型BMAL1(dnBMAL1)を発現するマウスを作製し、解析を進めてきた。dnBMAL1発現マウスでは、野生型マウスと比較して前脳領域におけるCLOCK/BMAL1標的遺伝子*Dbp*、*Cry1*、*Rora* のmRNA発現レベルが有意に減少していた。しかし、このdnBMAL1発現マウスでは、サーカディアンリズムの中枢である視交叉上核（SCN）を含む視床下部におけるCLOCK/BMAL1標的遺伝子群の発現に異常は観察されず、さらに、この結果に一致して、SCNに依存する概日行動リズムにも異常は認められなかった。以上の結果から、dnBMAL1発現マウスは前脳領域特異的にサーカディアン転写リズムが破壊されていることが示唆された。さらに、dnBMAL1発現マウスは社会的認知記憶の障害を示すことも明らかとなっている。今回は、dnBMAL1発現マウスの行動学的解析をさらに進めた結果をまとめて報告する。興味深いことに、dnBMAL1発現マウスは、記憶形成には障害を示さないものの、ZT10（明期開始10時間後）付近においてのみ、社会的認知記憶、恐怖条件付け文脈記憶及び物体認識記憶などの様々なタイプの記憶の想起に障害を示すことが示唆された。さらに、免疫組織染色法を用いて、恐怖記憶想起時のc-fosの遺伝子発現を指標にして、記憶想起時のdnBMAL1発現マウス海馬の活性化状態を評価した。その結果、dnBMAL1発現マウスでは、恐怖記憶を形成させた文脈に再エクスポージャーさせることで、ZT4では野生型マウスと同程度のc-fos発現誘導が観察されたものの、ZT10では野生型マウスと比較してc-fosの発現誘導レベルが低かった。従って、dnBMAL1発現マウスでは、ZT10付近において、記憶想起の障害に相関して、海馬も活性化されないことが明らかになった。この結果から、dnBMAL1発現マウスではZT10付近で記憶表出に障害が起こっているのではなく、記憶想起自体、すなわち、記憶回路の再活性化に障害が起こっていることが強く示唆された。以上の結果から、記憶想起のサーカディアン制御基盤が存在し、この制御にBMAL1が中心的役割を果たすことが明らかとなった。

BMAL1, memory, circadian rhythm

講演番号：2C27p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ C校舎27会場

プロテアソーム依存的タンパク質分解と新規遺伝子発現を介した想起後の受動回避記憶強化

Enhancement of inhibitory avoidance memory after retrieval through protein degradation and synthesis

○福島穂高、張悦、喜田聡
（[1]東京農大・応生科・バイオ、[2]JST, CREST）
○Hotaka FUKUSHIMA, Yue ZHANG, Satoshi KIDA
([1]Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, [2]CREST, JST)

恐怖記憶の想起後には、新規遺伝子発現依存的な再固定化のプロセスが存在する。我々は、恐怖記憶再固定化の意義を解明するために、受動的回避反応課題を用いて恐怖記憶再固定化の制御機構を解析してきた。現在までに、受動回避記憶の想起により記憶の強化が観察され、この課題では再固定化と強化が関係していること、また、扁桃体における遺伝子発現は再固定化と強化に必要であり、一方、海馬と前頭前野における遺伝子発現は強化にのみ必須であることを示してきた。本年度は、受動回避記憶再固定化と強化に対するプロテアソーム依存的タンパク質分解系の役割について解析した結果を報告する。受動回避記憶想起後にユビキチン結合酵素（ubiquitin-conjugating enzyme E2）の活性化を指標にして免疫組織学的解析を行った結果、前頭前野、扁桃体、海馬領域においてユビキチン結合酵素の活性化が観察され、これらの脳領域において記憶想起後にプロテアソーム依存的タンパク質分解が活性化することが示唆された。従って、過去の我々の解析結果と合わせると、受動回避記憶想起後に、前頭前野、扁桃体、海馬領域においてタンパク質分解と合成の両方が誘導されることが示唆された。続いて、プロテアソーム依存的なタンパク質分解系の阻害剤である clasto-Lactacystion-β-lactone（β-lac）の局所注入により、再固定化と強化に対するタンパク質分解系の役割を解析した。扁桃体に β-lac を局所注入した結果、受動回避記憶強化が妨げられ、また、タンパク質合成阻害剤アニソマイシン（Ani）と β-lac の同時注入の結果、Ani による受動回避記憶の破壊も妨げられた。よって、扁桃体ではプロテアソーム依存的タンパク質分解が起点となって受動回避記憶の再固定化と強化が誘導されることが示唆された。一方、海馬または前頭前野に β-lac を局所注入した結果、Ani と同様に受動回避記憶強化が観察されず、海馬と前頭前野におけるプロテアソーム依存的タンパク質分解は強化に必須であることが示唆された。以上の結果から、扁桃体は受動回避記憶想起後の再固定化と強化両者の責任領域であり、一方、海馬と前頭前野は強化の責任領域であることが明らかとなった。プロテアソーム依存的タンパク質分解により既存のタンパク質群を分解し、その一方で、遺伝子発現を誘導して新規タンパク質群を合成することで、再固定化と強化が進行するダイナミックな分子基盤の存在が強く示唆された。

Memory, Enhancement, Reconsolidation

講演番号：2C27p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎27会場

セリン合成酵素*Phgdh*欠損線維芽細胞に惹起される炎症反応の分子機序

Induction of inflammation-related gene expression by serine limitation in *Phgdh*-deficient MEF

○濱野 桃子[1]、佐矢野 智子[1]、鵜殿 美弥子[1]、小川 拓哉[2]、片倉 喜範[1]、加藤 久典[3]、古屋 茂樹[1,4]
([1]九州大・生資環、[2]奈良先端大・バイオ、[3]東京大・食と生命、[4]九州大・バイオアーキ)
○Momoko Hamano[1], Tomoko Sayano[1], Miyako Udono[1], Takuya Ogawa[2], Yoshinori Katakura[1], Hisanori Kato[3], Shigeki Furuya[1,4] ([1,4] Kyushu Univerisity, [2] Nara Institute of Science and Technology, [3] Tokyo University)

【目的及び方法】セリン合成酵素 3-Phosphoglycelate dehydrogenase (*Phgdh*) を不活化したノックアウト（KO）マウスは、脳形態形成異常を伴った著しい発達遅滞を呈し、胎生致死となる。ヒトにおいても *PHGDH* の遺伝子変異は重篤な高次機能発達障害に至る。しかしそれらの表現型を支配する分子機構の詳細は未だ十分に理解されていない。そこで当研究室では、*de novo* セリン合成の栄養生理学的意義を細胞レベルで明らかにすることを目的に、*Phgdh* KO マウス胚より線維芽細胞（KO-MEF）を樹立しセリン欠乏応答の解析を行ってきた。培地中セリン制限下における KO-MEF の DNA マイクロアレイ解析を行った結果、セリン添加時に比べ多様なカテゴリーに属す遺伝子の有意な発現変化が見いだされた。それらには炎症反応を誘導するサイトカインやその他炎症反応に関連する因子の転写産物レベルの増加も含まれた。そこで本研究では、セリン欠乏による炎症反応惹起の分子機序解明を目的に，主に KO-MEF において培地セリン制限下で炎症反応関連遺伝子の発現解析を定量 RT−PCR 法を用いて行ったので報告する。

【結果】培地セリン制限下 6 時間培養の KO-MEF において、炎症反応関連遺伝子である *Ptgs2*、*Il6*、*Vegfa* の転写産物が有意にかつ顕著に増加しており、マイクロアレイ解析結果の再現性が確認された。そこで、これら炎症関連遺伝子の発現誘導がセリン欠乏により制御されているのかを解明すべく、さらなる解析を行った。セリンと同様に細胞内含量が低下するグリシンやシステインを培地に添加してもその発現上昇は抑制されず、*Phgdh* cDNA を KO-MEF に再導入すると抑制された。培地中セリン濃度を段階的に減少させた条件下では濃度に依存することなく極端なセリン制限下(4 μM)でのみ顕著に転写活性化が誘導され、セリン制限に対する応答は鈍かった。

アミノ酸欠乏ストレスを含む共通のストレス応答として、eIF2αのリン酸化を介する翻訳抑制とそれに続く Atf4 の活性化を導く統合ストレス経路が知られている。セリン欠乏による遺伝子発現変化における転写因子 Atf4 の寄与を検証するため、shRNA による Atf4 ノックダウン(KD) KO-MEF を作製し検討を行った結果、各遺伝子間で Atf4 への依存度は異なっていた。以上の結果よりセリン欠乏は炎症反応関連遺伝子の発現を誘導するが、その制御は異なった機構によるものと推定された。

Serine, Transcriptional regulation, Inflammation

講演番号：2C27p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ C校舎27会場

ATF5 mRNA 5’非翻訳領域を介したNMDによる新規ストレス応答性mRNA安定化機構

5’-untranslated region modulates ATF5 mRNA stability in response to environmental stress via nonsense-mediated mRNA decay.

○幡野仁哉，梅村真理子，中野春男，高橋滋，高橋勇二（東薬大・生命）
○Masaya Hatano, Mariko Umemura, Haruo Nakano, Shigeru Takahashi, Yuji Takahashi

【目的】Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)は本来の終止コドンよりも5’上流側に存在する早期終止コドン(premature termination codon, PTC)を持ったmRNAを分解し、変異形質の発現を未然に防いでいる。品質管理機構としての役割だけでなく近年、PTCを誘発する選択的スプライシングなどNMDによる遺伝子発現調節が報告されている。我々はATF5 (activating transcription factor 5) mRNAの発現がストレスに応答して上昇し、ストレス非存在下ではその発現が抑制されていることを報告した。さらに、ストレス非存在下において、ATF5の翻訳がeukaryotic initiation factor 2α (eIF2α)のリン酸化状態に依存して5'非翻訳領域(5'-untranslated region, 5'UTR)上の上流開始コドン(upstream AUG, uAUG)から始まることを明らかにした。そして、uAUGからの翻訳によりPTCが生じることを見出している。以上のことから、ATF5 mRNAの発現抑制はNMDによると仮説を立てた。そこで、本研究は(1)ATF5 mRNAはNMDのターゲットであるのか、(2)ATF5 mRNAがNMDのターゲットであるならば、NMDによる発現調節はATF5 5’UTRを介して行われているのか、(3)ストレスによるATF5 mRNAの発現上昇はeIF2αのリン酸化が関与したNMDによる分解からの回避によるのか、以上3点に着目してATF5 mRNA発現調節機構の解明に迫った。

【結果】NMD関連因子であるUpf1、Upf2をノックダウンしたところ、ATF5 mRNA量が増加した。この増加はmRNAの安定性の上昇によることがわかった。また、シクロヘキシミドによってNMDが作動するために必要な翻訳を阻害したところ、mRNA量が増加した。これらのことからATF5 mRNAの発現調節にはNMDが関与することが示唆された。ATF5の5’UTRには２つのupstream open reading frame (uORF)、uORF1とuORF2が存在する。uORF2の開始コドンuAUG2の変異によってNMDによるmRNA発現抑制が解除された。5’UTRの下流をLUC遺伝子に置き換えた実験からもmRNA発現量に対する5’UTRの重要性を示唆する結果が得られた。これらのことから、ストレス非存在下におけるATF5 mRNAの発現抑制は5’UTRを介して行われ、特にuAUG2から翻訳されることが重要であることがわかった。ストレスによるATF5 mRNAの発現上昇に対するeIF2αのリン酸化の関与を調べた。eIF2αのリン酸化によってATF5 mRNA量が増加し、分解が抑制された。この増加はeIF2αキナーゼ欠損株では見られなかった。アミノ酸欠乏下ではeIF2αがリン酸化され、NMDによるmRNA発現抑制が解除された。これらのことから、ATF5 mRNAは、ストレスが引き起こすeIF2αのリン酸化によってNMDによる分解を回避することでその発現が上昇することがわかった。以上の結果から、ATF5 mRNA発現調節は5’UTRを介したNMDによる新規なストレス応答機構であると結論付けた。

ATF5 mRNA, NMD, stress response

講演番号：2C27p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎27会場

mRNA輸送因子UAP56とURH49の形成する異なる複合体構築機構の解明

The molecular mechanism of different complex formation in UAP56 and URH49, which are essential for mRNA export

○藤田賢一、宮前友策、永尾雅哉、神戸大朋、増田誠司（京大生命・統合生命）
○Kenichi Fujita, Miyamae Yusaku, Masaya Nagao, Taiho Kambe, Seiji Masuda (Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ.)

【目的】真核生物において mRNA は核内で転写された後、様々な mRNA プロセシングを受けて成熟 mRNA となる。各プロセシング反応は互いに共役しており、全てのプロセシングを完了した mRNA のみを核外へ輸送する。mRNA プロセシング間の共役は、共役因子と呼ばれるタンパク質複合体が制御している。TREX 複合体は mRNA のスプライシングと核外輸送を共役する機能を持つ共役因子であり、その構成因子 UAP56 は進化的に保存されている。UAP56 の相同遺伝子は酵母やハエでは存在しないが、ヒトやマウスなどのほ乳類では 90%の相同性を持つ URH49 が存在する。当研究室は、UAP56 と URH49 がそれぞれ異なる複合体 TREX ならびに AREX を形成すること、さらにそれぞれの因子が複合体を通して異なる生理機能を担っていることを明らかにしてきた。しかし非常に相同性の高い両者が形成する複合体の構築原理は全く分かっておらず、両者の機能の違い、複合体形成の違いを決定するアミノ酸配列の同定を足がかりとしてその分子機構を明らかにすることを目的としている。
【方法】複合体形成の違いを決定するアミノ酸配列の同定を行うため、UAP56 と URH49 で比較的異なる末端配列を欠損させた欠損変異体と、末端配列を入れ替えたキメラ変異体を作成した。コア領域についても、両者で異なるアミノ酸を 1 残基ずつ入れ替えたキメラ変異体を作成した。これらの変異体に対して免疫沈降法、RNA-FISH 法を用いる事によって複合体形成能と細胞内機能を検証し、UAP56 と URH49 の違いを決定する領域の同定を試みた。
【結果】UAP56 あるいは URH49 の形成する複合体は、それぞれ TREX 複合体と AREX 複合体であることを免疫沈降法により確認した。また UAP56 をノックダウンした細胞は、URH49 を発現させても mRNA が核内に蓄積すること、逆も同様であることを観察し、両者の機能が異なることを確認した。次いで末端欠損変異体の解析から、UAP56 と URH49 のいずれの欠損変異体においても、TREX あるいは AREX 複合体形成能が低下することを観察した。一方で末端のキメラ変異体は、いずれも元の UAP56 あるいは URH49 と同じ複合体形成能を示した。細胞内機能についても同様の結果であった。これらの結果から TREX, AREX 複合体形成において UAP56 や URH49 の末端領域は重要であるが、複合体形成の違いを制御している領域は他に存在している可能性が示唆された。そこでコア領域を入れ替えたキメラ変異体について細胞内機能を検証した結果、いくつかの URH49 変異体が UAP56 と同様の機能を持つ可能性が示唆された。これら変異体の複合体形成能について現在検証している。コア領域で見いだされたアミノ酸配列が、機能の違いや複合体形成能を制御しているかさらに詳細な解析を進めている。

mRNA export, complex formation, UAP56

講演番号：2C28a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ C校舎28会場

カイコにおける摂食行動調節因子short neuropeptide Fおよびその受容体の発現解析

Expression analyses of short neuropeptide F and its receptors in feeding behavior of the silkworm, *Bombyx mori*

○大原　彩子、永井　千晶、河合　岳志、永田　晋治、長澤　寛道（東大院・農生科・応生化）
○Ayako Ohara, Chiaki Nagai, Takeshi Kawai, Shinji Nagata, Hiromichi Nagasawa (Graduate school of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

【目的】昆虫の神経ペプチドであるshort neuropeptide F（sNPF）は、カイコ*Bombyx mori*の摂食行動に関わることを前回の本大会までに報告した。これまでに、カイコのsNPF受容体は3種類（BNGR-A7、-A10、-A11）が同定されている。本研究は本大会では、カイコsNPFs（sNPF-1、-2、-3）とその受容体がどのように摂食行動を調節しているかを明らかにすることを目的とし、カイコの各組織におけるsNPFとsNPF受容体の発現解析について報告する。
【方法と結果】BNGR-A7、-A10、-A11をそれぞれHEK293T細胞で発現させ、Fluo-4 AMを用いたCa^{2+}イメージング法により、sNPFsに対する応答性を解析した。合成sNPF-1、-2、-3を終濃度10 pM～100 nMとなるように加えたところ、BNGR-A7、-A10、-A11が発現する各細胞内のCa^{2+}濃度はsNPFsの濃度依存的に上昇した。また、満腹条件と空腹条件（28時間絶食）のカイコ5齢2日目幼虫由来の脳、中枢神経系、前腸、中腸、後腸、絹糸腺、マルピーギ管、脂肪体、筋肉、精巣、卵巣から抽出したtotal RNAを用い、qRT-PCRに供して、sNPFと各sNPF受容体の転写量の変化を解析した結果、sNPFは脳や神経節で発現が認められ、空腹条件では満腹条件よりも脳で発現量が減少した。一方、BNGR-A7は脳、中枢神経系、前腸、脂肪体、精巣、卵巣で発現が認められ、空腹条件では満腹条件よりも前腸で発現量が減少した。BNGR-A10は脂肪体以外の調べた全ての組織で発現が認められ、空腹条件では満腹条件よりも後腸で発現量が減少した。BNGR-A11は絹糸腺と脂肪体以外の調べた全ての組織で発現が認められた。これらのことから、sNPF受容体は摂食条件によって発現量が変動し、その変動の度合いは受容体の種類や組織によって異なることが明らかとなった。カイコ幼虫において、sNPFはその受容体の発現量を変動させることにより、体内における満腹時・空腹時の栄養状態に対応している可能性が示唆された。

Bombyx mori, short neuropeptide F, feeding behavior

講演番号：2C28a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ C校舎28会場

カイコにおけるイオン輸送ペプチド（ITP）およびITP-like（ITPL）の受容体の機能解析

Characterization of receptors for ion transport peptide (ITP) and ITP-like (ITPL) of the silkworm, *Bombyx mori*

○永井 千晶、永田 晋治、長澤 寛道（東大院農生科・応生化）
○Chiaki Nagai, Shinji Nagata, Hiromichi Nagasawa (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

【目的】

昆虫のイオン輸送ペプチド（ITP）は、節足動物に特有のペプチドファミリーである甲殻類血糖上昇ホルモン（CHH）族ペプチドに属する神経ペプチドである。カイコ*Bombyx mori*では、選択的スプライシングにより生じる、C末端がアミド化されたITP（ITPa）とアミド化されていないITP-like（ITPL）の存在が知られている。本研究では、CHH族ペプチドに対する受容体を明らかにすることを目的とした。

昨年度の本大会にて、活性型組換えITPおよびITPL（rITPa、rITPL）に対するカイコの神経ペプチドGPCRs（BNGRs）の応答解析から、BNGR-A2、-A34がrITPa、BNGR-A24がrITPLに応答したことを報告した。本年度は、これらBNGR-A2, -A34および-A24が、それぞれITPおよびITPLの受容体であるかどうかを検証したので報告する。

【方法・結果】

生体内でBNGR-A2, -A34がITPの、BNGR-A24がITPLの受容体として機能するかを、下記の4つの実験により検証した。これらの結果から、BNGR-A2, -A34およびBNGR-A24が、それぞれITPおよびITPLの受容体であることが実証された。

1）カルシウムイメージング法により、BNGR-A2, -A34および-A24を発現させたHEK293T細胞を用いてrITPaおよびrITPLに対する応答性を解析したところ、それぞれの応答は用量依存的であり、EC_{50}は1.1～2.6 x 10^{-8} Mであった。また、C末端がアミド化されていないrITP-Glyは、アミド化されたrITPaと比較して、1オーダー程度低く応答し、CHH族ペプチドのC末端のアミドが活性に重要であるという知見と一致した。

2）RT-PCRにより、解析したいずれの組織でも各候補BNGRの発現が認められた。一方、rITPaの曝露では様々な組織で、また、rITPLの曝露では脳、脂肪体、および卵巣で、細胞内cGMPレベルの上昇が認められた。

3）RNA干渉法により、カイコ卵巣由来のBmN細胞における内在性のBNGR-A24の発現をノックダウンすると、BmN細胞のrITPLに対する応答性が低下した。一方、BNGR-A24を一過的に過剰発現させた場合、BmN細胞のrITPLに対する応答性が上昇した。

4）蛍光標識したrITPaおよびrITPLと、CHO細胞で発現させたBNGR-A2, -A34および-A24との結合を検討した結果、リガンドと受容体との細胞膜上での相互作用が認められた。

ion transport peptide, *Bombyx mori*, G protein-coupled receptor

講演番号：2C28a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ C校舎28会場

フタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)における脂質動員ホルモン(AKH, adipokinetic hormone)が制御する体液中の脂質および糖質のレベルと摂食行動との関連性の解析

Relationship between hemolymph lipid and carbohydrate levels regulated by AKH (adipokinetic hormone) and feeding behavior in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*

○小沼貴裕、永田晋治、長澤寛道(東大院・農生科・応生化)
○Takahiro Konuma, Shinji Nagata, Hiromichi Nagasawa (the University of Tokyo)

【目的】昆虫の摂食行動は、体内の栄養状態を反映した体液中の成分情報が関与していることが、これまでの生理学的な研究により示されている。そこで、本研究では、直翅目昆虫であるフタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)を用いて、体内の栄養状態と摂食行動との関連性を明らかにすることを目的とし、先ず、昆虫において体内の栄養分の代謝や動員を制御するペプチドホルモンである、AKH (adipokinetic hormone、脂質動員ホルモン)の受容体(AKHR)をコードする cDNA をクローニングした。次に、フタホシコオロギの成虫を用いて、RNA 干渉法により AKHR をノックダウンした結果、摂食頻度の増加、および摂食量の増加が認められた。つまり、フタホシコオロギの摂食行動は AKH を介した栄養状態の制御システムに反映されることを、前回の本大会までに報告した。昆虫において、AKH は、体内でエネルギーを要求する際に脂質および糖質を体液に動員する機能が知られている。AKHR のノックダウン個体における、摂食頻度が増加するという現象を踏まえ、本年度では、AKHR のノックダウンが体液中の脂質および糖質のレベルに与える影響を解析した。また、AKHR のノックダウンが運動活性に与える影響についても解析した。
【方法・結果】先ず、AKHR の dsRNA の経口投与により、AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギを調製した。調製した検定群の運動活性を測定したところ、AKHR のノックダウン個体では、運動活性が低下することが明らかになった。すなわち、AKHR のノックダウンによる摂食頻度の増加は、運動の活性化ではなく、体液中の栄養状態の変動に起因すると考えられた。そこで、調製した検定群の体液を回収し、脂質および糖質のレベルをそれぞれ定量した。その結果、AKHR のノックダウンにより、体液中の主要な脂質である 1,2-ジアシルグリセロール(1,2-DAG)レベル、および、昆虫の血糖であるトレハロースレベルが減少した。すなわち、AKHR のノックダウンにより体内の栄養状態が変動した。次に、各摂食状態による、体液中の脂質および糖質のレベルを測定した。その結果、体液中の 1,2-DAG およびトレハロースレベルは、食餌後に一過的に増加することがわかった。ところが、長期間の絶食条件下では、体液中のトレハロースレベルは急激に減少したが、1,2-DAG レベルは大幅な変化は見られずに或る一定量に維持されていた。これらの結果から、フタホシコオロギの摂食モチベーションは、体液中の脂質や糖質レベルの変動の影響を受けることが示唆された。

Gryllus bimaculatus, adipokinetic hormone, feeding behavior

講演番号：2C28a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ C校舎28会場

カイコ摂食モチベーション調節ペプチドHemaPの結合タンパク質の同定および機能解析

Identification of a HemaP binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*

○諸岡　信克、永田　晋治[1]、長澤　寛道[1]（群大・生体調節、[1]東大院・農生科）
○Nobukatsu Morooka, Shinji Nagata[1] , Hiromichi Nagasawa[1] (IMCR, Gunma University, [1]Dept. of Applied Biological Chemistry, the University of Tokyo)

(目的)カイコ幼虫の周期的な摂食行動は、摂食行動に対するモチベーションの変動により作られる。我々は、前年度の本大会までに、この摂食モチベーションを変動させるペプチド性の因子として、カイコ幼虫体液からHemaP (Hemolymph major anionic peptide)を見出したことを報告した。HemaPはα-ヘリックスに富む二次構造を有しており、その構造上の特徴から、他のタンパク質と相互作用する可能性が考えられた。そこで本研究では、HemaPと相互作用する分子をカイコ幼虫の体液から同定し、機能解析することを目的とした。
(方法・結果) 作製したHemaPアフィニティーカラムを用いて、カイコ幼虫の体液からHemaPと相互作用する分子を精製した。HemaPと相互作用すると考えられる画分をSDS-PAGEに供した結果、30 kDa付近にほぼ単一のバンドを見出すことができた。そこで、このバンドに相当するタンパク質のN末端のアミノ酸配列解析を行ったところ、既知の血中タンパク質である30Kタンパク質と同定することができた。次に、大腸菌発現系を用いて組換え30Kタンパク質を調製し、*in vitro*においてHemaPと複合体の形成を検討した。その結果、HemaPは組換え30Kタンパク質と特異的に結合していることが明らかとなった。さらに、体内での30Kタンパク質の摂食行動に与える影響を検討するため、組換え30Kタンパク質投与した5齢2日目のカイコ幼虫の行動観察により摂食モチベーションを評価した。その結果、30KタンパクHemaPのカイコ幼虫の摂食モチベーションを上昇させる生理活性を抑制することが明らかとなった。

Bombyx mori, feeding behavior, 30K protein

講演番号：2C28a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ C校舎28会場

カイコ*Bombyx mori*の前額神経球のペプチドプロファイリング

Peptide profiling of the frontal ganglion in the silkworm, *Bombyx mori*

○永田 晋治、長澤 寛道（東大院・農生科・応生化）
○Shinji Nagata, Hiromichi Nagasawa (the University of Tokyo)

【目的】昆虫の摂食行動を調節する分子メカニズムを明らかにするため、我々はカイコ*Bombyx mori*を用いて、摂食行動調節因子を明らかにしてきた。これまでに明らかにしてきた摂食行動に関連すると考えられたいくつかの神経ペプチドの発現領域は、脳を中心とする中枢神経系および前額神経球(Frontal ganglion, FG)での発現が認められた。これまでの生理学的な研究により、FGは顎の運動や前腸の蠕動運動に関連する神経を投射していることが知られている。本研究は、カイコ幼虫のFGに含まれるペプチド性因子の同定と摂食行動への関連性を明らかにすることを目的として、カイコのFGにおけるペプチド性因子をMALDI-TOF MSによりProfilingした。
【方法と結果】カイコの終齢幼虫からFGを解剖し単離後、直接MALDI-TOF MSによるペプチド画分を解析した。その結果、アラトトロピン、アラトスタチン、FMRFアミド関連ペプチド、short neuropeptide F (sNPF)-1, -2, -3が見出された。これらのペプチドは昨年度の本大会までに報告した摂食行動関連因子として同定した生理活性ペプチドであった。すなわち、FGに摂食行動を調節する様な因子が含まれていることが示唆された。さらに、FGのMALDI-TOF MSの測定範囲を分子質量4000まで測定したところ、既にカルシトニン様神経ペプチドとして同定されている利尿ホルモン(Diuretic hormone)DH31を見出すことができた。このDH31の発現は、FGより抽出したRNAを用いたRT-PCRにより確認することができた。現在、合成ペプチドを調製し、カイコ幼虫に投与した際の、摂食行動に与える影響を検討している。

Bombyx mori, Feeding behavior, Frontal ganglion

講演番号：2C28a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ C校舎28会場

カイコガPBAN受容体の高発現、精製、活性測定、結晶化

Expression, purification, functional validation and crystallization of *Bombyx mori* PBAN receptor

○永田 宏次、海老沢 樹、夏目 亮[1]、千田 俊哉[1]、河合 岳志、早川 江、大塚 淳、永峰 俊弘[2]、栗原 政明[2]、李 載みん[2]、HULL J. Joe[3]、松本 正吾[2]、長澤 寛道、田之倉 優（東大院農生科・応生科、[1]産総研・BIRC、[2]理研・松本分子昆虫学、[3]米農務省農研局・乾燥地研セ）

○Koji Nagata, Tatsuki Ebisawa, Ryo Natsume[1], Toshiya Senda[1], Takeshi Kawai, Kou Hayakawa, Jun Ohtsuka, Toshihiro Nagamine[2], Masaaki Kurihara[2], Jae Min Lee[2], J. Joe Hull[3], Shogo Matsumoto[2], Hiromichi Nagasawa, Masaru Tanokura (Univ. of Tokyo, [1]BIRC, AIST, [2]RIKEN, [3]USDA-ARS)

【目的】昆虫の性フェロモンは雌雄の交尾機会を決めるので、その生合成の人為的制御は害虫防除につながる。本研究では、最大の農業害虫「蛾」のフェロモン腺における性フェロモン生合成に必須なペプチドホルモン「フェロモン生合成活性化ペプチド（PBAN）」とその受容体でフェロモン腺細胞膜上に提示される膜タンパク質「PBAN受容体」の複合体の立体構造を解析し、この複合体構造情報をPBANアンタゴニストの分子設計に役立てることを目的としている。
【方法と結果】PBAN受容体の結晶化に向けて、N末端糖鎖結合部位の除去、C末端細胞内領域の短縮、細胞内第3ループのT4リゾチームへの置換等により、より結晶性が高いと期待される改変体を設計し、この改変PBAN受容体とEGFPの融合タンパク質の発現系を構築して、融合タンパク質を昆虫細胞で発現させた。プラークアッセイを用いた組換えウイルスの純化により、目的タンパク質の発現量が顕著に向上し、昆虫細胞培養液 1 Lあたり4 mgの改変PBAN受容体-EGFPの発現が確認された。この目的タンパク質をアフィニティクロマトグラフィやタグ切断などにより精製して、昆虫細胞培養液 1 Lあたり2.1 mgの改変PBAN受容体が得られた。この改変PBAN受容体はPBAN活性断片に高い親和性を示した。改変PBAN受容体とPBAN活性断片との複合体について、蒸気拡散法および脂質メソフェーズ法による結晶化実験を行っており、複数の条件で微結晶が得られている。

GPCR, membrane protein, PBAN

講演番号：2C28a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ C校舎28会場

昆虫幼若ホルモンエポキシドヒドロラーゼ遺伝子の解析

Gene Analysis of Insect Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase

○塩月　孝博、坪田　拓也（農生資研）
○Takahiro Shiotsuki, Takuya Tsubota (NIAS)

【目的】昆虫の脱皮変態を幼若ホルモン（JHs）の分解側から制御している酵素の一つである幼若ホルモンエポキシドヒドロラーゼ（JHEH）について、各種昆虫の遺伝子について解析することを目的とした。
【方法】チョウ目のカイコと甲虫目のコクヌストモドキのJHEH遺伝子をそれぞれのゲノムデータベースから網羅的に探索し、各類縁遺伝子をクローニングした。それらの得られた遺伝子がコードするタンパク質をバキュロウイルスの系を用いてSf9培養細胞に発現させたリコンビナントタンパク質のJH分解活性を調べた。
【結果】JHEH遺伝子を探索した結果、カイコでは6種、コクヌストモドキでは5種の類縁遺伝子が発見された。それらをバキュロウイルスの系で発現させた遺伝子産物の酵素活性を調べたところ、それぞれ数種のリコンビナントタンパク質にJH分解活性が認められた。各種類縁遺伝子の系統解析を行うと、各昆虫の目ごとにクラスターを形成したことから、JHのタイプに応じた分解酵素遺伝子が目に分化した後に数種の遺伝子に分かれて出来たものと考えられた。また、カイコの各遺伝子の発現プロファイルを解析した結果、組織ごとに発現が制御されており、また時期により、発現の強弱にも差が認められた。これらのことは、分泌型のJHエステラーゼは終齢になり血液中で作用することで、全体内のJH濃度を下げるのに対し、非分泌型であるJHEHは、体内にJHが存在する時期において、組織ごとにJH濃度を調節していると考えられた。

T. Tsubota et al., *Insect Mol. Biol.*, **19**, 399-408 (2010).
A. Seino et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1421-1429 (2010).

juvenile hormone, epoxide hydrolase

講演番号：2C28a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ C校舎28会場

アワヨトウ性フェロモン生合成に関わるアシル基還元酵素遺伝子

Fatty-acyl reductase involved in sex pheromone production of the armyworm, *Pseudaletia separata*

○本賢一、李載みん、栗原政明、永田宏次[1]、田之倉優[1]、長澤寛道[1]、松本正吾（理研・松本分子昆虫学、[1]東大院農生科・応生化）
○Ken-ichi Moto, Jae-Min Lee, Masaaki Kurihara, Koji Nagata[1], Masaru Tanokura[1], Hiromichi Nagasawa[1], Shogo Matsumoto (RIKEN, [1]Univ. Tokyo)

【目的】アワヨトウ（*Pseudaletia separata*）の性フェロモン主要成分は(*Z*)-11-hexadecenyl acetateであり、パルミチン酸から（１）11位の不飽和化、（２）アシル基の還元、（３）末端OH基のアセチル化により生合成される。（２）に関わるアシル基還元酵素（pgFAR）は種特異的フェロモンブレンドの生成に重要な役割を担っており、本研究ではその酵素遺伝子の単離を試みた。
【方法】アワヨトウ羽化２日目のフェロモン腺から調製したcDNAを用いてdegenerate RT-PCRを行った結果、8種類の*pgFAR*ホモログ（PsFAR1-8）が得られた。成虫組織についてRT-PCR解析を行ったところ、PsFAR7が既知のフェロモン生合成遺伝子である脂肪酸Δ11不飽和化酵素と同様の発現パターンを示すことが分かった。そこでRACEによりORF全長をクローニング後、バキュロウイルス発現系を利用して機能解析を行った
【結果】PsFAR7が長鎖脂肪酸アシル還元酵素活性を有することが明らかとなった。本発表では、PsFAR7の基質特異性等も併せて報告する。

Pheromone, *Pseudaletia separata,* fatty-acyl reductase

講演番号：2C28a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ C校舎28会場

フェロモン生合成活性化ペプチド（PBAN）の構造活性相関に関する研究

Structure activity-relationship study of pheromone biosynthesis-activating neuropeptide (PBAN)

○河合 岳志、李 載みん[1]、永田 宏次、松本 正吾[1]、田之倉 優、長澤 寛道（東大院・農生科・応生化、[1]理研基幹研・分子昆虫）

○Takeshi Kawai, Jae Min Lee[1], Koji Nagata, Shogo Matsumoto[1], Masaru Tanokura, and Hiromichi Nagasawa (Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, [1]Molecular Entomology Laboratory, RIKEN Advanced Science Institute)

【目的】多くの蛾類昆虫において性フェロモンの生合成は、フェロモン生合成活性化神経ペプチド（PBAN）によって制御されている。PBANは約33アミノ酸残基のペプチドであり、その活性中心としてC末端にFXPRLamideを持っている。PBAN受容体（PABNR）はカイコガでは7回膜貫通型Gタンパク質共役型受容体（GPCR）としてすでに同定されている。本研究は害虫防除の観点から、PBANアンタゴニストの探索、開発のための構造活性相関に関する分子基盤情報を得ることを目的としている。その一環として、今回は、RXamide ペプチドとして知られている多くの生理活性ペプチドで保存されているC末端2残基目（C2位）に位置するアルギニン（Arg, R）に着目し実験を行った。

【方法】カイコガPBANのC末端10残基をモデルとしたペプチド（PBAN C10; SKTRYFSPRLamide）、さらにPBAN C10のC2位をアラニン（Ala, A）、アスパラギン酸（Asp, D）、セリン（Ser, S）、およびL-2-aminooctanoic acid（Aoc）に置換したペプチド$R^{C2}A$（SKTRYFSPALamide）、$R^{C2}D$（SKTRYFSPDLamide）、$R^{C2}S$（SKTRYFSPSLamide）、$R^{C2}Aoc$（SKTRYFSPAocLamide）をFmoc固相合成法により合成した。各ペプチドのアゴニスト活性は、PBANR-EGFPを恒常的に発現させたSf9昆虫細胞とカルシウムイオン指示薬Fura Red-AMを用いたカルシウムイメージング法により評価した。また、Rhodamine Red-X（RR）標識ペプチドを作製しPBANR-EGFPとの結合を共焦点レーザー走査型顕微鏡により観察した。

【結果】C2位を置換した四種の変異体ペプチドはいずれもPBAN C10と比較し、そのアゴニスト活性を低下させた。各変異体のアゴニスト活性は$R^{C2}Aoc$が最も強く、次いで$R^{C2}S$、$R^{C2}D$、$R^{C2}A$の順で活性が低下した。比較的低い活性を示した$R^{C2}A$と$R^{C2}D$のPBAN C10に対する阻害活性を確認したところ、$R^{C2}A$, $R^{C2}D$は阻害活性を示さなかった。各変異体のRR標識ペプチドとSf9に発現させたPBANR-EGFPとの結合は、各変異体のアゴニスト活性が飽和する濃度である100 nMでの条件においても観察できなかった。今回得られた結果から、PBANのC2位ArgはPBAN-PBANRの結合に重要であることが明らかとなった。さらにAoc側鎖は電荷を持たないがArg側鎖とその長さにおいて類似していることから、PBANRによるPBANのC2位Argの認識には、Arg側鎖グアニジル基の安定した正電荷だけでなく、その長さも重要であることが明らかとなった。

Keyword: G protein-coupled receptors, PBAN, sex pheromone

講演番号:2C28a10
講演日時、会場:3月23日10:49～ C校舎28会場

ボンビコール産生経路における昆虫PATファミリータンパク質BmLsd1の機能解析

Functional characterization of insect PAT family protein BmLsd1 in bombykol biosynthesis

○大西 敦、加治 美里、橋本 佳奈、松本 正吾（理研・松本分子昆虫学）
○Atsushi Ohnishi, Misato Kaji, Kana Hashimoto, Shogo Matsumoto (RIKEN)

【目的】カイコガ性フェロモン(ボンビコール)は、その合成・分泌に特化した器官であるフェロモン腺(PG)で*de novo*に生合成される。その産生過程は、頭部内分泌器官である食道下神経節で合成される神経ホルモンPBAN(pheromone biosynthesis activating neuropeptide)の作用により調節されている。ボンビコール産生過程において、PG細胞には多くの脂肪滴が確認でき、アセチルCoAから生合成されたボンビコール前駆体である脂肪酸は、PBANの刺激を受けるまでトリアシルグリセロール(TAG)の形で脂肪滴に蓄積する。PBANがPG細胞膜上のPBAN受容体と結合することにより、下流のシグナル伝達経路が活性化し、ボンビコール産生が開始する。PBANシグナルは、脂肪滴からボンビコール前駆体脂肪酸をTAGリパーゼの作用により遊離させ、脂肪酸還元酵素pgFARによる前駆体からボンビコールへの変換を誘導する。このように、脂肪滴はボンビコール産生過程で観察される脂肪滴TAGリポリシスにおいて、重要な役割を果たすオルガネラである。PG細胞から作製したESTクローンライブラリを調べた結果、昆虫PATファミリータンパク質Lsd1(lipid storage droplet protein-1)の存在が明らかになった。哺乳類のPATファミリータンパク質は、脂肪細胞内の脂肪滴に局在し、ホルモンの作用によるリン酸化を受けて活性化し、脂肪滴TAGリポリシスの促進に関与することが報告されている。そこでカイコガLsd1(BmLsd1)はボンビコール産生における脂肪滴TAGリポリシスでどのような機能をもつのか解析を行った。
【方法】(1)RT-PCRにより、カイコガ成虫における*BmLsd1*の組織発現を調べた。(2)*BmLsd1*の塩基配列を基に二本鎖RNA(dsRNA)を作成し、蛹化１日目の蛹にdsRNAを注射し、BmLsd1を発現抑制した。BmLsd1を発現抑制した個体から羽化後にPGを摘出し、それをサンプルとしてLCによるボンビコール量・脂肪滴TAG量の定量、またNile Red染色した脂肪滴の動態を蛍光顕微鏡で観察を行い、dsRNA非注射のコントロールと比較した。(3)抗BmLsd1抗体を作製し、これを用いてPG細胞を染色し、共焦点顕微鏡でBmLsd1のPG細胞内局在を調べた。(4)PBANの刺激によりBmLsd1はリン酸化を受けるのか確認するために、抗リン酸化アミノ酸抗体を用いてImmunoblot解析を行った。
【結果】(1)BmLsd1はPGだけでなく、脂肪体、卵でもその発現が確認できた。(2)BmLsd1の発現抑制により、ボンビコール産生量は顕著に減少した。またBmLsd1の発現抑制は、脂肪滴動態の蛍光顕微鏡観察、および脂肪滴TAG量の測定から、PBANが作用したときに誘導されるPG細胞の脂肪滴TAGリポリシスを阻害することが示された。(3)抗BmLsd1抗体、および中性脂質マーカーであるNile Redを用いてPG細胞を染色した結果、BmLsd1は脂肪滴に局在することが確認できた。(4)PBANの刺激によりBmLsd1のSer、およびThr残基がリン酸化を受けることが分かった。
以上の結果から、BmLsd1はPG細胞内の脂肪滴に局在し、PBANシグナル後のキナーゼによるリン酸化を介して脂肪滴TAGリポリシスに関与し、ボンビコール産生を促進することが示唆された。

BmLsd1, bombykol, lipolysis

講演番号：2C28a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ C校舎28会場

タイトル　異なるカイコ発現系により生産したタンパク質の解析

Title　Heterologous protein expression in silkworm, *Bombyx mori*

○梶浦裕之、立松謙一郎[1]、野村雄[2]、宮澤光博[1]、瀬筒秀樹[1]、宇佐美昭宏[2]、田村俊樹[1]、藤山和仁（阪大生物工学国際交流セ、[1]生物資源研、[2]シスメックス株式会社）

○Hiroyuki Kajiura, Ken-ichiro Tatematsu[1], Tyuyoshi Nomura, Mitsuhiro Miyazawa, Hideki Sezutsu, Akihiro Usami, Toshiki Tamura, Kazuhito Fujiyama (ICBiotech Osaka Univ., [1]NIAS, [2]Sysmex Corporation.)

【目的】カイコは組み換えタンパク質発現宿主として高いタンパク質生産能を有し、次世代の新規宿主細胞として利用が望まれる。カイコでのタンパク質発現にはバキュロウィルスを介した一過的な発現システムと形質転換による発現システムがある。両発現システムでは目的タンパク質の高発現が期待できるものの、そのタンパク質の安定性における知見は少ない。そこで本研究ではモデルタンパク質、ウシ由来インターフェロンγ（IFNγ）を一過的、あるいは安定発現させ、そのタンパク質の安定性を評価した。

【方法】それぞれの発現系で生産したウシ由来IFNγの精製を行った。精製IFNγを用い糖鎖を遊離する酵素であるPNGase F消化やnanoLC-MS/MS解析による*de novo* sequencingでタンパク質の安定性を評価した。

【結果】両発現系で生産したIFNγは翻訳後修飾の1つである糖鎖付加が起きた糖タンパク質として発現していた。一過的に発現させたタンパク質ではIFNγの部分分解が起きていることが示唆され、また安定発現により生産させたIFNγでもC末端側の数アミノ酸残基の分解を確認した。以上結果はカイコでのタンパク質発現系は高発現が可能である一方で、その分解にも注目する必要があることを示唆するものとなった。

Silkworm, Protein expression system, IFNγ

講演番号:2C28a12
講演日時、会場:3月23日11:21～ C校舎28会場

昆虫類の化学&光コミュニケーションとヒトの科学コミュニケーション

Insect Chemical Communication for Human Science Communication.

○笹川 浩美 ((財)国際科学振興財団 FAIS, (独)科学技術振興機構 JST・日本科学未来館).

○Hiromi Sasagawa (Foundation for Advancement of International Science FAIS, Japan Science and Technology Agency JST・National Museum of Emerging Science and Innovation).

【目的】「地球環境と生物種との関係」や,「生物種の生態とヒト社会の科学技術との関係」, すなわち「TSU NA GA RI(つながり)」をヒトの脳が意識することは, 国民の科学リテラシーの向上を目指す上で,大変重要であり不可欠である. そこで,国民の科学リテラシーの向上を目指す目的で, 国民と研究者とを繋ぐ架け橋として, 研究者による双方型科学コミュニケーション(SC)プログラム(SCP)および, 3方向型SCPを,農芸化学の視点から開発し,科学館にて複数回実施した.

具体的には,暗闇体験や,ヘイケボタル・ゲンジボタル・ヒカリキノコバエ・ウミボタル・オワンクラゲ・ミツバチ類などの研究成果や, 化学発光・蛍光などの科学技術を活用し,ストーリーを組み立てた. ヒトを含めた「光を操る生き物達」が共存可能な地球環境を考えるヒントを示し提供した.

【方法】本SCプログラムは, 対象を小学校高学年以上～成人とし, 実物や実験・研究者の研究成果を用いて, 約25分間の直接対話型・体験型に開発した. 会場は,3面大型スクリーン・明暗の制御が可能な階段教室を活用した. 参加者は,暗闇を体験後,ホタルの光コミュニケーションを鑑賞. 終了後は, アンケート調査を行った.

【結果】① 実施は11回, 297名が参加した. 内容は「ヒトの科学技術・発光・化学コミュニケーション・生物多様性・宇宙からみた地球の夜・光を操る生き物達の共存」を扱い,国際生物多様性年や東日本大震災・節電・エネルギー問題などを考慮した. 暗闇を体験した後, ホタルの発光時の照度と,ヒトの読み書き可能な照度とを比較した. 「ヒトは,生物の生きる知恵を科学技術へ活用している.目標は,ヒトを含めた光を操る生物種が共存可能な地球環境を目指し実現しよう!」というSCが実現, 成功した. 現在は, 約15分～20分間のサイエンスミニトークとして実演している.

【考察】農芸化学の視点に立ち, ヒトを「光りを操る生き物」として捉え, 生物の生態と科学技術とをつなげるSCPは, 生物種の共存を可能にするための地球環境を世代を超えて考えさせた.

本プログラムは, 被災地における博物館の震災復興記念事業のイベントにも活用される.

【謝辞】本SCプログラムの開発および実施に御協力いただいた, 名古屋大学大学院 生命農学研究科 大場裕一博士・桐蔭学園高等学校 教諭 池谷治義氏・埼玉県立蕨高等学校 教諭 菅野治虫氏・日本科学未来館 提髪玲子博士・豊田倫子女史・小林直樹博士・代島慶一氏・菅野和彦氏ら, 関係者各位へ厚く御礼申し上げる.ヒトを含めた光を操る・ヒトを含めた社会性動物と地球環境との繋がりを考えるSCは成功した.

human science communication, bio-diversity, insect chemical communication

講演番号:2C28a13
講演日時、会場:3月23日11:32～ C校舎28会場

細胞膜での抑制性グルタミン酸受容体の発現量に影響する因子

Structural factors of glutamate-gated chloride channels that influence the functional receptor density in cell membranes

○古谷章悟、山口武則、神橋貴彦、赤松美紀[1]、入江貴裕[2]、尾添嘉久[2]、松田一彦（近畿大農・応生化、[1]京都大院・農・地環科、[2]島根大・生資科）

○Shogo Furutani,Takenori Yamaguchi,Takahiko Kanbashi, Miki Akamatsu[1], Takahiro Irie[2], Yoshihisa Ozoe[2], Kazuhiko Matsuda (Kinki Univ., [1]Kyoto Univ., Shimane Univ.)

【目的】我々は、単一の遺伝子から生じるカイコ抑制性グルタミン酸受容体のアイソフォーム(BmGluCl)の特性について解析してきた、その結果、アイソフォーム間での構造の違いは、受容体に対するグルタミン酸およびマクロライド系化合物イベルメクチン(IVM)の親和性に対してほとんど影響を及ぼさないが、細胞中での受容体発現量に対して顕著な影響を及ぼすことが明らかとなった。本研究ではこのような現象をもたらすBmGluClの因子を、受容体をモデリングして比較することにより解明することを目的とした。

【方法】線虫*Caenorhabditis elegans*のX線結晶構造をもとにしてそれぞれのアイソフォームホモダイマーのグルタミン酸およびIVM複合体を、PDFAMSソフトウエアを用いてアラインメント、モデリングし、分子力場法MMFF94によりエネルギー極小化を行った。

【結果】アフリカツメガエル卵母細胞およびCOS-1細胞で、BmBluCl exon3cアイソフォームは最も高密度で発現するのに対してexon 3aアイソフォームは最も低密度で発現する。そこでこれら2種のアイソフォームを *C。 elegans* GluCl αサブユニットの結晶構造をもとにモデリングした結果、exon 3がコードする領域に存在する一つの塩基性アミノ酸がグルタミン酸のαカルボキシ基と静電的に相互作用することが見出された。しかしこの相互作用は、exon 3aとexon 3cのいずれのアイソフォームでも見られた。またexon 3がコードする領域はIVMの結合部位とは離れた位置に存在した。これらの知見によって、exon 3から生じるアイソフォーム間でグルタミン酸およびIVMの親和性に大きな差が見られないことが説明可能であった。

次に、発現させた細胞膜でのBmGluCl密度に影響する可能性のあるexon 3コード領域の因子について精査した。その結果、exon 3cアイソフォームでは、グルタミン酸のαカルボキシ基と静電的に相互作用する塩基性アミノ酸とは別の塩基性アミノ酸が、隣接するサブユニットのグルタミン酸と静電的に相互作用するのに対して、exon 3aアイソフォームではそのようなサブユニット間の相互作用が見られなかった。つまり、exon 3cアイソフォームではサブユニット間の会合を促進する因子が存在するのに対してexon 3aアイソフォームではそのような因子がないため、イオンチャネルとして機能する受容体のアイソフォーム間での発現量が異なるものと考えられた。

Glutamate-gated chloride channel、L-Glutamate、Iermectin

講演番号:2C28a14
講演日時、会場:3月23日11:43～ C校舎28会場

線虫*C. elegans*のインスリン様ペプチドINS-17の発現とその制御機構

Expression pattern and regulation of INS-17, one of the antagonists of insulin/IGF-I signaling, in *C. elegans*

○中島健輔[1]、松永洋平[2]、玄行-安藤恵子[3,4]、三谷昌平[3,4]、岩崎 崇[1,2]、河野 強[1,2]
([1]鳥取大農・生物資源科学、[2]鳥取大院・連合農学、[3]東京女子医大院・生理、[4]CREST・JST)
○Kensuke Nakashima[1], Yohei Matsunaga[2], Keiko Gengyo-Ando[3,4], Shohei Mitani[3,4], Takashi Iwasaki[2], Tsuyoshi Kawano[1,2]
([1]Dept. of Bioresource Sciences, Faculty of Agriculture, Tottori Univ., [2]Dept. of Bioresources Science, The United Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori Univ., [3]Dept. of Physiology, Graduate School of Medicine, Tokyo Women's Medical Univ., [4]CREST・JST)

線虫 *Caenorhabditis elegans* は、多様な生命現象を解析するために用いられる優れたモデル生物である。この *C. elegans* のインスリン様シグナルは幼虫休眠、成虫寿命などを制御することが知られている。現在、40 種類のインスリン様ペプチドの存在が示唆されており、予想されるジスルフィド結合の様式により Type-α、-β、-γに分類される。演者らは哺乳動物のインスリン族ペプチドと同一のジスルフィド結合を有する INS-18（type-γ）を世界に先駆けて同定し、機能解析等を進めてきた。本大会では INS-18 と高い相同性を示す INS-17 の発現パターンと発現制御機構を中心に報告する。

遺伝子破壊線虫を用いた機能解析により INS-17 は幼虫休眠のみに関与し、INS-18 と同様にアンタゴニストとして機能することが明らかとなった。また、両遺伝子の二重破壊線虫を用いた機能解析から、両ペプチドによる休眠制御効果は相加的であることが判明した。

次いで、より詳細な INS-17 の機能解析を行うために、時空間的な発現変動を観察することにした。INS-17::VENUS を発現する線虫を作出し、各生育ステージにおける発現パターンを観察したところ、恒常的に頭部における発現が観察された。興味深いことに、休眠期･成虫期においてのみ介在神経における強い発現が観察された。これは、INS-18::RFP の発現パターンとは異なっていた。

また、*ins-17* のプロモーター領域を解析したところ、インスリン様シグナルの下流に存在する転写因子 DAF-16 の認識配列が認められた。そこで、転写因子 DAF-16 による *ins-17* の発現制御の可能性を検証した。DAF-16 機能欠損株では *ins-17* 発現の著しい減少が認められたことから、DAF-16 が *ins-17* の発現を促進していると考えた。インスリン様シグナルが減少すると、下流の転写因子 DAF-16 が核に移行する。よって、アンタゴニストである INS-17 によりインスリン様シグナルが減少すると、DAF-16 が核に移行し、*ins-17* の発現を促進する正のフィードバック機構（モデル）が考えられる。これは *ins-18* においても同様である。

以上のことから、両インスリン様遺伝子は異なる発現部位で休眠を制御するが、下流の転写因子 DAF-16 により同様に発現制御を受けると考えられる。

C. elegans, insulin, diapause

講演番号:2C28a15
講演日時、会場:3月23日11:54～ C校舎28会場

線虫*C. elegans* のインスリン様ペプチドINS-35 の幼虫休眠制御機構

Control mechanism of larval diapause by INS-35, one of the insulin-like molecules, in *C. elegans*

○松永 洋平[1]、片山 侑希[2]、岩崎 崇[1,2]、河野 強[1,2]（[1]鳥大院・連農研、[2]鳥大院・農研）
○Yohei Matsunaga[1], Yuki Katayama[2], Takashi Iwasaki[1,2], Tsuyoshi Kawano[1,2]（[1]The United Grad. School of Agric. Sciences, Tottori Univ.; [2]Faculty of Agric., Tottori Univ.）

【目的】
線虫*Caenorhabditis elegans* は、餌の枯渇、生育密度の上昇に伴う休眠誘導フェロモン濃度の上昇、高温などの過酷な生育環境にさらされると、耐性幼虫という特殊な形態をとり幼虫休眠する事が知られている。この幼虫休眠の制御には、インスリン様シグナルが関与する。現在、40種のインスリン様分子の存在が示唆されており、これらはS-S結合様式により、Type-α,-β,-γに分類される。このうちType-αペプチドは哺乳動物のインスリン族ペプチドとは異なるS-S結合様式を有していると予想されている事から、これまで生理機能解析が行われていなかった。そこで、我々は生理機能を有するType-αペプチドの探索を行うため、RNA 干渉法を用いたスクリーニングを行った。その結果、*ins-35* RNA 干渉が著しく幼虫休眠を誘導する事を明らかにした。そこで本研究では、*ins-35* の機能をより詳細に解析する事を目的として、①*ins-35* 変異体を用いた機能解析、②living-GFP 法を用いた時空間的な発現パターンの解析を行った。
【方法】
〈幼虫休眠率測定〉線虫の培養濾液より調製した休眠誘導フェロモン粗抽出液を添加し、休眠誘導条件下における幼虫休眠率を測定した。*ins-35* 破壊株ならびに*ins-35* 過剰発現株を対象とした測定を行い、加えて、部位特異的レスキュー実験を行った。
〈発現パターンの解析〉microinjection 法によりINS-35::GFP を発現する線虫を作出し、幼虫休眠前後の発現パターンを観察した。
【結果】
ins-35 破壊株は極めて高い幼虫休眠率を示した。加えて、*ins-35* 過剰発現株は幼虫休眠率を野生株より減少させた。また、腸のみでins-35 を発現させると*ins-35* 破壊株の表現型を完全に回復させた。興味深い事に、幼虫休眠期において腸組織におけるINS-35::GFP の発現が著しく変動した。一方、頭部神経での発現変動は認められなかった。以上の結果から、①INS-35 はインスリン様シグナルを亢進し、幼虫休眠を抑制するアゴニストとして機能し、②INS-35 は腸組織において幼虫休眠を制御すると考えられる。

Caenorhabditis elegans, insulin, diapasue

講演番号：2C28p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ C校舎28会場

エクジステロイド分泌の変動に着目したショウジョウバエの蛹形成メカニズムの解析

Fluctuation of ecdysteroid titer determines developmental fate in *Drosophila melanogaster*.

○増田亮太，吉永直子，森直樹，西田律夫，小野肇（京大院農・応用生命）
○Ryota Masuda, Naoko Yoshinaga, Naoki Mori, Ritsuo Nishida, Hajime Ono (Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】昆虫では前胸腺で生合成されたエクダイソンが体内に分泌され，脱皮と変態が引き起こされる．一方で，発育過程ごとにエクジステロイドタイターは大きく異なり，エクジステロイド分泌の時期やタイターが発生プログラムの決定に関与していると考えられる． 3齢幼虫から蛹に至る段階でのエクジステロイド分泌のタイミングとタイターは複雑なパターンを示し，変態に関わっていると考えられるが，各エクジステロイドピークの役割は知られていない．そこで，２齢後期から変態期までに分泌されるエクジステロイドに着目し，各エクジステロイドピークが蛹形成に果たす役割を解析した．
【方法】ショウジョウバエの前胸腺で任意の時期にエクジステロイドを不活性化する系統を確立した．この系統ではRU486（プロゲステロン類縁体）を与えた任意の時期に前胸腺でエクジステロイド不活性化酵素CYP18Aの遺伝子が発現する．この系統の幼虫に対して，着目するエクジステロイド分泌の前にRU486を与えて発育を観察した．
【結果】2齢幼虫に高濃度のRU486を与えた場合，ほとんどの個体が脱皮できずに死亡した．低濃度のRU486を与えた場合には，幼虫の脱皮と変態が正常に進行する割合が上昇し，ほとんどが成虫になった．しかし，一部の幼虫は，2齢から3齢への脱皮を経ずに蛹化し，正常な発育を遂げることなく死亡した．以上の結果は，低濃度のRU486の投与により，エクジステロイドが完全に不活性化されることなく，微量のエクジステロイドが体内に分泌され，引き起こされたと考えられる．
3齢幼虫では*sgs3-GFP* 系統を用いてGFP蛍光をエクジステロイド分泌の判定指標に用いてアッセイを行った．この系統では3齢初期に分泌されるエクジステロイドに応答して唾液腺でのGFP蛍光が誘導される．脱皮後2時間以内にRU486を与えた場合，GFP蛍光を示す個体と示さない個体が出現した．蛍光を示す個体ではRU486を与えなかった個体と幼虫での死亡率と蛹化率が変わらなかったが，蛍光を示さない個体では幼虫での死亡率が著しく上昇し，蛹化率が低下した．幼虫がGFP蛍光を示さない個体はRU486の投与により，3齢初期に分泌されるエクジステロイドが不活性化されたと考えられる．以上のことから， 3齢初期のエクジステロイド分泌が3齢幼虫の発育に重要であり，また蛹形成にも影響を与えることが分かった．
以上より，微量のエクジステロイド分泌により2齢から3齢への脱皮が起きなくても蛹化のプログラムが開始すると考えられる．また，3齢初期に分泌されるエクジステロイドが蛹形成に重要な機能を果たしていることが示唆された．

Ecdysteroid, Pupariation, *Drosophila melanogaster*

講演番号：2C28p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ C校舎28会場

乳腺および乳頭形成におけるマウス*Mab2111*遺伝子の機能解析

Functional analyses of mouse *Mab2111* gene during mammary gland and nipple development

○浅野　真也、尾上　貴俊、長瀬　裕樹、小島　拓哉、高橋　直樹（東大院農生科・応生化）
○Shinya Asano, Takatoshi Ogami, Hiroki Nagase, Takuya Kojima, Naoki Takahashi (Grad. Sch. Agr. LLife Sci. Univ. of Tokyo)

*Mab2111*は*Hox*遺伝子クラスターの一つである*Hoxc4*遺伝子の標的遺伝子として単離されてきた線虫*mab-21*遺伝子のマウスオーソログである。*Mab2111*は発生過程で重要な役割を担っていると考えられる。*Mab2111*のアミノ酸配列は生物種間で高度に保存されているが、既知遺伝子との相同性を持たない為我々はノックアウトマウスを作製し個体レベルでの解析を行った。*Mab2111*ノックアウトマウスは水晶体および包皮腺の形態形成異常を生じ、雄では不妊性が見られた。*Mab2111*ノックアウト雌では正常に妊娠・出産するが、その新生仔は遺伝子型によらず生後24時間以内に死亡するため、母獣の授乳行動に異常がある可能性が考えられた。ノックアウト雌の乳頭は野生型と比べ有意に小さく、それが授乳不全の原因ではないかと推測された。正常な乳頭・乳腺形成には胎児期における乳腺間充織と上皮の相互作用が必須である。胎児期の間充織おける*Mab2111*の発現が乳頭・乳腺形成に関与していることが示唆された。
また、ノックアウト雌には出産後の乳腺葉の早期の退縮が確認された。*Mab2111*遺伝子は乳管内腔細胞で発現しており、遺伝子機能の欠如により早期の退縮が引き起こされたと考えられる。
胎児期、授乳期における乳腺・乳頭の形態形成および細胞増殖・細胞死の異常がノックアウトマウスにおける授乳不全の原因と考えられることから、*Mab2111*は乳腺・乳頭形成およびその退縮の制御に関与していることが示唆される。

development, mouse,*Mab2111*

講演番号：2C28p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ C校舎28会場

糖化タンパク質受容体RAGEの細胞接着機能の解析

The functional analysis of RAGE as a cell adhesion molecule.

○大幸　巧、藤木　祐輔、早瀬　文孝[1]、渡辺　寛人（明治大農・生命科、[1]明治大農・農化）

○ Takumi Daikoh, Yusuke Fujiki, Fumitaka Hayase, Hitohito Watanabe (Faculty of Agriculture,Meiji Univ.)

【目的】糖尿病患者においては糖とタンパク質とのメイラード反応が亢進し、糖化タンパク質（Advanced Glycation End products; AGE）が生成・蓄積する。AGEは、その受容体RAGE（Receptor of AGE）を介して細胞に作用し、糖尿病合併症の発症・進行に関与することが知られている。一方RAGEはAGEのほか、HMGB1やS100/calgranulin群などの炎症性メディエーターをも認識することが明らかとなっている。RAGEは多様なリガンドとの相互作用を介してさまざまな細胞機能を修飾すると考えられるが、その解明は不十分である。

RAGEにはさまざまなスプライスバリアントが存在することが知られているが、膜タンパク質として機能しうる主要バリアントは、(1) AGEとの結合性をもつ「Full-RAGE」、および (2) AGE結合領域を欠失した「N-truncated RAGE」である。これらのうちFull-RAGE は細胞接着タンパク質としても機能することが報告されているが、その詳細は未解明であり、N-truncated RAGEの機能はほとんど明らかになっていない。本研究では、合併症の発症・進行におけるRAGEの新たな役割を明らかにすることを目的とし、これら膜貫通型RAGEスプライスバリアントの機能について解析した。

【方法および結果】Full-RAGE およびN-truncated RAGEが細胞接着タンパク質として機能しうることを確認するために、各バリアントの相互作用について検討を行った。タグを付加したhuman Full-RAGEおよびhuman N-truncated RAGEのリコンビナントタンパク質をそれぞれ大腸菌にて発現させ、これらを用いてGST pull-down assayを行ったところ、Full-RAGEとN-truncated RAGEとが相互作用することが明らかとなった。また、異なるタグを付加して同様に検討したところ、N-trucnated RAGEのホモフィリックな相互作用も確認された。

さらにFull-RAGEとN-truncated RAGEをそれぞれ安定過剰発現させたHEK293細胞株を樹立し、これらに対する単球の接着能について解析を行った。その結果、これらバリアントの過剰発現細胞において、コントロール細胞と比較して単球の接着が顕著に増大することが明らかとなった。

一方、GST pull-down assayで観察されたN-trucnated RAGEのホモフィリックな相互作用は、そのリガンドと考えられているS100A12タンパク質を共存させることによって増強されることを見出した。また、N-truncated RAGE過剰発現細胞株に対する単球の接着もS100A12の存在下で増大することが明らかとなった。これらのことから、今回解析した2種のRAGEバリアントは細胞接着タンパク質として作用すること、さらに炎症性リガンドがその作用を高めうることが示唆された。

Advanced glycation end-products,RAGE,adhesion molecule

講演番号：2C28p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ C校舎28会場

$NaIO_4$誘導性ラット腹腔滲出細胞の構成解析およびリポ多糖存在下でのサイトカイン産生

Cellular composition and lipopolysaccharide-induced cytokine production in peritoneal exudate cells induced by $NaIO_4$ in rats.

○安藤 翠、岩谷 一史、柏谷 宗紀、原 博、石塚 敏（北海道大・院農）
○Midori Ando, Hitoshi Iwaya, Munenori Kashiwaya, Hiroshi Hara, Satoshi Ishizuka (Hokudai)

【目的】亜鉛欠乏と炎症性腸疾患の関係についてはこれまで数多く報告されている。以前我々がおこなった研究で、軽度亜鉛欠乏状態のラットにおいてdextran sulfate sodium誘導性大腸炎の症状が悪化し、血中亜鉛濃度の低下が免疫系の挙動に影響を与えることが示唆された。本実験は、免疫系細胞であるマクロファージに亜鉛が与える直接的影響を調べるため、ラットから比較的多量のマクロファージを確保する方法として、過ヨウ素酸ナトリウム($NaIO_4$)腹腔内投与による腹腔滲出性細胞(PEC)の回収を試みた。回収したPECの細胞構成を解析するとともに、lipopolysaccharide(LPS)刺激に対するサイトカイン産生能を検証した。
【方法】誘導物質として$NaIO_4$をラットに腹腔内投与し、72時間後にラットからPECを回収し、フローサイトメトリーにより細胞構成を解析した。また、10%FBS含有RPMI1640培地にLPS(5 μg/ml)を添加した培地に、PECあるいは$NaIO_4$未投与ラットから回収した常在腹腔細胞を 1.0×10^6 cell/wellで播種し、24時間および48時間培養後の細胞上清中のサイトカイン量をELISA法により測定した。
【結果】構成解析の結果、回収したPECはほぼCD45+細胞で構成されており、そのうち約70%がマクロファージのマーカーであるF4/80+細胞であった。またこの大半は、CD163+であることから活性型であるM1型マクロファージと考えられた。サイトカイン産生において、誘導物質を投与せず回収した腹腔常在細胞はLPS刺激に対して明確なTNF-α産生能がみられなかった一方で、$NaIO_4$誘導性PECでは、LPS未刺激でのTNF-α産生が腹腔常在細胞に比べ顕著に高い値を示した。LPS刺激に対しTNF-α産生が増加する傾向がみられた。現在、LPS存在下でのマクロファージのサイトカイン産生に及ぼす培地中亜鉛濃度の影響を検討中である。

peritoneal exudate macrophage, lipopolysaccharide, cytokine

講演番号：2C28p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ C校舎28会場

S100A12タンパク質は腸管上皮細胞においてRAGE依存的な細胞死を制御する

S100A12 regulates intestinal epithelial cell death via RAGE

○松本　朋大、小暮　優太、石田　充代、針谷　敏夫、早瀬　文孝[1]、渡辺　寛人（明治大農・生命科、[1]明治大農・農化）

○Tomohiro Matsumoto, Yuta Kogure, Michiyo Ishida, Toshio Harigaya, Fumitaka Hayase, Hirohito Watanabe (Meiji Univ.)

【目的】RAGE(Receptor for Advanced Glycation End products)は糖化タンパク質のほか、S100ファミリータンパク質やHMGB1などさまざまなリガンドを認識するパターン認識受容体(PRRs)の一つである。RAGEは糖尿病合併症の発症・進行のみならず、炎症反応や中枢神経疾患などさまざまな病態に深く関与する。近年、RAGEが癌細胞の転移や増殖を制御するとの報告も多く、RAGEが関与する疾患はさらに広がりつつある。

炎症性腸疾患(IBD)は消化管において慢性的な炎症をともなう疾患の総称であり、未だ治療法の確立されていない原因不明の難病である。最近の報告では腸管上皮組織におけるプログラム細胞死の制御不全がIBDの一因である可能性が示されているが、その制御を調節する因子については不明な部分が多い。一方近年の報告により、IBD患者の腸内ではRAGEリガンドであるS100A12タンパク質が多く発現することが知られている。そこで我々はIBDの発症・病態におけるS100A12とRAGEの関与について検討することを目的として、腸管上皮における細胞死制御に対するRAGEシグナルの影響を解析した。

【方法および結果】雄のC57BL/6Jマウスに対し、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を経口投与することにより炎症性腸疾患モデルマウスを作出した。マウスより採取した結腸組織を蛍光免疫染色に供した結果、コントロール群では陰窩の底部にのみRAGEが発現していたのに対し、腸炎を誘導したモデルではRAGEの発現が陰窩底部から開口部に至るまでの結腸上皮全体に及ぶことが明らかとなった。

このことから我々は腸管上皮細胞でのRAGE発現がIBDの病態に何らかの影響を及ぼすと考え、ヒト腸管上皮由来細胞株であるHT29細胞における解析を行った。さまざまなRAGEリガンドをHT29細胞に投与し、その毒性を評価したところ、S100A12が顕著な細胞毒性を示すことを見出した。siRNAによりRAGEをノックダウンしたHT29細胞に同様の刺激を行った結果、コントロールに比べ死細胞の割合が減少したことから、S100A12の細胞毒性の少なくとも一部はRAGEを介した刺激によることが明らかとなった。さらにS100A12による腸管上皮細胞の細胞死形態を明らかにするため、刺激後の細胞におけるカスパーゼ活性を測定したところ、カスパーゼの活性化はみられなかった。このことより、RAGEを介したS100A12刺激は、HT29細胞に対してカスパーゼ非依存的な経路による細胞死を引き起こすことが示唆された。これらの結果は、上皮機能の恒常性とRAGEシグナルとの新たな関連を示したものであると考えられる。

RAGE, intestinal epithelium, inflammatory bowel disease

講演番号：2C28p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ C校舎28会場

遺伝性疾患Prader-Willi Syndromeにおける脳内OXT/OXTRの発現分布がもたらす生理学的機能不全

Differential Effects of the Oxytocin/Oxytocin Receptor gene Expression in the Brain via Variable Contribution of Prader-Willi syndrome.

○佐々木　真紀、佐藤　佳亮[1]、笠原　好之[1]、吉川　和明[2]、西森　克彦[1]、(東北大院・農、[1]東北院・農、[2]大阪大院・理)
○Maki SASAKI, Keisuke SATO[1], Yoshiyuki KASAHARA[1], Kazuaki YOSHIKAWA[2], Katsuhiko NISHIMORI[1] (Tohokudai, [1]Tohokudai, [2]Osakadai)

【目的】遺伝性疾患の一つであるPrader-Willi Syndrome(PWS)の疾患モデルマウス*Necdin*(*Ndn*)遺伝子KOマウスについて、*Ndn*の推定ターゲット遺伝子としてオキシトシン/オキシトシン受容体(OXT/OXTR) に着目した。脳の神経解剖学的異常を免疫組織染色により、生理行動学的障害は行動テストと生理学的解析により、発症メカニズムに関与しうるOXT/OXTR系の異常を見出すことを目的とした。
【方法】*Ndn*変異マウス雄15週齢のマウスより脳を摘出、免疫染色法にて視床下部領域室傍核および視策上核におけるOXT産生ニューロン分布を観察した。またOXTRを可視化するために、VenusをKIマウスと*Ndn* KOの二重変異マウス雄15週齢を用い、同様に脳を摘出、免疫染色法により脳内体温中枢領域である視床下部腹内側核、視床下部背内側核におけるOXTR発現ニューロンの分布を観察した。さらに5度の寒冷暴露条件下に両遺伝子型マウスを呈し、直腸体温を継時的に測定、6時間後脳を採取、OXTと神経活性化因子Fos及びOXTRとFosの二重免疫染色を行った。同時に、体温調節機構において神経の投射を受けると示唆されている褐色脂肪組織を採取、組織重量及び組織形態を両遺伝子型間で比較した。行動テストとしては、社会性識別テストを行った。
【結果】*Ndn*変異マウスにおいて、野生型マウスに比べ視床下部領域室傍核においてOXT産生ニューロンの減少が再現された。さらに視策上核におけるOXT産生ニューロンの顕著な減少を新たに見出した。また、*Ndn*変異-Venusノックインマウスの視床下部背内側核において*Ndn*野生型-Venusノックインマウスに比べ顕著なOXTR発現ニューロンの減少を見いだした。さらに寒冷時における直腸体温測定の結果、*Ndn*変異型マウスの方が4時間後有意な体温低下が見いだした。さらに褐色脂肪組織において、*Ndn*変異型マウスの方が組織重量過多、脂肪滴過多を観察した。加えて、行動テストにおける結果、*Ndn*変異型マウスの方が野生型に比べ社会性識別能に低下が見いだされた。以上より、PWS発症の原因遺伝子としての*Ndn*はその発症機序においてOXT/OXTR遺伝子の発現調節異常等を介している可能性を見出した。

Oxytocin, Oxytocin Receptor, Necdin

講演番号：2C28p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎28会場

中枢神経系におけるタンパク質B23の局在とリン酸化について

B23/Nucreophosmin localization and phosphorylation of central nerve system

○向井工智，西尾昌洋，梅川逸人　（三重大院生資）
○Tadatoshi Mukai, Masahiro Nishio, Hayato Umekawa
(Mie Univ. Graduate School of Bioresorces)

【目的】細胞増殖時に発現が高まりと核小体に局在化するため多機能性リン酸化タンパクのB23が，非増殖細胞でどのように機能しているのかの明らかにするため，神経疾患の原因の一つと考えられるキノリン酸（QA）が海馬神経細胞に損傷を起こす際の，どのようにB23の動態について検討した。
【方法】非増殖細胞としてマウス神経芽細胞(NB2a)とラット 海馬を用いて実験を行った。まず，NB2aを用いてB23の発現とThr198リン酸化(pB23/Thr198)の有無を蛍光免疫染色で確認した。分化誘導剤にはpalmitoylcarnitineを用いて，軸索形成および分裂停止を生じさせた。また，Wister 雄性ラットの 海馬における，B23の発現をwestern blottingで解析し，細胞内局在を蛍光免疫染色で検討した。

次に，正常海馬と QA(キノリン酸)による損傷海馬で B23 の局在変化を検討した。QA 投与による損傷海馬を作製し，B23 の蛍光免疫染色を行った。QA 投与はラットを麻酔下で脳定位固定装置に固定し，脳室に PBS を 1 μL，海馬に 50 mM QA を 1 μL 投与した。24 時間飼育後して脳を摘出，凍結切片を TUNEL 法でアポトーシスを検討した。

最後に，ROCK 阻害剤である fasudil の影響を損傷海馬で検討した。ラットを麻酔下で脳定位固定装置に固定し，1 mM fasudil を 10 μL 両脳室に投与した後，同様に QA を海馬に投与した。また fasudil をラット側脳室に投与し，蛍光免疫染色を行うことにより，pB23/Thr198 のリン酸化を検討した。
【結果】分化型や増殖型に関わらず，NB2a は核小体および核質に B23 が局在することが明らかとなり，分化型 NB2a では pB23/Thr198 が核小体に局在していた。また，正常海馬では，B23 が顆粒状細胞の核小体部位に局在していることが確認された。これらより，増殖細胞だけでなく，非増殖の神経細胞でも B23 が核小体および核で発現し，機能していることが示唆された。

次に，海馬を QA 刺激し細胞死誘導を引き起こすと，海馬顆粒状細胞の核小体に局在を示していた B23 が細胞質に移行した。細胞質で B23 が機能している事が示唆された。また，QA による海馬細胞死誘導は fasudil 投与によって，TUNEL 陽性細胞が減少した。そのため，直接あるいは間接的に fasudil は QA 刺激由来の細胞死を抑制することが示唆された。また，fasudil を正常海馬の側脳室に投与すると pB23/Thr198 の核小体局在が消失することが確認された。そのため，fasudil による pB23/Thr198 の脱リン酸化が明らかとなった。

以上より，B23 は非増殖細胞でも機能し，QA による神経損傷では fasudil の pB23/Thr198 の脱リン酸化がアポトーシス初期でストレスセンサーとして作用する可能性が考えられた。

B23 , hippocampus , QA

講演番号：2C28p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎28会場

β-1,3-glucanによるラット網膜虚血/再灌流後の神経細胞死抑制効果

β-1,3-glucan inhibits retinal cell death after ischemia-reperfusion injury in rat retina.

○汲田友佑[1)], 西尾昌洋[1)], 磯野直人[1)], 宇治幸隆[2)], 梅川逸人[1)]（三重大院生資[1)], 三重大院医[2)]）
○Yusuke Kumita[1)], Masahiro Nishio[1)], Naoto Isono[1)], Yukitaka Uji[2)], Hayato Umekawa[1)]
(Mie Univ. Graduate School of Biores.[1)] and Graduate School of Med.[2)])

【目的】緑内障は日本人の失明原因の第一位の眼疾患であり，眼圧が主要な原因である。緑内障は網膜に加圧がかかることにより視野障害・視力障害を引き起こす。一過性高眼圧は，緑内障の症状の一つである。β-1,3-glucan は，zymosan（酵母抽出液）の主成分で，zymosan は，視神経圧迫・硝子体内注入により眼内マクロファージの活性化・グリア細胞刺激で軸策再生を引き起こすことが報告されている。生物由来のβ-1,3-glucan はβ-1→6 の側鎖があるものが多く，その間隔・側鎖の長さは多様である。そこで今回，側鎖のないβ-1,3- glucan（分子量約 10,000，グルコース重合度 70 程度の純品）を用い，高眼圧モデルラットにおけるβ-1,3-glucan の網膜保護効果を検討した。
【方法】β-1,3-glucan が細胞増殖に作用するかを種々の細胞（HL-60,HeLa,VSMC,NB2a,Colon26）にて検討した。また，β-1,3-glucan が眼圧に作用するかをβ-1,3-glucan 溶液（Rabbit：0.1%）の点眼し，眼圧の測定を行った。*in vivo* の実験は，ラット（SD，♂，6 wk）の網膜電図（ERG）を測定した。高眼圧モデルは，高眼圧処置の 24 時間後に，DMSO に溶解したβ-1,3-glucan を硝子体内注入した。コントロール眼には DMSO のみを硝子体内注入した。高眼圧負荷 6 日後，ERG を測定し，高眼圧負荷前後の ERG の比較することにより，β-1,3-glucan の網膜保護効果を検討した。また，ERG 測定後，ラット眼を摘出し切片作製した後，HE 染色・TUNEL 法で神経細胞死等網膜の組織的観察を行った。
【結果】β-1,3-glucan には，細胞増殖試験で 10^{-2}～10^{-7} mg/mL の濃度では細胞増殖に影響がないことが明らかとなった。また，眼圧測定ではβ-1,3-glucan 投与による眼圧の有意な変動は見られなかった。高眼圧モデルでの ERG において，b 波（双極細胞・ミュラー細胞由来）はコントロール眼では Amplitude が大きく減少していたが，β-1,3-glucan 投与眼では保護作用が有意にみられた。また，網膜切片では，高眼圧による内網状層（IPL）の薄化も有意に抑制されていた。高眼圧処置により，網膜神経節細胞の数も減少するが，β-1,3-glucan 投与群ではその減少が抑制されており網膜神経節細胞の保護が示された。さらに，高眼圧による網膜神経節細胞のアポトーシス陽性細胞は，β -1,3-glucan 投与群で抑制されていた。β-1,3-glucan が高眼圧処置後の網膜神経節細胞のアポトーシスを抑制することや網膜細胞及び構造の破壊も抑制することから，β-1,3-glucan は ERG に見られる視機能を保護していることが示唆された。
現在，グルコース重合度の異なるβ-1,3-glucan にて網膜神経保護効果の違いをみている。また，β-1,3-glucan が zymosan と同様に網膜神経節細胞の軸索再生を促進するか視神経圧迫マウスに投与し検討している。

β-1,3-glucan, glaucoma, apoptosis

講演番号：2C28p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎28会場

味蕾におけるアノクタミンファミリーの細胞種特異的発現

Cell-type specific expression of anoctamin family genes in mouse taste bud

○黒川あずさ、應本真、阿部啓子、三坂巧(東大院農・応生化)
○Azusa Kurokawa, Makoto Ohmoto, Keiko Abe, Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem. The Univ. Tokyo)

【目的】食品中の呈味物質は口腔内の味蕾中の味細胞により受容される。各味質はそれぞれ異なる味細胞で受容される。味物質を受容すると味細胞では細胞内カルシウム濃度上昇とそれに続く膜電位変化が起こるが、細胞種ごとに電気生理学的な性質が異なることが報告されている。これまでに、電気生理学的解析により味蕾にカルシウム依存性塩化物イオンチャネルが存在することが示唆されているものの、その分子実体や発現細胞種に関する知見は少ない。近年、アノクタミンファミリーの一部が上皮細胞や感覚細胞で発現し、カルシウム依存性塩化物イオンチャネルとして機能することが報告されている。本研究では、味蕾に発現するアノクタミンファミリーの遺伝子を探索し、その発現味細胞種を同定することを試みた。
【方法・結果】アノクタミンファミリーの10種類の遺伝子について、味蕾での発現を調べた。マウス口腔内上皮層において*in situ* hybridizationを行ったところ、*Ano1*, *Ano7*, *Ano10*の3種類が味蕾の一部の細胞に特異的に発現していることを見出した。これらの発現細胞種を既知の味蕾細胞種マーカーとの二重*in situ* hybridizationにより調べた結果、*Ano1*が甘味・旨味・苦味・酸味受容細胞以外の味蕾細胞に、*Ano7*が甘味・旨味・苦味受容細胞に、*Ano10*が苦味受容細胞に特異的に発現していた。さらに、抗体染色によりAno1タンパク質は口腔に接する味孔付近に局在していることを示した。これらの結果から、味細胞の種類により異なる塩化物イオンチャネルが機能し、それぞれの膜電位特性に寄与していることが示唆された。

taste bud, calcium-activated chloride channel, anoctamin

講演番号:2C28p11
講演日時、会場:3月23日15:49～ C校舎28会場

OXT/OXTR システムによる母性行動の解析

Analysis of the maternal behavior related to the OXT/OXTR system

○浅山　瑛美、長田　大知、山下　晃人、佐藤　佳亮、佐々木　真紀、水上　浩明[1]、西森　克彦[1]（東北大院・農、[1]自治医大）

○Emi Asayama, Daichi Osada, Akihito Yamashita, Keisuke Satou, Maki Sasaki, Hiroaki Mizukami[1], Katsuhiko Nishimori (Touhoku Univ., [1]Jichi Med.Univ.)

【目的】脳内視床下部の室傍核(PVN) および視索上核(SON) 付近のニューロンにおいて生産され、下垂体後葉に蓄えられ分泌される9アミノ酸からなるペプチドホルモンであるオキシトシン(OXT) は、最近の研究において脳内で投射・拡散し神経修飾因子として脳活動を支える重要な因子として注目されている。OXT の受容体であるオキシトシン受容体(OXTR)は7回膜貫通領域を持つG プロテイン共役型の受容体であり、子宮・乳腺・卵巣・精巣・脳・腎臓・心臓などの様々な組織・器官で発現している。OXTRは分娩・射乳・生殖などに作用し、社会記憶、攻撃行動、不安行動、母性行動に関係していることが知られており、OXTR 遺伝子欠損マウスでは母性行動の低下が認められた。また、蛍光タンパク質であるVenus でOXTR 発現細胞を可視化したOXTR-Venus ノックインマウスを用いることで、母性行動に関係していると考えられている脳領域において、OXTRが発現していることが明らかとなった。OXT/OXTR が母性行動に深くかかわっていることは多くの研究により示されているものの、脳内でOXTR を介して母性行動に関わる領域について詳細は明らかとなっていない。そこで、母性行動におけるOXTR の機能解析および、OXT/OXTR 制御領域を明らかにすることを目的とする。

【方法】Oxtr 欠損マウスの脳内の外側中隔(Lateral septum:LS)に、OXTR を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV-Oxtr)ベクターをインジェクションし、母性行動を解析した。実験はげっ歯類に典型的な母性行動である、nest building 、retrieving、crouching に着目して解析を行った。

OXTR-Venus ノックイン雌マウスについて、母性行動発現時期を分娩中と分娩終了後の2つの時期に分け、非発情期を含めたそれぞれの時期について脳をサンプリングし、視床下部内側視索前野(medial preoptic area:MPOA)を含む薄切片を作成した。その後、抗GFP抗体と神経活性化の指標となるc-fos を染色する抗c-fos抗体を用いて免疫染色を行い、各陽性ニューロン数をカウントした。

【結果】Oxtr 欠損マウスのLSにAAV-Oxtrベクターをインジェクションし、母性行動を解析した結果、Oxtr 欠損マウスでみられた異常な母性行動が回復した。

また、OXTR-Venus ノックイン雌マウスを用いた免疫染色の結果から、母性行動関連脳領域であるMPOA において、分娩中・分娩終了後で非発情期と比較してVenus 陽性細胞とc-fos 陽性細胞の発現が有意に増加した。

現在は、他のOXTRが発現している母性行動関連領域について同様に解析を行っている。

oxytocin, oxytocin receptor, maternal behavior

講演番号：2C28p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎28会場

脂肪組織に見出された線溶酵素chymaseの肥満における役割について

The role of chymase, a novel fibrinolysis enzyme, in adipose tissue.

○菊澤 美沙子、安藤 有厚、関根 瞳、細野 崇、有賀 豊彦、関 泰一郎（日大院・生資科・応生科）

○Misako Kikuzawa, Tomohiro Ando, Hitomi Sekine, Takashi Hosono, Toyohiko Ariga, Taiichiro Seki (Nihon University Graduate School)

【背景・目的】近年、脂肪組織はadipocytokineと総称される様々な生理活性物質を産生・分泌する内分泌器官としての機能が注目されている。我々は、白色脂肪組織中に新規線溶酵素を見い出し、この酵素がマスト細胞が分泌するchymaseであることを明らかにした。本研究では、chymaseの肥満脂肪組織における機能について検討した。

【方法】8および20週齢の食餌誘導性肥満モデルマウスの脂肪組織におけるchymaseの発現をwestern blotting, real-time PCRにより測定した。Chymaseの生理機能については3T3-L1脂肪細胞およびマウス腹腔内マクロファージを用いて検討した。Chymaseが成熟脂肪細胞の分泌する線溶系因子に及ぼす影響について明らかにする目的で、3T3-L1前駆脂肪細胞をinsulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methyl xanthineを用いて分化誘導し、分化誘導開始9日後にchymaseを添加してさらに培養し、培養上清中の線溶活性をzymographyにより、遺伝子発現をreal-time PCRにより検討した。さらに、chymaseがマクロファージの遊走に及ぼす影響について明らかにする目的で、30週齢のICRマウス腹腔内に4%チオグリコレート培地を注射し、腹腔内に浸出したマクロファージを回収してchemotaxis assayを行った。

【結果】脂肪組織における各種炎症関連遺伝子の発現は肥満の進展により上昇した。20週齢の高脂肪食負荷マウス脂肪組織では、8週齢と比較してchymaseの発現が顕著に上昇し、さらにマスト細胞の脱顆粒を誘導するstem cell factorの遺伝子発現が上昇する傾向がみられた。また、chymaseは成熟脂肪細胞が分泌するMMP-2を活性化し、uPA, tPAを不活性化した。Chymaseは脂肪細胞が分泌するサイトカインの遺伝子発現にはほとんど影響を及ぼさなかったが、uPAの遺伝子発現を増加させる傾向がみられた。さらに、chymaseがgelatinase活性を有することをはじめて明らかにした。Chymaseは濃度依存的にマクロファージの遊走を促進させた。以上の結果から、chymaseは脂肪組織において、肥満の進行に伴い発現が上昇し、細胞外マトリックスの代謝制御と脂肪組織へのマクロファージの浸潤に関与する可能性が考えられた。

【結語】肥満に伴う脂肪組織の肥大化と慢性炎症の増悪化にchymaseが重要な役割を果たしていることが示唆された。

Chymase, Obesity, Fibrinolysis

講演番号：2C28p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ C校舎28会場

ケトン体Acetoacetateの脂肪細胞における脂質代謝に与える影響

The effects of ketone body, acetoacetate on lipid metabolism in adipocytes.

○原 久美子、高橋 信之、植田 容未、後藤 剛、河田 照雄（京大院農・食品生物）
○Kumiko Hara, Nobuyuki Takahashi, Yoshimi Ueda, Tsuyoshi Goto, Teruo Kawada (Kyotodai)

【目的】血液中に存在するケトン体は主にアセト酢酸（Acetoacetate, AcAc）とβ-ヒドロキシ酪酸（β-hydroxybutyrate, β-OHB）である。β-OHBはG protein coupled receptor（GPCR）であるGPR109aを介して脂肪細胞において中性脂肪の分解を抑制することが知られている。一方で、絶食や薬剤投与により肝臓の脂質代謝が亢進したマウスにおいてβ-OHBよりもAcAcの血中濃度が顕著に増加することが予備実験で明らかとなった。このことから、AcAcも脂質代謝情報を伝達する重要な液性因子である可能性が考えられる。そこで、AcAcが脂肪細胞の脂質代謝に与える影響とその生理的意義について検討した。
【方法】マウス由来前駆脂肪細胞（3T3-L1）をAcAc存在下で培養し、中性脂肪の蓄積及びその分解、さらに脂肪細胞分化に与える影響を検討した。
【結果】AcAcは正常状態の血中濃度（～1 mM）では中性脂肪の蓄積に影響を与えないが、絶食時の血中濃度（5 mM～）においては3T3-L1脂肪細胞における中性脂肪の蓄積を促進した。中性脂肪の分解活性は絶食時の血中濃度において抑制された。以上のことから、AcAcはβ-OHB同様、中性脂肪の蓄積を促進するとともに、中性脂肪の分解を抑制することが明らかとなった。さらに、絶食時の血中濃度においてこれらの現象が生じることから、ケトン体は絶食時にその供給源となる遊離脂肪酸の過剰な放出を、中性脂肪の分解を抑制することにより、フィードバック阻害する可能性が考えられる。このフィードバック阻害により、過剰なケトン体放出による血中pHの低下、及び過剰に存在すると毒性を示す遊離脂肪酸の過度な放出を防ぐと考えられる。

ketone body, adipocytes, lipolysis

講演番号：2C28p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎28会場

肺癌細胞LLC移植マウスにおける血清および肝臓脂質レベルならびに脂質関連パラメータの経時変動

Time Course Changes in Serum and Liver Lipid Levels and Lipid-Related Parameters in Lewis Lung Carcinoma-Implanted Mice

○川崎 雅志（岩手県大・盛岡短大・生活科学）
○Masashi Kawasaki (Iwate Prefectural University, Morioka Junior College)

【目的】これまでの研究において、肺癌細胞LLC（ルイス肺癌）移植マウスにおける血清および肝臓脂質レベルならびに脂質関連パラメータの変動を追跡し、5×10^6のLLC細胞を移植し、14日間飼育したマウスにおいていくつかの血清および肝臓脂質レベルの変動がみられ、脂質代謝異常の生じることを明らかにしている。[1)] 本研究では、LLC移植マウスにおける血清および肝臓脂質レベルならびに脂質関連パラメータの経時変動を検討した。
【方法】4週齢C57BL/6N雄マウスに5×10^4、5×10^5、5×10^6のLLC細胞を移植し、それぞれ、7、14、21日間飼育した。
【結果】5×10^5および5×10^6のLLC細胞を移植し、21日間飼育したマウスにおいて、正常群と比較して血清総コレステロール濃度に変化はなかったが、その一方で高密度リポタンパク質コレステロール濃度が有意に減少し、（超低密度リポタンパク質＋低密度リポタンパク質）コレステロール濃度が有意に増加した。このため、動脈硬化指数が有意に増加した。血清遊離コレステロール濃度が有意に上昇し、その一方でエステル結合型コレステロール濃度に変化はみられなかった。このため、担癌群のコレステロール比が正常群に比べて有意に低下した。血清トリグリセリド濃度に正常マウスと担癌マウスとの間に有意な変化はみられなかった。次に、肝臓コレステロール含量に正常マウスと担癌マウスとの間に有意な差はみられなかった。LLCの移植により肝臓トリグリセリド含量が有意に減少した。血清腫瘍壊死因子αおよびインターロイキン10濃度にLLC移植の影響はみられなかった。これら血清ならびに肝臓脂質レベルの変動は固形癌重量の増加に伴って著しくなっていった。
【結論】LLC移植マウスにおいては脂質代謝異常が生じ、これらの変動は癌の増殖に起因する癌状態の進行と関連している可能性が示唆された。
1）肺癌細胞LLC移植マウスにおける血清および肝臓脂質レベルならびに脂質関連パラメータの変動（日本農芸化学会2009年度大会講演要旨集，p135.）

cancer, serum and liver lipid, time course change

講演番号：2C28p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ C校舎28会場

ガーリックオイルが高脂肪食負荷モデルラットに及ぼす影響

The effects of garlic oil on lipid metabolism in high fat diet fed rat.

○香川祐輝、須田祐輔、渡辺智之 [1]、細野 崇、有賀豊彦、関 泰一郎（日大・生資科・農化、[1]日大院・生資科・応生科）

○Yuki Kagawa, Yusuke Suda, Tomoyuki Watanabe[1], Takashi Hosono, Toyohiko Ariga, Taiichiro Seki (Nihondai, Nihondaiin)

[目的]近年、生活習慣の変化に伴い我が国においても肥満が増加している。肥満は癌や脂肪性肝炎など様々な疾病の発症リスクを高める。そのため、肥満の予防や脂質代謝の改善に効果がある機能性食品が注目されている。我々は、ガーリックオイルが前駆脂肪細胞 3T3-L1 の分化を抑制することなどを報告している。そこで、本研究ではガーリックオイルが高脂肪食負荷モデルラットの脂質代謝に及ぼす影響について検討した。

[方法]雄性 SD ラット 5 週齢を 5 週間予備飼育し、群分けを行った後 AIN-93G を基準とした High fat diet(HFD)群、HFD+Garlic oil(5 mg/g diet)(HFD+GO)群に試験食を与えた。試験食を与えて 6 週間後、血液と各種臓器を採取し、Real-time PCR など各種分子生物学的実験方法、生理生化学的手法により解析を行った。

[結果]体重は HFD 群に比べ HFD+GO 群で有意に減少した。血漿中性脂肪濃度は HFD 群に比べて HFD+GO 群で有意に低値を示した。また、肝臓中性脂肪量及び総コレステロール量も HFD+GO 群で有意に低値を示した。一方、糞中脂質量は両群で差がなかった。脂質過酸化パラメータである TBARS は HFD 群に比べ、HFD+GO 群で有意に低値を示した。肝臓 CPT-1 mRNA 発現量は両群で差がなかったが、SREBP-1c, FAS の mRNA 発現量は HFD 群と比較して HFD＋GO 群で減少傾向を示した。肝臓 FAS 活性は mRNA 発現量と同様 HFD 群に比べ HFD+GO 群で減少傾向を示し、CPT-2 活性は HFD+GO 群で上昇傾向を示した。

[総括]ガーリックオイル摂取は糞中への脂質の排泄量にはほとんど影響を及ぼさず、脂質代謝を亢進することが示唆された。

Garlic, Obesity, Lipid metabolism

講演番号：2C28p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ C校舎28会場

タイトル　肥満動物の食事療法による急激な減量は、筋肉や骨密度にも影響する

Title　Rapid weight loss by diet in obese animals effects muscle mass and bone density

○素本　友紀、山田　明男、樋田　知宏、岩附　慧二（森永乳業食基研）

○Yuuki Somoto, Akio Yamada, Tomohiro Toida, Keiji Iwatsuki

(Food Sci. & Tech. Institute, Morinagamilk Ind. Co., Ltd,)

【目的】メタボリックシンドロームという言葉が一般的な用語となり、肥満が体に悪いということは、あまねく知られるところである。高齢者においても、肥満していることで運動意欲がそがれ、ロコモティブシンドロームの原因の一つとなることから、適度な減量が奨励される。しかしながら、その際食事だけによる減量では、体重減少の折に脂肪が減るだけではなく、筋肉や骨量なども共に減少し、ロコモティブシンドロームを助長することが示唆される[1)]。

ところで動物モデルに於いては、肥満モデルとしては、遺伝的背景を持つob/obマウスやZFラットなどがあり、また遺伝的には正常であっても高脂肪食を負荷することで肥満を誘導するモデル（DIO：diet induced obesity）等があるが、痩せについてのモデルはほとんど無い。

そこでDIOモデル動物を用いて、十分な肥満が見られた後、与える餌の脂質含量を減らすことで減量を試み、その際の体組成の変化を確認した。

【方法】SDラットにラードを含む高脂肪食(35%重量)を12ヶ月間与え、体脂肪率及び体重から判断して十分肥満になったことを確認した後、脂質含量が6%である低脂肪食に切換えて9ヶ月間飼育し、その経過を観察した。体脂肪及び骨密度の測定には、小動物用CT-スキャナを使用した。

また餌の脂質含量は糖質で調節し、餌に含まれる蛋白質量は高脂肪食も低脂肪食もほぼ同量となるように調製した。同時にこの低脂肪食に含まれる蛋白質の一部（1/100重量）を乳由来のペプチドに置き換えて飼育を行った。

【結果】餌に含まれる脂質の含量を減らすことで、劇的に体重は減少した（餌切替時→9ヵ月後：810.9±62.6g→578.6±25.1ｇ）。この時、内臓脂肪（125.0±7.9→41.1±6.8ｇ）や皮下脂肪（90.1±15.2g→23.1±4.5g）は劇的な減少を見せたが、同時にLBM（258.9±5.8→219.1±9.9ｇ）も減少した。更には、皮質骨密度（606.2±1.8→538.8±16.5mg/cm^3）も減少することが観察された。即ち、餌を高脂肪食から低脂肪食に切換えただけで、体内の脂肪だけが減少するのではなく、筋肉や骨密度の減少も同時に起こることが観察され、ヒトと同じ現象が再現された。

また、乳由来のペプチドを蛋白質の1/100重量添加した群では、餌の切替によってもほとんど体重の減少は認められなかった。この時、内臓脂肪には減少がみられたものの、皮下脂肪とLBMは試験開始時と同じか、むしろ試験開始時よりもやや増加していた。このため、体重としては変化が認められなかったものと思われる。また、皮質骨密度も試験開始時とほぼ同じであった。

肥満は多くの疾病を誘導するため、なるべく早くその状況を解消するのが望ましいが、然しながら、食事療法による急激な体重低下には筋肉や骨密度の低下といった危険が伴うことを認識し、十分な注意を払うことが必要であると思われた。

1)　N. Engl. J. Med. 364.1218（2011）

Keyword1 rapid weight loss, Keyword2 Sarcopenia, Keyword3 bone density

講演番号：2C28p17
講演日時、会場：3月23日17:15～ C校舎28会場

長期運動が白色脂肪組織線溶酵素 adipomin/chymase に及ぼす影響

The effect of long term exercise on adipomin/chymase expression in white adipose tissue.

○関根　瞳、菊澤　美沙子、釼崎　新一、安藤　有厚、細野　崇、有賀　豊彦、関　泰一郎（日大院・生資科・応生科）
○Hitomi Sekine, Misako Kikuzawa, Sinnichi Kenzaki, Tomohiro Ando, Takashi Hosono, Toyohiko Ariga, Taiichirou Seki (Nihon University Graduate School)

【目的】近年、脂肪組織は adipocytokine と総称される生理活性物質を産生・分泌する内分泌器官としての機能が明らかにされてきた。我々は、脂肪組織中に fibrinogen 分解活性を示す新規線溶酵素 adipomin を発見した。また、adipomin が肥満細胞由来の chymase と同一であることを明らかにした。さらに、肥満モデルラットである OLETF の脂肪組織において、非肥満コントロールラットである LETO と比較して adipomin/chymase のタンパク質発現および線溶活性が肥満により上昇することを明らかにした。このことから、adipomin/chymase と肥満との関係が示唆された。肥満やインスリン抵抗性の改善のために運動が実施されるが、運動が adipomin/chymase に及ぼす影響は明らかになっていない。そこで本研究では、ラット白色脂肪組織の adipomin/chymase 発現に及ぼす運動の影響について明らかにしようとした。

【方法】肥満モデルとしてOLETFラットおよび非肥満コントロールとしてLETOラットを4週齢で入手し、16週齢まで標準固型飼料(CE-2, 日本クレア)と水を自由に摂取させて予備飼育した。16週齢時に経口糖負荷試験を実施して耐糖能異常の発症を確認し、運動群と非運動群の4群に分けた。運動群は1日10分間の遊泳運動を週5日実施し、27週齢まで飼育した。27週齢で16時間絶食後に経口糖負荷試験を実施し、運動によるインスリン抵抗性の改善が見られるか確認した。その後、実験終了時に各種臓器重量を測定し、同時に白色脂肪組織におけるadipomin/chymaseについてreal time-PCRやzymographyにより解析した。

【結果】27週齢までの実験によりOLETFは511.1±13.5 g, LETOラットは370.2±9.4 gに体重が増加した。一方、運動群ではOLETFで495.9±5.9 g, LETOで366.2±7.0 gと体重には顕著な影響を及ぼさなかった。27週齢時に行った経口糖負荷試験では、OLETFでの耐糖能異常が運動により改善された。肥満によるPAI-1やLeptinなどのアディポサイトカインの遺伝子発現の上昇は運動により減少した。また、adipomin/chymase活性をfibrinogenを基質としたzymographyにより測定した結果、adipomin/chymase の mRNA レベルとは相関せず、運動は肥満により上昇した adipomin/chymase活性を低下させた。

【総括】運動は肥満細胞からのadipomin/chymase分泌や活性に影響を及ぼすことが明らかになった。

exercise, adipose tissue, mast cell

講演番号：2C28p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ C校舎28会場

かつおだしの美味しさに関与する因子：脂肪・砂糖摂取と食経験／学習の関与

Factors that contribute to the preference for dried-bonito *dashi*: involvement of fat/sugar ingestion and food experience/learning

○近藤 高史、松永 哲郎、椎名 貴彦[1]、志水 泰武[1]（京大院・農・食の未来戦略、[1]岐阜大・応用生物科学）

○Takashi Kondoh, Tetsuro Matsunaga, Takahiko Shiina[1], Yasutake Shimizu[1] (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [1]Fac. Applied Biol. Sci., Gifu Univ.)

【目的】かつおだしは、日本の代表的伝統食品のひとつであり、日本料理の味付けに重要な役割を果たしている。かつおだしの美味しさには、これまで香気成分とイノシン酸（うま味）が主要であると考えられてきたが、多量の酸味成分（乳酸）、苦味成分（ヒスチジン、クレアチニンなど）、ペプチド、タンパク質などの多種多様な成分も含まれているため複雑である。本研究では、かつおだしがなぜ美味しいのか、その秘密を明らかにすることを目的に、ラットを用いて嗜好性のメカニズムを検討した。

【方法】雄性Sprague-Dawley系ラットを用いた。かつおだしとして、「本造り一番だし」かつお（味の素株式会社製）を用いた。この製品は、4%の固形成分を含む5-10倍濃厚かつおだしである。さまざまな濃度のかつおだし水溶液に対する嗜好性を、48時間2瓶選択嗜好性試験法（水とかつおだしの摂取量測定試験）を用いて調べた。かつおだし溶液の提示順序は常法に従い、低い濃度から高い濃度へと変化させたが（上昇濃度系列）、逆に高い濃度から低い濃度へと変化させる実験（下降濃度系列）も行い、結果を比較した。飼料として高脂肪食、高砂糖食または正常食（コントロール食）を摂取させた。

【結果】

1）コントロール食摂取下のラットは、かつおだしを好んで摂取した。上昇濃度系列では、0.4%～4%の濃度範囲において嗜好性が認められた。
2）高脂肪食または高砂糖食摂取条件下のラットでは、かつだし嗜好性は著しく低下し、とくに低濃度（0.004%-0.4%）のかつおだしに対して忌避行動が観察された。
3）脂肪または砂糖によるかつおだし嗜好性抑制作用は、コントロール食摂取条件下で0.4%かつおだし水溶液（カロリー量は、わずか1.4 kcal/100 ml）を繰り返し摂取させることによりあらかじめかつおだし嗜好性を確立したラットにおいては、観察されなかった。
4）コントロール食摂取下のラットにおいて、下降濃度系列では、上昇濃度系列に比べてかつおだしの嗜好曲線が約100倍低濃度側にシフトした（著しく嗜好性が増加した）。

【結論】かつおだしの嗜好性は、飼料中の脂肪／砂糖組成、およびかつおだし摂取の食経験／学習により著しく変化する。とくに食経験／学習が最も重要な因子である。本結果は、かつおだし嗜好性が、摂取後に生じる生理効果を学習することにより著しく高まることを強く示唆する。

dried-bonito *dashi*, preference, experience

講演番号：2C28p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ C校舎28会場

外界からのストレス刺激がマウス肝臓中時計関連遺伝子の発現に与える影響

Effects of environmental stressor on Clock-related gene expressions in mouse liver

○青島 良輝[1]、榊原 啓之[1,2]、山崎 隼輔[1]、鈴木 敦美[1]、下位 香代子[1,2]（[1]静岡県大・院・生活健康、[2]静岡県大・環境研）

○Yoshiki Aoshima[1], Hiroyuki Sakakibara[1,2], Shunsuke Yamazaki[1], Atsumi Suzuki[1], Kayoko Shimoi[1,2] ([1]Grad. Sch. Nutr. Environ. Sci., University of Shizuoka, [2]Institute Environ. Sci., University of Shizuoka,)

【目的】我々の体内で展開されている多くの生理現象は、一日の中で活性が高い時間帯と低い時間帯が約 24 時間周期で繰り返されている（概日リズム）。概日リズムは、夜間の光曝露や過度のストレス負荷により撹乱され（永井等, 蛋白質 核酸 酵素, 2002, 47, 1914-23）、その結果、様々な疾患が誘発されると考えられている。しかしながら、外界からのストレス刺激、とくに日常生活で曝露し得る軽度なストレス刺激が概日リズムに与える影響に関する知見は、極めて少ない。本研究では日常生活を模した社会的ストレスの負荷や睡眠期の食餌が概日リズムに及ぼす影響を、マウス肝臓中の時計関連遺伝子の発現により追跡した。

【方法】マウスを 12 時間周期の明暗サイクル下で順化飼育した後、暗期（ZT14）に 1 時間の光曝露をおこなった。また、Miyashita 等の方法 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 349, 775-80) に従って、単独隔離ストレス（1 匹/ケージ）を 2 日および 90 日間、過密ストレス（20 匹/ケージ）を 2 日間負荷した。光曝露あるいは各ストレス負荷後に血清、肝臓を採取し、肝臓試料中の *Clock* や *Bmal1* 等の時計関連遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法にて、血中コルチコステロン量を EIA キットを用いて測定した。

【結果】暗期に光を曝露した 1 時間後より、明確な概日リズムを刻む肝臓中の *Bmal1*、*Clock*、*Per1* の発現パターンが有意に上昇したことから、光刺激が概日リズムに影響を与えることを確認した。2 日間の単独隔離あるいは過密ストレス負荷により、血中コルチコステロンが上昇し、さらに肝臓中 *Bmal1*、*Clock* の発現が上昇した。一方、*Per1* の発現は、単独隔離ストレスにより上昇したが、過密ストレスでは変化は見られなかった。単独隔離ストレスを 90 日間負荷すると、*Clock* の発現は上昇したが、*Bmal1* と *Per1* の発現量には顕著な変化は見られなかった。興味深いことに、概日リズムを刻んでいる血栓溶解阻害因子である PAI-1 の発現量が、2 日間の単独隔離ストレス負荷では対象群と同程度であったが、90 日間の負荷時には有意に上昇していた。以上の結果より、軽度な社会的ストレス負荷が、①時計遺伝子の発現に影響を及ぼす、②ストレスの種類や負荷する期間によって作用が異なる、③血栓溶解阻害因子の発現が上昇したことから、長期的なストレス負荷が血栓による疾患の発症リスクを高める可能性があることが示唆された。現在、社会的ストレスによる時計遺伝子の発現への影響が、リズムの振幅に対してなのか、それとも周期なのかについて、また、睡眠期の食餌摂取が概日リズムに及ぼす影響について検討を進めている。

Environmental stressor, Clock genes, Circadian rhythm

講演番号:2C28p20
講演日時、会場:3月23日17:48～ C校舎28会場

小胞体分子シャペロンER-60の基質結合ドメインとアミロイドβペプチド複合体の結晶構造解析
Crystal Structure of Complex of ER-60 bb' Fragment and Amyloyd β Peptide

○伊中浩治、古林直樹、裏出良博[1]、魚留信子[1]、鶴村俊治[1]、和田濱裕之[2]、裏出令子[2]（丸和栄養食品、[1]大阪バイオ研、[2]京大院・農）
○Koji Inaka, Naoki Furubayashi, Yoshihiro Urade[1], Nobuko Uodome[1], Toshiharu Tsurumura[1], Hiroyuki Wadahama[2], Reiko Urade[2] (MARUWA Foods and Biosciences Inc., [1]Osaka Bioscience Institute, [2]Kyoto University)

【目的】アルツハイマー病は、脳内に生じたアミロイドβペプチド(Aβ)により神経細胞死が惹起され、線維化したAβが沈着する痴呆症である。脳神経細胞に発現している小胞体分子シャペロンER-60がAβの細胞毒性に対する耐性を付与していること、またER-60はAβと1:1で結合することによりAβの線維化を阻害することを明らかにしてきた。ER-60によるAβの結合様式を解明するために、Aβとの結合領域であるER-60のbb'断片とER-60に結合しうる最小ペプチドであるAβ1-28の複合体の結晶構造解析を行った。
【方法】大腸菌発現系を用いてER-60のbb'断片をGSTとの融合タンパク質として大量発現させた。大腸菌溶出液をアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供した後、プロテアーゼ処理によりbb'断片を溶出させ、さらにゲル濾過クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーにより純化した。結晶化条件は、既に報告されている条件をベースに検討したが、さらに分解能を高めることを目的に、国際宇宙ステーションに設置されている日本の実験棟「きぼう」内に於いて、微小重力環境下で液液拡散法を用い、bb'断片およびbb'断片とAβ1-28の複合体の結晶化を行った。得られた結晶の回折実験は、SPring8のBL41XUにおいて実施し、数値化にはHKL2000を、構造解析とその精密化はccp4iを用いて行った。
【結果】これまでに報告されているbb'断片単独構造の最高分解能は2.0Å（PDB_ID:2H8L）であるが、今回宇宙実験で得られた結晶の最高分解能は1.39Åで、結晶の質を改善する事に成功した。得られた結晶は単斜晶系$P2_1$に属し、非対称単位中に独立な3個の分子が存在していることが明らかになった。最終の解析結果から得られた電子密度図はきわめて明瞭で、1.41Å分解能で、Rwork=0.198, Rfree=0.238を示す精密化モデルを得ることに成功した。その構造から、(1)bb'断片分子の二つのドメインの間に全長で20Åに及ぶ長いトンネルが存在する事、(2)またそのトンネルの内部に、bb'断片分子単独の場合には水分子による水素結合ネットワークが形成されている事、(3) bb'断片とAβ1-28の複合体構造の場合には、不明瞭な連続する電子密度が存在する事、が明らかになった。この不明瞭な電子密度は水分子と考えることは難しいものの、ペプチド断片として明瞭なモデルを構築するほどの連続性は確認できなかった。しかしながら、この電子密度は複合体分子以外では観察されず、また他の分子領域にはペプチドに該当する電子密度は観察されなかったことを考慮すると、Aβ1-28の一部がこのトンネル構造の一部と相互作用をして、bb'断片にトラップされている事を示唆していると考えられた。

molecular chaperone, amyloid β peptide, crystal structure

講演番号:2C28p21
講演日時、会場:3月23日17:59～ C校舎28会場

脳におけるER-60の発現量とレプチン作用との関係

Relationship between expression level of ER-60 and leptin signal in mouse brain

○裏出 令子、和田濵 裕之、有竹 浩介[1]、永田 奈々恵[1]、裏出 良博[1]
(京大院・農、[1]大阪バイオ研)
○Reiko Urade, Hiroyuki Wadahama, Kousuke Aritake[1], Nanae Nagata[1], Yoshihiro Urade[1]
(Kyoto Univ., [1]OBI)

【目的】小胞体はタンパク質および脂質の生合成の場であり、その機能は細胞内のエネルギー状態と密接に関連していると考えられる。しかし、新生タンパク質の立体構造形成を担う小胞体分子シャペロンの発現調節とエネルギー代謝調節との関係については不明である。レプチンは摂食抑制やエネルギー消費亢進作用をはじめとして、幅広くエネルギー代謝調節に関与するホルモンである。そこで、レプチン作用とER-60などの小胞体分子シャペロンの発現量との関係を明らかにすることを目的に研究を行った。
【方法】12週齢の雄の野生型マウス、レプチン欠損マウス(ob/ob)、レプチン受容体欠損マウス(db/db)の全脳からタンパク質を抽出し、SDS-PAGEで分離後ウエスタンブロッティングにより分子シャペロンを検出し、そのバンド強度から定量した。各分子シャペロンのmRNA量はリアルタイムPCR法により定量した。脳の組織染色は抗ER-60抗体を用いてDAB発色法により行った。ob/obへのレプチン投与は腹腔内に行い、28時間後に脳を採取し分析した。絶食実験では絶食開始48時間後に脳を採取し、同様に分析した。
【結果】ob/obマウスの脳における代表的な小胞体分子シャペロン (BiP, PDI, ER-60, ERp72, P5, calnexin, Calreticulin)のタンパク質量を解析し、野生型マウスに比してob/obマウスの脳でER-60の発現量が約70%に低下していることを見いだした。他の分子シャペロンの発現量には有意な差は見られなかった。また、ER-60 mRNA量も約60%に低下していた。ER-60は脳ではニューロンに強く発現しているが、ob/obマウスの大脳皮質の一部の領域のニューロンでER-60の発現量が低下していることを免疫染色により明らかにした。db/dbマウスの脳においてもER-60タンパク質量の顕著な低下が見られた。ob/obマウスへのレプチン投与により、28時間後にER-60の脳での発現量が1.5倍に増加した。レプチン投与28時間後では体重低下は認められなかった。また、16週間の高脂肪食による食餌性肥満マウスでは、脳での小胞体分子シャペロンの発現量の低下は見られなかった。以上の結果から、遺伝性肥満マウスにおけるER-60の発現量の低下は体脂肪量の増加が原因ではなくレプチン作用の遮断によることが示唆された。一方、野生型マウスの絶食により、脳でのER-60の発現量が50%に低下することも見いだした。われわれは既にレプチン標的臓器である肝臓においても、ER-60などの発現量がob/obやdb/dbで低下しており、ob/obへのレプチン投与により増加することを明らかにしている。したがって、レプチン感受性臓器においてはER-60の発現量がレプチン作用により調節されていると考えられる。

ER-60, molecular chaperone, leptin

講演番号：2C29a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ C校舎29会場

HDL産生を担うABCA1の1分子イメージング

Single-molecule imaging of ABCA1 responsible for HDL generation

○永田 紅[1]、中田千枝子[1、2]、笠井倫志[2]、楠見明弘[1、2]、植田和光[1、3]（[1]京大・iCeMS、[2]京大・再生研、[3]京大・院農）

○Koh Nagata[1], Chieko Nakada[1、2], Rinshi Kasai[2], Akihiro Kusumi[1、2], Kazumitsu Ueda[1、3] ([1]iCeMS, Kyoto Univ., [2]Inst. Frontier Med. Sci., Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ.)

【目的】ABCA1は、善玉コレステロールとして知られる高密度リポタンパク質（HDL）産生に必須の膜タンパク質である。ABCA1はATP加水分解依存的に細胞内の過剰なコレステロールやリン脂質を動かし、細胞外の脂質アクセプターであるアポリポタンパク質A-I（apoA-I）へ受け渡すことでHDL産生の初期段階を担う。しかし、その機構には不明な点が多い。本研究では、生細胞の細胞膜上でABCA1の動態とオリゴマー化を1分子追跡し、ABCA1の作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】野生型ABCA1あるいはATP加水分解活性をもたない非機能性ABCA1-MMとEGFPとの融合タンパク質をHeLa細胞で一過的に発現させ、apoA-Iの非存在下あるいは存在下で、1分子イメージングをおこない解析した。特に、蛍光輝点の段階的退色を調べることによって、オリゴマー形成を検討した。

【結果】1）apoA-I非存在下では、ABCA1分子の運動性は低く、約7割が静止し、3割が拡散運動をした。一方、非機能性のABCA1-MMでは、約2割が静止し、8割が拡散運動をした。このことから、ABCA1の機能発現により、細胞膜上でのABCA1の運動性が低下することが示された。2)静止したABCA1の蛍光輝点は、2段階で退色するものが多かった。これは、静止ABCA1はダイマーを形成しているものが多いことを示す。一方、拡散運動をしているABCA1あるいはABCA1-MMの輝点は、1段階退色を示し、これらはモノマーだと考えられる。3）ラトランキュリンによってアクチン細胞骨格を部分脱重合したところ、ABCA1の多くが易動性になった。4）培地にapoA-Iを添加すると、ABCA1の易動性が上昇し、10-15分後にはABCA1-MMと同等の運動性を示すようになった。生細胞におけるABCA1のダイマー化、apoA-IによるABCA1の動態変化は、世界ではじめての発見である。

これらの結果は、apoA-I非存在下では、ABCA1は構造変化してダイマー化すること、ダイマーはアクチン細胞骨格の関わる何らかの機構によって運動性が抑制されて静止すること、さらにapoA-IがABCA1と相互作用して脂質がABCA1からapoA-Iへ受け渡されると、抑制が解除され、ABCA1はモノマーに戻って運動性が上昇すること、を示唆している。

ABCA1, single-molecule imaging, HDL

講演番号：2C29a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ C校舎29会場

タイトル　神経疾患に関連するABCA13のSNPがABCタンパク質の機能に与える影響

Title　The effects of neurological disorder-related SNPs of ABCA13 on the function of ABC protein

○冨岡 麻衣子[1,2]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]（[1]京都大院・農、[2]京都大・iCeMS）

○Maiko Tomioka[1,2], Yasuhisa Kimura[1], Kazumitsu Ueda[1,2]

([1]Div. Of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Uni, [2]iCeMS, Kyoto Uni.)

【目的】ABCA13はABCタンパク質ファミリーに属する膜タンパク質で、それぞれ2つのATP結合領域（NBD）および膜貫通領域をもつ。ゲノムワイド関連研究における神経疾患(双極性障害、統合失調症)の患者を対象とした遺伝子解析の結果、コントロールに比べて患者に有意に存在するSNPがABCA13遺伝子においていくつか発見された（Am J Hum Gen, 85, 833, 2009)。これにより、ABCA13が脳において重要な生理機能を果たしており、その機能不全が神経疾患に繋がっている可能性が示唆された。しかし、ABCA13の生理的役割およびこれらのSNPがABCA13の局在や働きに与える影響は未だ不明である。そこで、本研究では、報告されたSNPの中でも特にABCタンパク質で高度に保存されているNBDに存在する2つのSNPに注目し、これらがABCタンパク質の機能に与える影響を検討した。

【方法】本研究では、ABCA13と高い相同性をもち、局在および機能がよく研究されているABCA1を用いて実験を行った。ABCA13の2つのSNP,T4550AおよびR4843Cに相当する変異T1088AおよびK2031CをABCA1に導入し、HEK293細胞を用いて変異体の安定発現株を樹立した。それらの細胞を用いて、ApoA-I結合能およびコレステロール排出活性を測定することによりABCタンパク質の機能に与える影響を、局在を解析することによりフォールディングに対する影響を調べた。

【結果】ABCA13のNBD1に存在するSNPを導入したABCA1の変異体T1088A安定発現細胞ではApoA-Iに対するコレステロールの排出が大幅に消失した。この変異体の局在を共焦点顕微鏡を用いて観察したところ、大部分が細胞内に留まっており、ApoA-Iとの相互作用もほとんど見られなかった。さらに、糖鎖解析およびカルネキシンとの共染色により局在を詳しく調べたところ、この変異体のほとんどがERに留まることが観察された。このことから、ABCA1のNBD1に存在する1088番目のThrのAlaへの置換はタンパク質のフォールディングに影響を与えることによりその多くがERに留まり、結果的にその機能を損わせる可能性が示唆された。一方、NBD2に存在するSNPを導入した変異体K2031Cの安定発現細胞では、WTのABCA1と同様の細胞膜への局在、膜におけるApoA-Iと相互作用、ApoA-Iに対するコレステロール排出が観察された。このことから、NBD2の2031番目のLysのCysへの置換はABCA1にはほとんど影響を与えないことが示唆された。本研究は、生研センタープロジェクトの一環として行われた。

ABC protein, Neurological disorder, SNPs

講演番号：2C29a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ C校舎29会場

コレステロール合成に対するABCG1の役割の解析

Analysis of roles of ABCG1 on cellular cholesterol synthesis

○渡邊　太郎[1]、平井　絢子[1]、植田　和光[1,2]、松尾　道憲[1]（[1]京大院・農・応用生命、[2]京大・iCeMS）
○Taro Watanabe[1]、Ayako Hirai[1]、Kazumitsu Ueda[1,2]、Michinori Matsuo[1]（[1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.）

【目的】　コレステロールは生体膜の構成に必須の成分であり、その恒常性は厳密に制御されている。コレステロールは非常に多くの段階を経て合成されるが、その律速段階は小胞体に存在するHMG-CoA reductase（HMGCR）がHMG-CoAをメバロン酸へと変換する反応である。HMGCRはsterol regulatory element-binding protein（SREBP）を介した転写制御、insulin induced gene（Insig）との結合を介したユビキチン化による分解制御、酵素活性部位のリン酸化による活性制御という複数の機構により制御されている。一方、コレステロールの細胞外への排出の多くはABCタンパク質によって担われている。ABCG1は細胞内の余剰コレステロールをHDLに対して排出するトランスポーターである。HEK293細胞にABCG1を発現させ、細胞内コレステロールをフィリピンで染色すると、細胞内コレステロール量が減少した。ところが、コレステロール排出能を持たないABCG1変異体を発現させた場合でも同様にフィリピンで染色される細胞内コレステロール量が減少することが分かった。これより本研究では、ABCG1がコレステロール排出非依存的に細胞内のコレステロールを減少させる機構を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】　ABCG1あるいはABCG1変異体を安定発現するHEK293細胞株を用いてコレステロール合成速度を測定したところ、ABCG1安定発現株では親株と比較してコレステロール合成速度が上昇していたが、ABCG1変異体安定発現株ではコレステロール合成速度が減少していた。このことよりABCG1がコレステロール排出活性非依存的にHMGCRを負に制御していることが示唆された。次にその制御機構を明らかにするために、HMGCRのmRNA転写量とタンパク質量を調べた。ABCG1を発現している細胞ではHMGCRのmRNA量とタンパク質量共に親株に比べて上昇していたのに対し、ABCG1変異体を発現している細胞では共に親株と変わらなかった。よって、ABCG1はHMGCRの活性の制御に関わっていることが示唆された。そこで、ABCG1とHMGCRの相互作用を免疫共沈降実験により検討したところ、ABCG1とHMGCRが相互作用することが分かった。これらの結果から、ABCG1がHMGCRと相互作用をすることで、コレステロール排出非依存的にHMGCRの活性を抑制するという新しいコレステロール合成制御機構が存在する可能性が示された。

Cholesterol, ABCG1, HMG-CoA reductase

講演番号：2C29a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ C校舎29会場

ABCA1とABCG1によるコレステロール排出のハイスループット測定系の開発

Development of high-throughput system for measuring cholesterol efflux by ABCA1 and ABCG1

○松尾 道憲、江澤 美智、植田 和光[1]（京大院・農、[1]京大・iCeMS）
○Michinori Matsuo, Michi Ezawa, Kazumitsu Ueda[1] (Kyoto Univ. Grad. Sch. of Agri., [1]iCeMS, Kyoto Univ.)

【目的】ABCA1とABCG1は様々な細胞に発現し、細胞内の過剰なコレステロールを排出することで、高密度リポタンパク質(HDL)形成に働く。末梢細胞とりわけマクロファージにおけるコレステロール蓄積がメタボリックシンドロームの原因の一つとなることから、ABCA1とABCG1の活性を上昇させるモジュレーターは動脈硬化症の予防と治療に役立つことが期待される。また、ABCA1とABCG1の阻害剤は、研究試薬としての応用が期待される。これまで、ABCA1とABCG1のコレステロール排出の解析には、脂質抽出した後比色法で測定する方法とRIラベルしたコレステロールを用いる方法が用いられてきた。近年、amplex redを用いた蛍光法が利用可能となったが、ハイスループットで多くの検体を細胞に作用させて測定するのには適していなかった。そこで、本研究ではABCA1とABCG1による細胞からのコレステロール排出活性を蛍光法でハイスループットに測定できる方法を開発することを目的とした。
【方法】ABCA1とABCG1を発現したHEK細胞、BHK細胞、またはマクロファージ分化後LXR/RXRリガンド処理で内在性ABCA1とABCG1を発現したTHP-1細胞を96ウェルディッシュで培養した。細胞を洗浄後、アポリポタンパク質A-I(apoA-I)またはHDLを含む排出培地で培養し、培養上清にamplex red反応液を加え、生じた蛍光物質を蛍光マイクロプレートリーダーで測定した。
【結果】従来の比色法と比較し、蛍光法では検出感度が向上していた。培養上清をそのまま測定に使用するため、培養液中の成分が測定に与える影響を調べたが、排出測定に使用するDMEM培地、アルブミン、apoA-Iは影響しなかった。また、HDL中にコレステロールが含有されるが、コントロールを測定して値を引くことで、コレステロール排出量を見積もることができた。HEK, BHK, THP-1細胞を用いた実験により、いずれの細胞でもABCA1またはABCG1からそれぞれapoA-I, HDLへのコレステロール排出量を、従来の方法と同様に測定することができた。RI法、比色法と比べて簡便で低コストに多量のサンプルを処理できることが分かった。実際に既知阻害剤を用いてハイスループットアッセイを行い、効率的に阻害剤を検出できた。従って、今回開発した方法を用いて、例えば食品成分ライブラリーを調べることで、ABCA1とABCG1の活性を亢進または阻害する食品成分のスクリーニングを行えることが期待される。なお、本研究は、生研センタープロジェクトの一環として行われた。

cholesterol, atherosclerosis, metabolic syndrome

講演番号：2C29a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ C校舎29会場

哺乳動物細胞小胞体膜に局在するDNAJB12は変異型SOD1の分解を促進する

Mammalian ER membrane-localized DNAJB12 promotes the degradation of SOD1 mutant proteins.

○保田裕貴、山本洋平、門倉広、河野憲二（奈良先端大・バイオ）
○Yuki Yasuda, Yo-hei Yamamoto, Hiroshi Kadokura, Kenji Kohno (NAIST)

最も重篤な神経変性疾患の1つである筋萎縮性側索硬化症は、大脳、脳幹、脊髄における体性運動ニューロンの変性により、全身の随意運動に関する筋群の萎縮と筋力低下を引き起こす。これまでに、家族性筋萎縮性側索硬化症の原因としてSOD1の遺伝子変異が多数報告されている。これらの変異が存在する個体では、変異型SOD1が形成するユビキチン化封入体が示す細胞毒性によって運動神経細胞死が引き起こされる。その結果、上述のような病態が生じると考えられている。したがって、変異型SOD1(superoxide dismutase 1)を細胞内から効率よく除去することができれば病状の改善に役立つと考えられる。

我々のこれまでの研究により小胞体膜局在型Ｊタンパク質であるDNAJB12が、小胞体関連分解を介して構造異常膜タンパク質の分解を促進することが明らかになっている。さらに、我々は最近、DNAJB12がサイトゾルに存在する構造異常タンパク質の分解も促進することを示唆する結果を得ている。上述の SOD1 もサイトゾルに存在することが報告されているので、SOD1 の分解もDNAJB12によって促進される可能性が考えられる。そこで、本研究ではこの可能性について検証した。DNAJB12 の細胞内の発現量を増大させると野生型に比べて、変異型 SOD1 の分解が促進した。また、DNAJB12 の細胞内の発現量を抑制すると変異型 SOD1 の蓄積量が増大した。さらに、DNAJB12 と SOD1 の結合を検討したところ、野生型、変異型にかかわらず DNAJB12 と SOD1 は結合していた。以上の結果は、DNAJB12 が小胞体膜上で変異型 SOD1 と結合し、その分解を促進する活性を持つことを強く示唆している。

Dnajb12, quality control, Sod1

講演番号：2C29a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ C校舎29会場

哺乳動物細胞小胞体におけるジスルフィド結合形成を解析する為の新規レポーターの作成

Developing a genetic assay for the analysis of disulfide bond formation in the ER of mammalian cells

○門倉　広、河野憲二（奈良先端大・バイオ）
○Hiroshi Kadokura, Kenji Kohno (NAIST)

ジスルフィド結合形成は、多くの分泌タンパク質にとって、立体構造形成上重要な反応ステップである。大腸菌においては、ペリプラズムでのジスルフィド結合形成活性や、分泌タンパク質のペリプラズムへの局在化活性が低下すると、β-ガラクトシダーゼ活性を発現する鋭敏なレポーターが開発されている。このレポーターは、大腸菌分泌タンパク質のジスルフィド結合形成過程や局在化過程の解析に大きく寄与している[Science 303, 534-537 (2004)]。我々は、哺乳動物小胞体内におけるジスルフィド結合形成機構の解析を促進する為に、哺乳動物細胞の小胞体で働く同様の系を開発したいと考えた。

今回、我々は、蛍のルシフェラーゼに様々な変異を導入したものを、分泌のためのシグナル配列と小胞体内残留シグナルを利用して、HeLa細胞の小胞体内に局在化させた。これにともない、この改変型ルシフェラーゼの分子内にジスルフィド結合が形成されるとともに、このタンパク質の活性は著しく低下した。一方、改変型ルシフェラーゼを発現する細胞を、ジスルフィド結合形成の非特異的な阻害剤である、DTT存在下培養すると、この細胞は、DTT非存在下、培養した細胞と比較して、20倍以上のルシフェラーゼ活性を発現した。これらの結果から、本タンパク質は、小胞体のジスルフィド結合形成能力の低下をモニターするための、鋭敏なレポーターとして機能しうることがわかった。本レポーターの利用についても議論したい。

disulfide bond formation, ER, reporter

講演番号：2C29a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ C校舎29会場

ペルオキシソーム形成不全CHO細胞におけるコリン代謝の異常

Choline metabolism in peroxisome-deficient CHO cells

○市来 弥生[1, 3]、奥 公秀[1, 3]、由里本 博也[1, 3]、藤木 幸夫[2, 3]、阪井 康能[1, 3]（[1]京大院農・応用生命、[2]九大院理院・システム生命、[3]CREST）

○Yayoi Ichiki[1, 3], Masahide Oku[1, 3], Hiroya Yurimoto[1, 3], Yukio Fujiki[2, 3], Yasuyoshi Sakai[1, 3] ([1]Division of Applied Life Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, Graduate School, [3]CREST)

【目的】ペルオキシソームは0.1～1 μmの球状あるいは楕円形の細胞小器官で、酵母から哺乳類まで様々な真核生物の細胞に広く存在する。ペルオキシソームは極長鎖脂肪酸のβ酸化、プラスマローゲンなどのエーテルリン脂質の合成、胆汁酸の生合成、D-アミノ酸の分解など、過酸化水素の生成と除去を伴う様々な代謝経路に関与している。そのため、ペルオキシソームにおける代謝活動によりペルオキシソーム内部とともに細胞内の酸化還元状態が変動すること、その変動が細胞機能に大きな影響を与えることが予想される。我々は細胞内の酸化還元状態を可視化できる蛍光プローブ（レドックスフロール）を開発し、これを用いてペルオキシソーム形成不全CHO細胞（ZP105）の細胞質内レドックス状態は正常細胞に比べて還元的であること、また、LC-MS/MSを用いたメタボローム解析により、ZP105細胞のグルタチオンやNADH、NADPHなどのレドックス関連代謝物の還元型/酸化型比は還元化傾向にあることを見出している。本研究ではさらにメタボロームを行い、正常細胞とペルオキシソーム形成不全細胞における代謝物量の変化を調べた。

【方法および結果】TKa（正常細胞）とZP105（*pex5*変異細胞）からメタノールで代謝物を抽出した。LC-MS/MSにてノンターゲット分析を行い、TKaとZP105の代謝物量を比較した。その結果、ホスファチジルコリンを生成するCDP-コリン経路の代謝物の一つであるホスホコリン量に違いが見られた。そこでCDP-コリン経路に関与するコリン、ホスホコリン、CDP-コリンの量を測定したところ、ZP105でCDP-コリン量が大きく増加していることがわかった。コリンからCDP-コリンへの代謝量の違いを調べるために、安定同位体標識コリンを含む培地で細胞を培養し、取り込み実験を行った。コリンは細胞内に取り込まれた後速やかにホスホコリンへ変換されていた。ZP105はTKaに比べてコリンの取り込み量が多く、CDP-コリンへの変換も速かった。細胞破砕液を用いた反応試験でも、ZP105の方がコリンからCDP-コリンへの変換量が多かった。これらの結果から、ペルオキシソーム形成不全細胞においてCDP-コリン経路が促進されていると考えられる。

metabolome, peroxisome, CDP-choline

講演番号：2C29a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ C校舎29会場

TAFIによる肝細胞死制御機構の解明

○石井 佳澄、重松　裕美、安藤　由夏[1]、池田　克幸[1]、大路　拓巳[1]、奥村　暢章、細野　崇、有賀　豊彦、関　泰一郎（日大院生資科応生科、[1]日大生資科生命化）

○Kasumi Ishii, Hiromi Shigematu, Yuka Andou[1], Katuyuki Ikeda, Ohoji Takumi, Nobuaki Okumura, Hosono Takashi, Ariga Toyohiko, Seki Taiichiro (Nichidaiin, [1]Nihondai)

【目的】Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)は肝臓で合成され、血漿中に分泌されるカルボキシペプチダーゼB (CPB)の前駆体である。TAFIはトロンビン、トロンビン/トロンボモジュリン複合体、プラスミンによって活性型(TAFIa)になるとCPB活性を示し、C末端リジン残基を切除して線溶を阻害する。我々はこれまでにplasmin(ogen)が肝細胞膜表面に結合することで肝再生を促進すること、TAFIの発現が肝障害後の肝再生において抑制されること、またTAFIが細胞増殖に抑制的に働くことなどを明らかにしてきた（J Biol Chem, 2009)。本研究では肝臓におけるTAFIの機能の解明を目的とし、TAFIと肝細胞死の関連について研究を行った。

【方法】Wistarラットからコラゲナーゼ灌流法を用いて肝細胞を単離し、初代培養した。初代培養肝細胞にトランスフェクション試薬を用いてTAFIsiRNAを導入し、アポトーシス実行因子であるcaspase-3の活性化をウェスタンブロッティングを用いて検討した。次にTAFI過剰発現plasmidを作成し、初代培養肝細胞に導入し経時的に回収しcaspase-3の活性化をウェスタンブロッティングを用いて検討した。

【結果】TAFIを抑制するとcaspase-3の活性化は抑制された。TAFIsiRNAと同時に細胞膜表面にplasmin(ogen)が結合することを阻害するトラネキサム酸を共添加してもcaspase-3の活性化にほとんど影響を及ぼさなかった。またTAFIsiRNAと同時にTAFIと同様の活性をもつ膵臓由来のCPBを共添加するとTAFIsiRNAによるcaspase-3の活性化の抑制はキャンセルされ、正常な肝細胞にCPBを添加してもcaspase-3の活性化の増加が見られた。TAFIを過剰に発現した細胞ではcaspase-3の活性化が増加した。

以上の結果からTAFIの発現抑制により肝細胞死が抑制されること、発現の増加により肝細胞死が促進することを明らかにした。またトラネキサム酸を用いた検討からTAFIによる肝細胞死の制御は、細胞膜表面へのplasminogen結合制御とは独立した機構によることが示唆された。

TAFI, hepatocyte, apoptosis

講演番号：2C29a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ C校舎29会場

タイトル筋肉細胞におけるEGCgの糖代謝に及ぼす影響について
Title The effect of EGCg on glucose metabolism in muscle cell
○上田 学、上田　修司、白井　康仁、芦田 均（神戸大院・農）
○Manabu Ueda, Shuji Ueda, Yasuhito Shirai, Hitoshi Ashida (Kobe University)

【目的】われわれは、エピガロカテキンガレート(EGCg)が、筋肉において糖輸送担体(GLUT4)の膜移行を促進することを報告している[1]。そこで本研究では、その作用機構の解明と細胞内に取り込まれたグルコースの代謝について検討を行った。
【方法】分化したL6筋管細胞にEGCgを15分間作用させた後、TRITCラベルされたファロイジンを用いて蛍光顕微鏡で細胞骨格のアクチンを観察した。インスリン伝達経路内タンパク質のリン酸化およびその発現量はウェスタンブロット法により検出した。糖の取り込み活性は、[^{3}H]-2-デオキシグルコースを用いて測定した。糖代謝に及ぼす影響については、L6筋管細胞に100 nM EGCgを30分間作用させた後、細胞内のグリコーゲン量を測定することにより評価した。
【結果】蛍光顕微鏡によるアクチンの観察により、EGCgは陰性対照であるDMSOに比べて細胞膜上におけるラッフル膜の形成を促進していたが、陽性対照である100 nMインスリンと比べてその効果は弱かった。この結果より、EGCgはインスリンとは異なる経路を介してGLUT4の細胞膜輸送を行うことが示唆された。そこで、EGCgの作用機構を解明するためにインスリン伝達経路内タンパク質のリン酸化に及ぼす影響について検討した。EGCgはPI3KおよびPKCのリン酸化を濃度依存的に促進し、その効果はPI3Kの阻害剤であるLY294002により抑制された。一方、EGCgは、PI3Kの上流に位置するIRおよびIRS-1やPI3Kの下流に位置するAktおよびAS160のリン酸化には影響を及ぼしていなかった。また、siRNA法によりIRをノックダウンしても、EGCgによるGLUT4膜移行促進効果には影響がなかった。以上の結果より、EGCgはインスリンとは異なる作用でPI3Kを活性化させ、GLUT4の膜移行を促進させることが示唆された。最後にEGCgにより筋肉細胞内に取り込まれたグルコースがどのように利用されているのかを検討するために、EGCgを75 mg/kg B.W.でラットに強制経口投与した1時間に筋肉を摘出し、グリコーゲン量を測定した。その結果、EGCg投与群は陰性対照である水投与群に比べて筋肉のグリコーゲン量が増加していた。また、L6筋管細胞に100 nM EGCgまたはインスリンをそれぞれ30分間作用させたところ、EGCgはインスリンと同程度グリコーゲンの蓄積を促進した。これらの結果より、EGCgは筋肉細胞内に取り込ませたグルコースをグリコーゲンとして蓄積させることが示唆された。
[1] Ueda M., et al. Biochem Biophys Res Commun (2008) 377:286-290

Keyword1, Keyword2, Keyword3 EGCg, GLUT4, muscle cells

講演番号：2C29a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ C校舎29会場

SOCS7はLPA2受容体を介するLPA誘導性細胞増殖を負に制御する

SOCS7 is a potent negative regulator of LPA-induced cell proliferation via LPA2 receptor signal transduction

○和田　菜々枝、小島　裕久、舛廣　善和、花澤　重正（日大生資科・応生科）
○Nanae Wada, Hirohisa Kojima, Yoshikazu Masuhiro, Shigemasa Hanazawa (Dept. Applied Biological Sciences, Coll. Bioresource Science, Nihon Univ.)

Suppressor Of Cytokine Signaling (SOCS)7 は、SOCS1～7、CIS で構成されている SOCS ファミリーに属しており、JAK-STAT シグナル伝達経路の負の制御因子として働く。また、SOCS7 遺伝子のノックアウトマウスは野生型よりも小さく、短命であることが報告されている。本研究室では、以前に SOCS7 の新規相互作用因子として、癌新生、転移および浸潤に深く係わる Lysophosphatidic Acid (LPA)の細胞遊走促進因子である Thyroid Hormone Receptor interacting Protein(TRIP)6 を得た。TRIP6 は、LPA 刺激後 LPA 2 受容体にリクルートされ、LPA 誘導性細胞遊走を促進することが報告されている。LPA2 シグナル伝達経路において、TRIP6 はそれ自身の c-Src 依存的なチロシンリン酸化（Y55）を介して下流の RhoA、ERK を活性化し、アクチンストレスファイバーの再編を促す。また、siRNA による TRIP6 のノックダウンは、これら細胞遊走やそのシグナルを有意に抑制することから、細胞骨格制御機構において重要な働きを持つことが明らかにされている。HEK293F 細胞において SOCS7 は TRIP6 の Y55 リン酸化を阻害した。さらに、SOCS7 は TRIP6 との相互作用を介して LPA2 シグナル伝達経路を負に制御し、ERK の活性化、ストレスファイバー形成、細胞遊走を抑制したことから、癌抑制遺伝子である可能性が考えられた。さらに、LPA は生体内に豊富に存在する脂質性の増殖因子であるため、SOCS7 が LPA による細胞増殖に対し何らかの影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで本実験では、LPA2 を発現し LPA 刺激による細胞増殖および遊走の亢進が確認されている卵巣癌細胞株 SK-OV-3 細胞を用いて、LPA による細胞増殖に対する SOCS7 の機能を解析した。

無血清処理を施したSK-OV-3細胞において、SOCS7の強制発現はLPA誘導性細胞増殖を抑制した。さらに、siRNAによるSOCS7のノックダウンは、それらの細胞増殖を促進した。以上の結果より、SOCS7はLPA2受容体を介する細胞遊走に加え細胞増殖を負に制御したことから、癌の増殖、転移および浸潤機構に重要な役割を持つ事が考えられた。今後は、*in vivo*におけるSOCS7の癌抑制効果に注目して研究を進めたい。

Socs, Lysophosphatidic Acid , Cancer

講演番号：2C29a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ C校舎29会場

腸上皮様細胞株 Caco-2 は分化に伴い H1 型組織血液型抗原とは異なるノロウイルス VLP 結合分子を発現する

Intestinal epithelial Caco-2 cells express norovirus VLP-binding molecules distinct from H1 histo-blood group antigen during differentiation

○村上　耕介、岡　智一郎、下池　貴志、脇田　隆字、松田　幹[1]、片山　和彦（国立感染研・ウイルス二部、[1]名大院生命農・応用分子生命科）

○ Kosuke Murakami, Tomoichiro Oka, Takashi Shimoike, Takaji Wakita, [1]Tsukasa Matsuda, Kazuhiko Katayama (Natl. Inst. Infect. Dis., Dept Virus II, [1]Nagoya Univ Grad. Sch. Bioagr Sci., Dept. Appl. Mol. Biosci.)

【目的】ヒトに感染するノロウイルス（norovirus：NoV）は、培養細胞で増殖させることができないことから、細胞への感染機構が明らかにされていない。特に細胞への結合という感染初期過程に不明な点が多い。培養細胞への結合は、バキュロウイルス／昆虫細胞発現系で作製したウイルス様中空粒子（virus-like particle：VLP）を用いて研究が進められている。これまでに我々は、NoV VLP が、3 日間培養したヒト腸上皮様細胞株 Caco-2 の頂端側細胞膜へ特異的に結合することを報告した。また、NoV の結合因子と考えられている組織血液型抗原（histo-blood group antigen：HBGA）のうち H1 型 HBGA について、Caco-2 における NoV VLP との局在を解析した結果、H1 型 HBGA を発現しない細胞にも NoV VLP が結合することを示した。本年度は、分化誘導前後の Caco-2 を用いることで、分化に伴う NoV VLP の結合の変化と H1 型 HBGA の関連性を明らかにすることを目的として解析を行った。

【方法】カバースリップ上で 3 日間培養した Caco-2 を未分化 Caco-2、セルカルチャーインサートで 21 日間培養したものを分化 Caco-2 として実験に供した。各細胞に NoV VLP を加えて反応させた後、細胞の透過・固定処理、特異抗体の反応を行い、細胞に結合した NoV VLP を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。同時に、抗 H1 型 HBGA 抗体で共染色することで、NoV VLP と H1 型 HBGA の局在を解析した。

【結果】NoV VLP は、未分化 Caco-2 と同様、分化 Caco-2 でも頂端側細胞膜に特異的に結合した。また NoV VLP が結合した細胞の割合は分化 Caco-2 の方が高かった。NoV VLP と H1 型 HBGA の局在を解析したところ、分化 Caco-2 では H1 型 HBGA が検出されず、NoV VLP と H1 型 HBGA の局在は一致しなかった。これらの結果から、NoV VLP は、Caco-2 の分化に伴い増加する、H1 型 HBGA と異なる分子を用いて Caco-2 に結合する可能性が示唆された。

Norovirus, Caco-2, Cell binding

講演番号：2C29a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ C校舎29会場

U937細胞における抗CD98抗体依存性細胞融合阻害物質の探索

Inhibition of anti-CD98 monoclonal antibody induced cell fusion by small molecules.

○桂川 美咲[1]、秋山 智美[1]、伊藤 守弘[2]、伊藤 康彦[2]、中川 大[1]、永井 和夫[1]、禹 済泰[1,3]、車 炳允[3]、飯田 加賀美[3]、大西 素子[1]（[1]中部大・応生、[2]中部大・生命、[3]中部大・生物機能開発研）

○Misaki Katsuragawa[1], Satomi Akiyama[1], Morihiro Ito[2], Yasuhiko Ito[2], Hiroshi Nakagawa[1], Kazuo Nagai[1], Je-tae Woo[1,3], Byung-Yoon Cha[3], Kagami Iida[3], and Motoko Ohnishi[1] ([1]College of Bioscience and Biotechnology, Chubu univ.[2]College of Life and Health Science, Chubu univ.[3]Research Institute for Biological Functions, Chubu univ.)

【目的】細胞融合は哺乳類の普遍的な生命現象の１つであり、受精時やエンベロープウイルス感染時以外に、破骨細胞の分化や、筋肉および胎盤の形成過程などで観察される。本研究では細胞融合の分子機構を明らかにするために、HIV エンベロープタンパク質 gp160 を発現するヒト単球由来 U937 細胞株（U2ME-7 細胞）を用いて、エンベロープウイルス感染細胞における CD98 重鎖依存的な細胞融合を特異的に阻害する化合物を探索した。

【方法】抗ヒト CD98 抗体によって誘導される U2ME-7 細胞の細胞融合に対する、天然低分子化合物の影響を検討した。U2ME-7 細胞は gp160 の発現を誘導するため、10 μM の $CdCl_2$ を含む MEM 培地、37℃、5%CO_2 下で培養した。1×10^5cells/well の細胞密度で 96 well プレートに播種し、１時間後に抗ヒト CD98 重鎖モノクローナル抗体を加えて、細胞融合を誘導した。細胞融合に対する化合物の影響は、抗体を加えてから 24 時間後に、細胞凝集数および融合細胞を含む凝集数を計測することにより評価した。

【結果】食品または生薬由来の 156 種類の化合物の細胞融合に対する影響を検討した結果、16 種類の化合物が U2ME-7 細胞の細胞融合を抑制することを見出した。これらのうち 5 種類は Na^+/K^+-ATPas を阻害する作用を有する化合物であった。そこで Na^+/K^+-ATPas 阻害剤として知られる、ouabain および oligomycin の細胞融合に対する影響について検討を行った。その結果、いずれの化合物も CD98 重鎖依存的な細胞融合を抑制することが明らかとなり、CD98 重鎖依存的な細胞融合の制御機構に Na^+/K^+-ATPase が関与する可能性が示唆された。現在、破骨細胞分化に対する、これらの CD98 重鎖依存的な細胞融合の阻害化合物の影響を評価し、エンベロープウイルス感染細胞と破骨細胞の融合機構における共通点について検討を行っている。

cell fusion, osteoclasts, Na+/K+ ATPase

講演番号：2C29p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ C校舎29会場

無細胞タンパク質合成系とクリックケミストリーを用いた新規N-ミリストイル化タンパク質の同定

Identification of novel N-myristoylated proteins using cell-free protein synthesis system and click chemistry

○高光 恵美、乗安 義実、岡村 剛、福重 大地、守屋 康子、内海 俊彦（山口大院・医・応用分子）

○Emi Takamitsu, Yoshimi Noriyasu, Tsuyoshi Okamura, Daichi Fukusige, Koko Moriya, Toshihiko Utsumi (Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ.)

【目的】タンパク質脂質修飾の検出には通常、培養細胞およびRI標識基質を用いた代謝標識法が用いられてきたが、長い露光時間、RI使用に伴う各種の制限、コストの面等に課題があり、non-RIでの手法の開発が進んでいる。その一つにクリックケミストリーによる検出がある。本研究では、タンパク質N-ミリストイル化の検出に無細胞タンパク質合成系とクリックケミストリーを組み合わせ、細胞を用いずしかもnon-RIでのN-ミリストイル化タンパク質の新規同定法の確立を試みた。

【方法】標識基質としてアジドミリスチン酸(Az-Myr)あるいはアルキニルミリスチン酸(Alk-Myr)を使用し、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質N-ミリストイル化反応後、クリックケミストリーによりビオチン化を行いECLにより検出した。この検出のための最適条件を検討し、遺伝子導入細胞(HEK293T細胞)における検出結果と比較検討した。また、この手法を用いて、かずさDNA研究所KOP cDNA clonesから新規N-ミリストイル化タンパク質の同定を試みた。

【結果】遺伝子導入細胞での標識では、Az-MyrとAlk-Myrのいずれにおいてもタンパク質N-ミリストイル化の検出が可能であったのに対し、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系では、Az-Myrでのみ明確な検出が可能であった。この手法を用いてかずさDNA研究所KOP cDNA clonesから新規N-ミリストイル化タンパク質の同定を試みたところ、４個の候補タンパク質中３個に明確なN-ミリストイル化が検出され、この結果は細胞での標識実験における結果と一致した。以上、無細胞タンパク質合成系とクリックケミストリーを組み合わせることにより、RI標識基質および培養細胞を使用せず、試験管内で簡便に短時間で新規N-ミリストイル化タンパク質を同定し得ることが示された。

N-myristoylation, click chemistry, cell-free protein synthesis system

講演番号:2C29p03
講演日時、会場:3月23日14:11～ C校舎29会場

I型cGMP依存性キナーゼによるTRPC6チャネルの制御機構に関する構造機能解析

The structure function analysis of TRPC6 channel regulation by type I cGMP-dependent protein kinase

○本田 啓、井上 隆司（福岡大・医）
○Akira Honda, Ryuji Inoue (Fukuoka Univ.)

【目的】I型cGMP依存性キナーゼ(PKG)は、血管の弛緩や神経情報伝達等で重要な役割を果たしているにも関わらず、その基質蛋白質の同定、基質認識に関するPKGの構造機能相関等の知見はあまり明らかではない。これまでに我々は、PKGが細胞内へのCa^{2+}流入を制御する受容体作動型Ca^{2+}チャネルであるTRPC6をリン酸化する事で負に制御することを明らかにした。そこで今回、このTRPC6 Ca^{2+}チャネルのI型PKGによる制御機構の詳細を明らかにすべく以下の実験を行った。
【方法】野生型及び変異型のI型PKGをBait、PKGでリン酸化を受ける部位を含むTRPC6のN末側細胞質領域をPreyとして酵母two-hybrid screening系を構築し、両者の相互作用及びcGMP依存性の変化について様々な点変異体を用いて検討を行った。また、血管平滑筋由来培養細胞A7r5株を用いて免疫沈降実験を行い、細胞内での相互作用の検討も併せて行った。
【結果】野生型PKGとTRPC6の間にはcGMP依存的な相互作用が見られたのに対し、PKGのC末側に存在するキナーゼ領域を欠失させた変異体とTRPC6の間では相互作用は見られるもののcGMP依存性が失われていた。また、I型PKGのN末側に存在し、蛋白質相互作用に関与するといわれているロイシンジッパーモチーフ及びそれに平行して存在する塩基性アミノ酸や酸性アミノ酸の繰り返し配列に変異を導入したところ、PKGとTRPC6との相互作用に変化が見られた。現在その詳細を酵母two-hybrid系及び免疫沈降実験等で検討しているところであり、併せて報告する予定である。

cgmp, pkg, trpc6

講演番号:2C29p04
講演日時、会場:3月23日14:22～ C校舎29会場

cGMP依存性プロテインキナーゼ(cGK)の新規基質同定

Identification a novel substrate of cGMP-dependent protein kinase (cGK).

○一色　衣香、湯浅　恵造、辻　明彦　(徳島大・STS研究部)
○Kinuka Isshiki, Keizo Yuasa, Akihiko Tsuji (Dept. of Biol. Sci. & Tech., Univ. of Tokushima, Grad. Sch.)

細胞内セカンドメッセンジャーであるcGMPは、NOやナトリウム利尿ペプチドの刺激を受けたグアニル酸シクラーゼによって産生され、主にcGMP依存性プロテインキナーゼ(cGK)の活性化を介してシグナルを伝達する。cGKは、平滑筋の弛緩や血小板機能の制御等様々な生理機能を有しており、その一つとして、がん細胞においてアポトーシスを誘導し、腫瘍の成長や転移、血管新生を抑制することが報告されている。しかしながら、β-カテニンやc-jun N-terminal kinase (JNK)の関与が示唆されているものの、cGKによる抗腫瘍効果の詳細なシグナル伝達経路は未だ解明されていない。そこで、本研究では、このシグナル伝達経路の解明を目的としてcGKの新規基質の同定を試みた。プロテインアレイを用いてcGK Iの基質を網羅的に探索した結果、cGKの候補基質としてDAPK (death-associated protein kinase) ファミリーの一つであるDAPK2を同定した。DAPKファミリーは、DAPK1、DAPK3など5種類のSer/Thrキナーゼによって構成され、アポトーシスの正の調節因子として機能している。DAPK2は、cGKによるリン酸化コンセンサス配列 (RRXS/T) を3か所有しており、cGKのアポトーシス誘導能における基質候補として有力であると考えられた。[γ-^{32}P]ATPを用いたin vitro kinaseアッセイにより、DAPK2は実際にcGKによってリン酸化され、また、そのリン酸化部位がSer^{299}、Ser^{367}、Ser^{368}であることが明らかになった。DAPK2はCa^{2+}/Calmodulin(CaM)依存性キナーゼであり、Ser^{299}はCa^{2+}/CaM結合領域中に存在する。一方で、Ser^{367}とSer^{368}は、C末端Tail部に属しており、この領域はホモ二量体形成に関与することが報告されている。これらの部位の擬似リン酸化変異体を作製し、ミオシン軽鎖を基質としてin vitro kinase assayを行った結果、擬似リン酸化変異体S299Dは、野生型に比べて活性が上昇することが明らかとなった。また、DAPK2はCa^{2+}/CaM結合ドメイン中にあるSer^{318}を自己リン酸化し、自身の活性を抑制することが示されているが、S299D変異体はこの自己抑制を打ち消し、Ca^{2+}/CaM非依存的に活性を有することが示唆された。さらに、S299D変異体は、乳がん細胞MCF7細胞において、野生型DAPK2よりも高いアポトーシス誘導効果を示した。以上の結果から、DAPK2は、cGKのアポトーシス誘導シグナルにおける基質として機能していることが考えられた。

cGK, PKG, DAPK2

講演番号：2C29p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ C校舎29会場

glabridinによるプロテインホスファターゼ2Cαの活性化と破骨細胞分化への影響

Activation of protein phosphatase 2Cα by glabridin and its effect on osteoclastogenesis

○秋山 智美、青山 友果、油井 信弘[1]、木村 賢一[1]、池原 強[2]、永井 和夫、禹 済泰、大西 素子
(中部大・応生、[1]岩手連大・農、[2](株)トロピカルテクノセンター)

○Satomi Akiyama, Yuka Aoyama, Nobuhiro Aburai[1], Ken-ichi Kimura[1], Tsuyoshi Ikehara[2], Kazuo Nagai, Je-Tae Woo, Motoko Ohnishi(Undergrad. School of Bioscience and Biotech., Chubu Univ., [1]Uni. Grad. Sch. of Agri. Sci., Iwate Univ., [2]Tropical Technology Center LTD.)

【目的】プロテインホスファターゼ2C(PP2C)は、PPMファミリーに属するSer/Thrホスファターゼであり、哺乳類では遺伝子の異なる18種類のアイソフォームが知られている。我々は、これまでにPP2Cβ がRANKL/RANKシグナル伝達系を抑制し、破骨細胞分化を制御することを報告してきた。また、PP2Cαおよびβを活性化する天然低分子有機化合物として、植物のサワラより単離したpisiferdiolが、破骨細胞分化を阻害することを見出した。このたびglabridinがPP2Cαを特異的に活性化することを見出したため、その破骨細胞分化に与える影響を解析し、PP2Cαの生理機能について検討した。
【方法】プロテインホスファターゼの活性は、カゼインを基質としたマラカイトグリーン法または、ProFluor Ser/Thr Phosphatase Assayにより測定した。マウスマクロファージ・単球由来RAW264細胞またはマウス骨髄マクロファージは、可溶性破骨細胞分化因子(sRANKL)存在下でそれぞれ72時間または66時間培養後、酒石酸耐性ホスファターゼ陽性の多核巨細胞数を計測した。RANKL/RANKシグナル伝達系に対する化合物の効果は、ウエスタンブロット法により検討した。
【結果】約 170 種類の生薬または食品由来の低分子化合物から PP2C 活性化物質を探索した結果、カンゾウに多く含まれるイソフラボノイドの glabridin が、PP2Cαの活性を上昇させることを見出した。glabridin は、PP1 および PP2A の活性にはほとんど影響しなかった。また癌遺伝子産物として知られる PP2Cδの活性を阻害するが、PP2Cβおよびεの活性には影響を与えなかった。破骨細胞分化に対する glabridin の影響を調べたところ、15μM の glabridin は、破骨細胞分化を抑制することがわかった。そこで RANKL/RANK シグナル伝達系に対する glabridin の影響を検討した結果、glabridin は RANKL によって誘導される p38 および JNK の活性化と NFATc1 の発現を抑制したが、ERK の活性化には影響しなかった。また pisiferdiol と異なり、glabridin は IκB のリン酸化は抑制せず、NFκB の活性化には影響を与えないことがわかった。以上の結果から、破骨細胞分化において PP2Cαの作用は PP2Cβと異なる可能性が示唆された。

protein phosphatase, osteoclasts, RANKL

講演番号:2C29p06
講演日時、会場:3月23日14:44～ C校舎29会場

接着斑タンパク質ビンキュリンは脂質ラフトに局在する

Vinculin, a focal adhesion protein, is localized at lipid rafts

○長里 彩花[1], 山下 寛[1], 市川 尚文[1], 植田 和光[1,2], 木岡 紀幸[1] ([1]京都大院農・応用生命,[2]京大・iCeMS) ○Ayaka Nagasato[1], Hiroshi Yamashita[1], Takafumi Ichikawa[1], Kazumitsu Ueda[1,2], Noriyuki Kioka[1]([1]Div.of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ)

【目的】
脂質ラフトは、コレステロールやスフィンゴ糖脂質、PIP2(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)を多く含む膜領域で、シグナル伝達のプラットホームとして機能している。細胞と細胞外基質との接着部位である接着斑は、動物細胞の生存や増殖に必須の役割を担っており、最近脂質ラフトとの関連が示唆されつつある。例えば、接着斑の構成因子である細胞外マトリックス受容体インテグリンの活性化調節やエンドサイトーシスに脂質ラフトが関与していることや別の接着斑タンパク質ビンキュリンが*in vitro*でPIP_2と結合することが報告されている。また、ビンキュリン結合タンパク質であるビネキシンのファミリータンパク質が脂質ラフトで機能することも知られている。しかし、実際にこれら接着斑タンパク質が*in vivo*で脂質ラフトに局在し、機能しているかは未だ明らかになっていない。そこで本研究では、接着斑のタンパク質が脂質ラフトに局在するかを生化学的に解析した。
【方法・結果】
脂質ラフトは4℃で非イオン性界面活性剤に不溶性であることが知られている。よって、野生型マウス胎児繊維芽細胞(MEF)から細胞膜を単離し、それを4℃のTriton-X100で可溶化した後、OPTI-PREPの密度勾配遠心法により脂質ラフト画分を分離した。ウエスタンブロッティング法により、脂質ラフトに含まれる接着斑関連タンパク質を検出したところ、テーリンは脂質ラフト画分に検出できなかったが、ビンキュリンやパキシリン、ビネキシンは脂質ラフト画分に検出できた。次に、接着斑タンパク質の脂質ラフト分配におけるビネキシンの重要性について検討するため、ビネキシン遺伝子破壊MEFを用いたところ、パキシリンは脂質ラフトに検出できたが、ビンキュリンはほとんど検出できなかった。ビネキシンを再発現させた細胞では、パキシリンもビンキュリンも脂質ラフト画分に検出できた。この結果から、ビンキュリン、パキシリン、ビネキシンは脂質ラフトに存在しており、ビンキュリンの脂質ラフトへの局在にはビネキシンが必要であることが分かった。

Lipid raft, Focal adhesion, Vinculin

講演番号：2C29p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ C校舎29会場

PKCηによるケラチノサイト分化機構の解明

Molecular Mechanism of PKCη-induced keratinocyte differentiation

○白井康仁、盛岡祥子[1]、佐久間恵[1]、千田和広[2]、斎藤尚亮[1]（神戸大・農、[1]神戸大・バイオ研、[2]東京大・農）

○Yasuhito Shirai, Shoko Morioka[1], Megumi Sakuma[1], Kazuhiro Chida[2], Naoaki Saito[1], (Grad Sch Agricul Sci, [1]Biosignal Res Ctr, Kobe Univ,[2]Grad Sch Agricul & life Sci, Univ Tokyo)

【目的】表皮は我々を外的環境から守るバリアーである。ケラチノサイトは、その分化の過程で大きくその形態を変化させるとともに、多くの特徴的な蛋白質を発現することで、表皮を形成する。このケラチノサイトの分化においてプロテインキナーゼC(PKC)のサブタイプであるPKCηが重要な役割を果たしていることが知られていた。しかし、その詳細な分子メカニズムは不明であった。そこで、ケラチノサイト分化におけるPKCηの役割とその分子基盤を検討した。

【方法】アデノウイルスを用いてGFP、PKCη-GFP及びその変異体をケラチノサイトに発現させ、37℃、5% CO_2 条件下で適時培養後、細胞の形態を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。また、PKCη結合蛋白質の検索・同定は、GST-PKCηを吸着させたグルタチオンセファロースカラムにケラチノサイト摩砕上清を供与し、結合した蛋白質を質量分析により同定した。最終的に、得られた結合蛋白質とPKCηの結合を、pull down assay及び免疫沈降法により確認した。

【結果】PKCηによるケラチノサイトの扁平化には PKCηの酵素活性は必要ではないが、分化マーカーとなる蛋白質(ケラチン1、インボルクリン, トランスグルタミナーゼ１など)の発現には必要であった。また、アフィニテイー精製と質量分析により、PKCηの結合蛋白質として低分子量 G 蛋白質 RalA を同定した。RalA を siRNA を用いてノックダウンしたり、PKCηから RalA 結合部位を欠損させると、ケラチノサイト扁平化は阻害された。また、RalA は PKCηと結合することにより活性化されていた。以上のことから、PKCηは RalA の結合と活性化を介して、ケラチノサイトの分化に伴う形態変化を制御していることが明らかとなった。

Protein kinase C, keratinocyte, small GTPase

講演番号：2C29p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ C校舎29会場

腸間膜リンパ節のT細胞活性化機能に及ぼすストレスタンパク質の影響

Effects of heat shock proteins on the activation of mesenteric lymph node-derived T cells

○橋本　惠以[1]、星澤　奈央子[2]、桝田　哲哉[1, 3]、谷　史人[1, 3]
(京大院農・食品生物[1]、京大農・食品生物[2]、京大院・地球環境[3])
○Kei Hashimoto[1], Naoko Hoshizawa[2], Tetsuya Masuda[1,3], Fumito Tani[1,3]
([1]Grad. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Agric., Kyoto Univ., [3]Grad. GES, Kyoto Univ.)

【目的】ストレスタンパク質(Heat shock protein: HSP)は、進化的に広く生物に保存されているタンパク質である。近年、HSPを粘膜に免疫することにより、動脈硬化や関節炎等を改善できる可能性が示唆されてきた。我々は、微生物由来のHSPであるGroELが、腸間膜リンパ節(Mesenteric Lymph Nodes; MLNs)の naïve T細胞を制御性T細胞(regulatory T cells; Tregs)へと産生誘導することを見出したが、炎症誘発性のエフェクターT細胞(effector T cells; Teffs)に対するHSPの作用については不明な点が多い。そこで本研究では、MLNs由来のT細胞画分に対するHSP の作用について検討した。
【方法】マウスのMLNsから調製した細胞懸濁液、ナイロンウール法と磁気細胞分離法により精製した全T細胞画分、及び、磁気細胞分離法により精製したCD4$^+$ CD25$^-$ T細胞画分を、抗CD3/CD28抗体によるT細胞増殖刺激下で、HSP存在下あるいは非存在下において48時間培養した。HSPとしては、HSP60ファミリーであるマウスHsp60 (MO60)および大腸菌GroEL (EC60)を用いた。培養後、上清中に含まれるサイトカイン産生量をELISAにて測定し、細胞の表面抗原をフローサイトメーターにて解析した。また、ビオチン標識したHSPの存在下においてCD4$^+$ CD25$^-$ T細胞画分を抗CD3/CD28抗体で48時間刺激した後、細胞表面と相互作用しているビオチン標識HSPを、フローサイトメーターにて検出した。
【結果】MLNs細胞懸濁液を抗CD3/CD28抗体で刺激したとき、T細胞からIL-2が産生されるが、このIL-2産生量はHSP存在下において著しく減少した。次に、抗原提示細胞を除去した全T細胞画分及びCD4$^+$ CD25$^-$ T細胞画分を刺激して産生されるIL-2量を調べたところ、HSP存在下において同様に低下した。また、IL-2産生量と相関して、HSP存在下では、培養後の細胞表面におけるCD25の発現が抑制されていた。これらの結果は、HSPによるT細胞活性化抑制作用において，抗原提示細胞あるいはCD4$^+$ CD25$^+$ Tregsは関与しないことを示唆している。さらに、48時間の培養中におけるCD4$^+$ CD25$^-$ T細胞画分とHSPとの相互作用を調べたところ、MO60及びEC60ともにCD4$^+$ CD25$^-$ T細胞との結合が確認されたことから、HSPがT細胞に直接的に作用している可能性が示唆された。

heat shock protein, T cell, mesenteric lymph node

講演番号：2C29p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ C校舎29会場

TIPE2はTAK1のリン酸化を抑制することでTLRシグナルを負に制御する

TIPE2 acts as a negative regulator of TLR signal via inhibition of TAK1 phosphorylation.

○ 大穂満隆、櫻井渉、中山隆太郎、小島裕久、舛廣善和、花澤重正（日大・生物資源・応生科）
○Michitaka Oho, Wataru Sakurai, Ryutaro Nakayama, Hirohisa Kojima ,Yoshikazu Masuhiro, Sigemasa Hanazawa (Dept. of Applied Biological Sciences, Coll. Bioresources, Nihon Univ.)

【目的】2008年にTumor necrosis factor-α-induced protein-8 like2(TIPE2)は自然免疫だけでなく獲得免疫をも抑制する分子として同定された。すなわち、TIPE2ノックアウトマウスを用いた実験において、TLRやT cell receptor(TCR)リガンド処理により、野生型マウスに比べ過剰なサイトカイン産生やシグナル分子の過度のリン酸化が認められた。さらに、TIPE2はCaspase-8と結合しアポトーシスを正に制御することが示されているが、本研究において、私達はTLR及びTCR下流の主要なシグナル分子との相互作用について検討したところ、TIPE2の新規相互作用因子としてTAK1 (TGF-β-activated kinase 1)を確認した。そこで、今回、LPS刺激依存的なTAK1のリン酸化に対するTIPE2の制御機構について検討した。
【方法】まず、Raw264.7細胞にFlag-TAK1をTransfectionしG418で選択培養を行うことでFlag-TAK1 stable Raw264.7 cell lineを樹立した。作製した細胞株に、TIPE2をTransfectionし、24h後に無血清培地に置換した。さらに24h後、LPS刺激し、Flag-抗体レジンを用いて免疫沈降し、Western blotによりTAK1のリン酸化および下流のp38、ＩκBのリン酸化を検出した。
【結果】TIPE2はLPS刺激依存的なTAK1のリン酸化を抑制した。また、下流のp38,ＩκBのリン酸化に対しても同様の結果が得られた。以上の結果より、TIPE2はTAK1のリン酸化を抑制する事によってTLRシグナルを負に制御していることが判明した。今後は、LPS刺激依存的なTIPE2によるTAK1のユビキチン化修飾阻害、Caspase8との関連性を含め、シグナル分子の複合体の形成などを明らかにし、TIPE２によるTLRシグナル制御機構を解明すると共にTCRシグナルについても同様に検討したい。

TIPE2, TAK1, TLR

講演番号：2C29p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ C校舎29会場

TLRシグナルに対するデオキシニバレノールの阻害メカニズムの解明

Mechanism of inhibition of TLR signaling by deoxynivalenol

○木下麻緒[1,2]、小西良子[1]、薬袋裕二[2]、杉山圭一[1]（[1]国立衛研・衛微、[2]玉川大院農・資源生物）

○Mawo Kinoshita[1,2], Yoshiko Sugita-Konishi[1], Yuji Minai[2], Kei-ichi Sugiyama[1]（[1]Div. of Microbiol., NIHS, [2]Grad. School of Agri., Tamagawa Univ.）

【目的】*Fusarium*属真菌が二次代謝産物として産生するトリコテセン系カビ毒の一種であるDeoxynivalenol (DON)は、免疫毒性を示すことが知られているが、その毒性メカニズムは解明されていない点が多い。我々はこれまでにDONがToll-like receptor 4 (TLR4)シグナルにおよぼす影響としてLipopolisaccharide (LPS)誘導性inducible Nitric Oxide Synthaseレポーター遺伝子の活性の抑制およびMyD88依存経路におけるNF-κB依存性レポーター活性の阻害を見出している。本研究では、マウスマクロファージ様細胞RAW264を用いてTLRシグナルのアダプター分子であるMyD88および同経路の下流に位置するシグナル伝達因子であるIRAK-1に対するDONの影響について検討した。また、ヒトへの影響についてヒト単球由来細胞THP-1を用いてLPS誘導性NF-κBの活性化に対するDONの影響について検討した。

【方法】RAW264細胞をLPS存在下でDONによりそれぞれ30分、6時間処理を行い、LPS誘導性IRAK-1のリン酸化およびMyD88の発現量におよぼすDONの影響をWestern blotting法により検討した。一方、THP-1細胞をphorbol myristate acetateおよび1, 25-dihydroxy-vitamin D_3存在下で培養しマクロファージ様細胞に分化させた後、LPS存在下でDONにより6時間処理を行い、LPS誘導性NF-κBの活性化におよぼすDONの影響をNF-κB依存性レポーター活性により評価した。

【結果】LPS存在下でDON処理を行ったRAW264細胞では、DONの濃度依存的にLPS誘導性IRAK-1のリン酸化が抑制された。また、MyD88の発現量はDONの濃度依存的に減少することが明らかとなった。THP-1においてもLPS誘導性NF-κB依存性レポーター活性の活性化がDONの濃度依存的に阻害されることが確認された。以上の結果より、TLRのアダプター分子であるMyD88の発現量の減少がDONによるTLRシグナル阻害作用のメカニズムの一序であることが強く示唆された。さらに、ヒトにおいてもTLRシグナルはDONにより阻害される可能性が推測された。

Keyword1 Toll-like receptor, Keyword2 Deoxynivalenol, Keyword3 Lipopolisaccharide

講演番号：2C29p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ C校舎29会場

マスト細胞のIL-4産生がNotchシグナルによって増強されるメカニズムの解析

Mechanisms by which Notch signaling enhances IL-4 production by mast cells

○中野 信浩、西山 千春、小川 秀興、奥村 康（順天堂大・医・アトピー疾患研究センター）
○ Nobuhiro Nakano, Chiharu Nishiyama, Hideoki Ogawa, Ko Okumura (Juntendo University School of Medicine)

【目的】Notchは様々な組織に発現している細胞膜貫通型の受容体であり、造血系細胞ではNotch受容体を介したシグナルが細胞増殖や分化などを制御していることが知られている。我々はこれまでに、マウスマスト細胞にNotch1とNotch2が恒常的に発現しており、Notchシグナルがマスト細胞の成熟を促し、またIgE受容体の架橋刺激により誘導されるサイトカイン産生を増強させることを明らかにしている。特に、IL-4産生がNotchシグナルにより顕著に増強されることから、本研究ではそのメカニズムの解析を行った。
【方法】マウスの骨髄細胞をIL-3とstem cell factor存在下で培養することで得られた骨髄由来培養マスト細胞を、Notchリガンド強制発現CHO細胞株と共培養させた後、IgE受容体の架橋刺激によって誘導されるサイトカイン産生について各種解析を行った。また、Notch細胞内ドメインのcDNAをレトロウイルスベクターを用いて導入し、恒常的にNotch1またはNotch2のシグナルが入った骨髄由来培養マスト細胞を作製し、サイトカイン産生の解析を行った。
【結果】NotchリガンドDelta-like (Dll) 1, Dll4, Jagged 2による刺激は、マスト細胞のIgE受容体架橋刺激に伴うIL-4, IL-6, IL-13産生を有意に増強させた。特に、コントロールマスト細胞でIL-4産生はほとんど検出されなかったのに対し、Notchリガンド存在下で培養したマスト細胞ではIL-4産生が顕著に増強されていた。また、Notch1またはNotch2細胞内ドメインcDNAを導入したマスト細胞では、どちらもIL-4産生が増強されたことから、Notch1およびNotch2を介したシグナルはともにIL-4産生の増強に働くと考えられた。次に、サイトカイン産生の増強がマスト細胞の成熟に伴う結果であるかどうかを検討するため、Notchシグナルに依存しない方法（IL-9とTGF-β存在下で培養）で成熟マスト細胞を作製し、サイトカイン産生を解析した。成熟マスト細胞のIL-6、IL-13産生量はコントロールマスト細胞に比べ有意に増加したが、IL-4の産生量はほとんど増加しなかった。成熟マスト細胞をNotchリガンド存在下で培養するとIL-4産生量の顕著な増加がみられたことから、IL-4の産生増強にはIL-6やIL-13とは一部異なるメカニズムが働いていると考えられた。そこで、*Il4*遺伝子領域周辺のエピジェネティックな変化を、クロマチン免疫沈降法により解析した。NotchリガンドDll1存在下で培養したマスト細胞では、*Il4*遺伝子領域のヒストンアセチル化がコントロールマスト細胞に比べ顕著に増加していた。しかし、*Il4*遺伝子に隣接する*Il13*遺伝子領域ではこの増加はみられなかった。
【結論】Notchシグナルはマスト細胞の*Il4*遺伝子領域のヒストンをアセチル化することで、IgE受容体架橋刺激により誘導されるIL-4産生を増強させると考えられる。

notch signaling, mast cell, IL-4

講演番号：2C29p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ C校舎29会場

J_2型プロスタグランジンによる血清成分依存的な炎症誘導機構の解析

J_2-type prostaglandins induce inflammatory responses in a serum-dependent manner

○柴田　貴広、森下　望美、山口　悟、河合　慶親、内田　浩二
（名大院生命農・応用分子生命科）
○Takahiro Shibata, Nozomi Morishita, Satoru Yamaguchi, Yoshichika Kawai, Koji Uchida
(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】アラキドン酸は、シクロオキシゲナーゼ (COX)の作用によりプロスタグランジンG_2 (PGG_2) を経てPGH_2へ変換され、さらにPGD合成酵素によりPGD_2へと変換される。このPGD_2は、血小板凝集や睡眠誘導などの様々な生理作用を有する重要なプロスタノイドであるが、さらに非酵素的な代謝を受け、シクロペンテノン構造を有するJ_2型プロスタグランジンが生成される。J_2型PGの中でも15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J_2 (15d-PGJ_2) は、核内受容体であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ (PPAR γ) のリガンドとして注目を集めている脂質メディエーターである。15d-PGJ_2は炎症後期において産生され、炎症抑制に作用する抗炎症性メディエーターと考えられているが、一方で細胞内酸化ストレスの亢進作用や、細胞死誘導作用などの炎症促進に関与しうる活性も有することが知られており、その二面性を理解する必要がある。そこで本研究では、マクロファージ細胞における15d-PGJ_2の炎症応答作用について、特に血清成分に注目して検討を行うこととした。
【方法・結果】マウスマクロファージ様細胞株であるRAW264.7細胞に対し、無血清培地もしくは10%FBSを含む培地中で15d-PGJ_2を4時間投与後、ウェスタンブロットによりCOX-2の発現を検討したところ、無血清条件下ではCOX-2発現は全く誘導されなかったのに対し、10%FBS存在下では15d-PGJ_2の濃度依存的にCOX-2発現を誘導することが明らかとなった。また、15d-PGJ_2の濃度が一定の場合、血清濃度に依存してCOX-2発現が誘導されることがわかった。これらの結果から、血清中に15d-PGJ_2を「炎症促進メディエーター」として作用させうる分子が存在すると仮定し、その成分の探索を試みたところ、血清の主要なタンパク質である血清アルブミンであることが判明した。無血清培地中にウシ血清アルブミン (BSA) とともに15d-PGJ_2を投与したところ、COX-2の発現増強が認められた。また、BSA以外にヒト血清アルブミン (HSA) およびマウス血清アルブミン (MSA) も、同様にCOX-2発現増強活性を有することが明らかとなった。さらに、マイクロアレイ解析の結果、15d-PGJ_2とMSAの共投与により、COX-2だけでなく多くの炎症関連遺伝子の発現上昇が明らかとなった。以上の結果から、抗炎症性メディエーターとして知られている15d-PGJ_2は、血清アルブミンの存在下では逆に炎症性遺伝子の発現を亢進することが明らかとなった。現在、その誘導機構に関して詳細な検討を行っている。

prostaglandin, cyclooxygenase, inflammation

講演番号：2C29p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ C校舎29会場

シアル酸認識レクチンによるマクロファージの機能調節

Regulation of macrophage function by sialic acid-recognizing lectin.

○西島謙一、庄司徹、財津芳紀、飯島信司（名大・工）
○Ken-ichi Nishijima, Toru Shoji, Yoshinori Zaitsu, Shinji Iijima (Nagoya Univ)

【目的】　細胞表面は糖鎖に覆われており、その末端は通常シアル酸と呼ばれる酸性糖である。シアル酸は細胞間・分子間相互作用に影響を与え、免疫応答調節にも関わっている。この調節はシアル酸の持つ負電荷による静電作用とともに、特異的なレクチンによってもなされている。

近年発見されたシグレックは主に免疫細胞表面に発現しているシアル酸含有糖鎖を認識するレクチンファミリーである。多くは細胞内ドメインにITIMと呼ばれる抑制性モチーフを有しており、これまでに免疫系の抑制に関わる例が報告されている。我々は、自然免疫応答を担うとともに獲得免疫系を誘導する重要な役割を持つマクロファージの活性調節機構に注目している。これまでにマクロファージ細胞株を用いて、シグレック-9,5がLPS等TLRリガンドにより誘導されるTNF-αなどの炎症性サイトカイン産生を抑制する一方、抗炎症性サイトカインIL-10の産生を促進することを見出している。本発表では、TLRにより誘導される他の炎症性応答である一酸化窒素（NO）産生と、マクロファージの貪食活性に及ぼす影響について解析した結果について報告する。

【方法】実験にはCMVプロモーターの制御下シグレック9を安定発現するマウスマクロファージ様細胞株RAW264を用いた。4 x 10^4の細胞をLPS 100 ng/mlで刺激し、回収した培養上清中のNO産生量をグリース試薬により亜硝酸量として測定した。貪食作用は蛍光ビーズの取り込みをセルソーターで解析した。

【結果】細胞をLPSで24時間刺激した後の培養上清中のNO産生量を測定した。コントロールRAW264細胞では有意にNOの産生が認められたのに対し、シグレック9発現細胞ではほとんど検出されなかった。このことから、シグレックはLPSにより誘導される炎症性応答を幅広く抑制する活性があることが示された。

次に貪食作用について検討した。30分の貪食アッセイにおいてシグレック-9発現RAW264はコントロール細胞に比べて2-3倍の高い貪食活性を示した。一方、FITC標識したトランスフェリンの取り込みは上昇していなかった。貪食活性の上昇はフォスファターゼ阻害剤Na_3VO_4により低下することが認められた。このことから、シグレックの細胞内ドメインに結合するフォスファターゼであるSHPの関与が推定された。貪食による異物取込はMHCに抗原を提示する最初のステップであることから、シグレックがマクロファージの機能を調節することで広く免疫系を調節している可能性が考えられた。現在メカニズムについて検討を進めている。

RAW264, sialic acid, lectin

講演番号：2C29p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ C校舎29会場

タイトル　終末糖化産物が脂肪細胞と尿細管上皮細胞に及ぼす影響について

Title　The influence of advanced glycation endproducts (AGEs) on adipocyte and tubular epithelial cells

○柳田 加奈子[1]、田部 敬太[2]、深山 ゆりえ[2]、沈 燕[1]、細野 崇[1]、有賀 豊彦[1]、関 泰一郎[1]（日大院・生資科・応生科[1]、日大・生資科・生命化[2]）

○Kanako Yanagida[1], Keita Tabe[2], Yurie Miyama[2], Yan Shen[1], Takashi Hosono[1], Toyohiko Ariga[1], Taiichiro Seki[1](Nihon University Graduate School[1], Nihon University[2])

【目的】糖尿病患者の生体内では、終末糖化産物(Advanced glycation endproducts：AGEs)の生成が促進することが明らかになっている。本研究では、AGEs が肥満によるインスリン抵抗性に関与していると考え、培養脂肪細胞(3T3-L1)を用いて AGEs がインスリン作用に及ぼす影響を明らかにしようとした。また、糖尿病合併症の一つである腎症と AGEs との関連についてもラット尿細管上皮細胞(NRK-52E)を用いて基礎的な検討を行った。【方法】グルコース（終濃度 500 mM）と BSA（終濃度 50 mg/ml）を 1 M リン酸カリウム緩衝液中で 120 日間 37 ℃でインキュベーション後、PBS に対して透析した。調製した AGEs について蛍光スペクトル測定、抗 CML 抗体との反応性などを確認した。成熟脂肪細胞に分化誘導した 3T3-L1 に AGEs を添加して 24 時間培養後、^{3}H 標識した 2-deoxy-glucose の細胞内への取り込みに及ぼす影響を検討した。また、分化誘導直後の 3T3-L1 に AGEs を添加して 2 週間培養し、Oil red O 染色によって脂質の蓄積に及ぼす影響を検討した。インスリンシグナル因子の発現に及ぼす影響はウェスタンブロッティングによって検討した。さらに、NRK-52E に AGEs を添加して 24 時間培養した培養上清のマクロファージに対する遊走活性を chemotaxis assay によって測定した。【結果】3T3-L1 脂肪細胞において AGEs は糖の取り込みを促進した。また、Oil red O 染色により脂質蓄積への影響を検討した結果、AGEs 添加によって脂質の蓄積は増加した。AGEs の糖取り込み促進メカニズムを明らかにする目的で、インスリンシグナル関連因子の発現について検討したところ、AKT のリン酸化は低濃度の AGEs により阻害され、高濃度の AGEs によっては促進する傾向を示した。一方、PKC のリン酸化は AGEs 濃度依存的に増加した。AKT と PKC の上流因子である IRS のリン酸化も AGEs 添加によって増加した。これらの結果から、AGEs は IRS のリン酸化を促進することで糖の取り込みを促進し、脂質の蓄積を増加させることが示唆された。AGEs を添加して培養した NRK-52E の conditioned medium はマクロファージの遊走を強力に促進した。また、AGEs は NRK-52E の MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)の発現を増加させた。これらの結果から、AGEs は脂肪細胞の分化を促進させること、インスリン増強作用を有することが示唆された。また、NRK-52E には、MCP-1 の発現を介してマクロファージを遊走させ、炎症を惹起する可能性が示唆された。

Keyword1　AGEs (advanced glycation endproducts), Keyword2 IRS , Keyword3 AKT

講演番号：2A30a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ A校舎30会場

シロイヌナズナにおけるアスコルビン酸再生系酵素群の分子特性および生理機能

Molecular properties and physiological functions of ascorbate recycling enzymes in *Arabidopsis* plants

○丸田隆典[1,2]、山田宏機[2]、野志昌弘[2]、田茂井政宏[2]、石川孝博[1]、重岡成[2]（[1]島根大・生資科・生命工、[2]近畿大・農・バイオ）

○Takanori Maruta[1,2], Hiroki Yamada[2], Masahiro Noshi[2], Masahiro Tamoi[2], Takahiro Ishikawa[1], Shigeru Shigeoka[2] ([1]. Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.[2]. Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

【目的】高等植物において、アスコルビン酸（AsA）は活性酸素種（ROS）消去を介して細胞内レドックス制御に重要であるだけではなく、ホルモン合成/応答、生長/発達、遺伝子発現の制御にも関与する。AsAの持つ生理作用は自身のレドックス状態の影響を大きく受けるため、酸化型AsA（モノデヒドロAsA、MDA；デヒドロAsA、DHA）の再生系が鍵となる。シロイヌナズナには局在性の異なるMDA還元酵素（MDAR1～5）およびDHA還元酵素（DHAR1～5）が存在するが、個々の生理機能の多くは明らかではない。そこで本研究では、AsA再生系酵素群の分子特性を包括的に解析するとともに、各々の生理機能の解明を試みた。

【結果・考察】各AsAリサイクル系酵素群を欠損株を用いた総DHARおよびMDAR活性測定により、少なくとも2週齢のシロイヌナズナではDHAR5およびMDAR4がそれぞれ総DHARおよびMDAR活性の大部分を占めることが明らかになった。各欠損株のストレス感受性を評価したところ、DHAR5の欠損株がパラコート（50 µM）処理または強光（1500 µmol/m^2/s）に高感受性を示した。GFP融合タンパク質を用いたイメージング解析により、DHAR5は葉緑体に局在することが明らかになった。強光下において、DHAR5の欠損はAsAの過酸化を促進したが、逆にグルタチオン（GSH）の過酸化を著しく抑制させた。このことから、DHAR5はAsAおよびGSHのレドックス制御に重要であることが示唆された。興味深いことに、野生株と比較して、*dhar5*株では強光による酸化損傷の増大が顕著であったにも関わらず、酸化的ストレス応答性遺伝子群の転写レベルは著しく抑制されていた。よって、DHAR5は葉緑体レドックス制御を介した光酸化的ストレス応答に必須であることが示された。さらに我々は、ペルオキシソーム型のMDAR4が強光に高感受性を示し、同じペルオキシソーム型のMDAR3とシードリングの発達段階において機能分化することを明らかにしたので合わせて報告する。

Ascorbate, Redox, Stress

講演番号：2A30a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ A校舎30会場

光および葉緑体シグナリングによるアスコルビン酸およびトコフェロール生合成系の制御機構
Regulation of ascorbate and tocopherol biosynthesis by light and plastid signaling

○田中裕之[1]、丸田隆典[2]、薮田行哲[3]、石川孝博[2]、田茂井政宏[1]、重岡 成[1]（[1]近畿大院・農・バイオ、[2]島根大・生資科・生命工、[3]鳥取大・農・生資環）
○Hiroyuki Tanaka[1], Takanori Maruta[2], Yukinori Yabuta[3], Takahiro Ishikawa[2], Masahiro Tamoi[1], Shigeru Shigeoka[1]（[1] Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ, [2] Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ, [3]Fac. Agr., Tottori Univ）

【目的】高等植物において、アスコルビン酸（AsA：ビタミンC）およびα-トコフェロール（Toc：ビタミンE）はそれぞれ主要な水溶性および脂溶性抗酸化物質である。これらの化合物はレドックス制御を介したストレス応答に必須であるだけではなく、ホルモン応答、成長・発達および遺伝子発現の制御にも関与している。したがって、両ビタミン生合成系の厳密かつ協調的な制御が重要であると考えられるが、その分子機構は未だ明らかではない。これまでに我々は、高等植物のAsA生合成系が光遮断や光合成電子伝達系阻害剤（DCMU）処理によって抑制されることを明らかにしてきた。さらに、Toc生合成系も光による制御を受けることから、両ビタミン生合成系の調節への光および葉緑体由来のシグナル伝達系（葉緑体シグナリング）の関与が示唆された。そこで本研究では、葉緑体シグナリングのマスターレギュレーターであるGENOME UNCOUPLED1（GUN1）の欠損株（*gun1-101*）を用いて両ビタミン生合成系の調節機構をより詳細に解析した。
【方法・結果】光照射下において、野生株および*gun1-101*株にDCMUあるいは葉緑体遺伝子発現の阻害剤であるリンコマイシン（LIN）を処理した。その結果、いずれの処理によっても野生株ではAsAおよびTocの生合成系遺伝子群の発現抑制および両ビタミンレベルの減少が認められた。一方、*gun1-101*株では両阻害剤処理による生合成系遺伝子群の発現抑制は部分的に回復しており、特にGDP-L-galactose phosphorylase（VTC2）およびTocopherol cyclase（TC）の回復は顕著であった。さらに、*gun1-101*株では両阻害剤処理によるAsAおよびTocレベルの減少も有意に緩和されていた。これらの事実は、両ビタミン生合成系がGUN1を介した葉緑体シグナリングによって制御されること、VTC2およびTCが両生合成系の律速酵素であることを示唆していた。興味深いことに、GUN1欠損は明暗における両レベルおよび生合成系遺伝子群の発現には影響しなかった。よって、GUN1を介した葉緑体シグナリングは、光応答とは独立してAsAおよびToc生合成系を調節することが示唆された。現在、GUN1を介した葉緑体シグナリングの生理学的重要性を明らかにするために、様々な環境条件におけるAsAおよびTocレベルおよび両生合成系遺伝子群の発現へのGUN1欠損の影響について解析している。

plastid signaling, ascorbic acid, tocopherol

講演番号：2A30a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ A校舎30会場

葉緑体H_2O_2シグナリングを介したストレス応答におけるフェルラ酸ヒドロキシラーゼの生理機能
Physiological function of ferulic acid 5-hydroxylase 1 in chloroplastic H_2O_2-mediated stress response

○中村茉樹[1]、松田峻[2]、野志昌弘[1]、丸田隆典[3]、田茂井政宏[1,2]、石川孝博[3]、重岡成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ、[2]近畿大院・農・バイオ、[3]島根大・生資科・生命工）
○Maki Nakamura[1], Shun Matsuda[2], Masahiro Noshi[1], Takanori Maruta[3], Masahiro Tamoi[1,2], Takahiro Ishikawa[3] Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]. Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ. [2]. Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ. [3]. Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.)

【目的】高等植物において、活性酸素種（ROS）はシグナリング因子としてストレス応答に重要である。興味深いことに、包括的なトランスクリプトミクス解析は細胞内コンパートメントに特異的な複数のH_2O_2シグナリングの存在を示唆している。これまでに我々は、葉緑体由来のH_2O_2シグナリングの生理機能を明らかにすることを目的として、チラコイド膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの誘導抑制系を構築してきた。さらに、本抑制系を用いたマイクロアレイ解析などにより、葉緑体由来のH_2O_2は生物的および非生物的ストレス応答の両方に関与することを示した。そこで本研究では、葉緑体由来のH_2O_2シグナリングを介したストレス応答の分子機構を明らかにするために、葉緑体由来のH_2O_2に応答する遺伝子群の探索と機能解析を試みた。
【結果・考察】H_2O_2シグナリングにおいて重要な遺伝子を探索するため、葉緑体由来のH_2O_2に応答する遺伝子群の破壊株ラインを整備し、それらの光酸化的ストレス感受性を評価した。その結果、光酸化的ストレス感受性および非感受性変異株（それぞれ*pss*および*psi*）が合計15株単離された。それらの原因遺伝子の多くは転写因子やタンパク質キナーゼをコードしており、H_2O_2シグナリングとの関連性が示唆された。その中で、*PSS8*はフェルラ酸ヒドロキシラーゼ（FAH1）をコードしていた。FAH1はフェニルアラニン代謝系の下流でリグニンなどの合成に関与する酵素であり、アントシアニンの合成には直接関与しないにも関わらず、*pss8*では光酸化的ストレス下でのアントシアニンの蓄積が顕著に抑制されていた。光酸化的ストレス下において、アントシアニン合成に関与する遺伝子群の発現が*pss8*において抑制されていたことから、FAH1の欠損により生じたフェニルアラニン代謝系異常に起因するフィードバック制御機構の存在が示唆された。また、FAH1は葉緑体由来のH_2O_2および強光によって誘導されたことから、葉緑体由来のH_2O_2によるFAH1の誘導は光酸化的ストレス下におけるアントシアニン合成の促進に必須であると考えられる。

stress, reactive oxygen species, anthocyanin

講演番号：2A30a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ A校舎30会場

葉緑体由来のH_2O_2シグナリングに関与する転写因子の機能解析

Functional analysis of transcription factors involved in chloroplastic H_2O_2-mediated signaling

○松田峻[1]、山崎彩香[2]、野志昌弘[2]、芦田奈々[3]、丸田隆典[3]、田茂井政宏[1,2]、吉村和也[4]、石川孝博[3]、重岡成[1,2]　([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]島根大・生資科・生命工、[4]中部大・応生・食栄)

○Shun Matsuda[1], Ayaka Yamasaki[2], Masahiro Noshi[2], Nana Ashida[3], Takanori Maruta[3], Masahiro Tamoi[1,2], Kazuya Yoshimura[4], Takahiro Ishikawa[3], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]. Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ. [2]. Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ. [3]. Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ. [4]. Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【目的】活性酸素種（ROS）がシグナリング因子としてストレス応答に重要であることは周知の事実となってきており、最近では細胞内コンパートメント特異的な複数のシグナリング経路の存在が示唆されてきた。これまでに我々は、チラコイド膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（tAPX）の誘導抑制系を用いた解析により、葉緑体由来のH_2O_2に応答する遺伝子群を同定し、ROSが生物的および非生物的ストレス応答の両方に関与することを明らかにしてきた。さらに、同定した遺伝子群の破壊株ラインより、光酸化的ストレス感受性変異株（*pss*）を複数単離した。それらの原因遺伝子群の中で、*PSS4*および*PSS7*は転写因子をコードしていたことから、葉緑体由来のH_2O_2シグナリングへの関与が示唆された。そこで本研究では、PSS4およびPSS7の機能解析により葉緑体由来のH_2O_2シグナリングの分子機構の解明を試みた。

【結果・考察】tAPX発現の誘導抑制系を用いた解析により、PSS4およびPSS7の発現は葉緑体由来のH_2O_2の増加に伴いそれぞれ誘導および抑制されることが明らかになった。また、強光照射またはパラコート処理による光酸化的ストレス条件下において、PSS4およびPSS7の発現はそれぞれ増加および減少した。興味深いことに、PSS7発現はサリチル酸（SA）およびエリシター処理によって抑制され、*pss7*はこれらの処理に対しても高感受性を示した。一方、PSS4はエリシター処理によって誘導されたが、SA処理には応答せず、*pss4*もまたエリシター処理にのみ高感受性を示した。これらの結果から、PSS4およびPSS7は葉緑体由来のH_2O_2の下流で酸化的ストレスおよび病原菌応答に関与し、PSS7の機能はSA依存的である可能性が示唆された。さらに、*pss7*を用いたマイクロアレイ解析により、PSS7はアブシジン酸やオーキシンなどの植物ホルモン応答にも関与することが示された。

reactive oxygen, transcription factor, hormone

講演番号：2A30a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ A校舎30会場

気孔閉口運動におけるカタラーゼの役割

Roles of catalases in stomatal closure

Jannat, Rayhanur、裏地美杉、諸藤美穂、Hossain, Mohammad A、Islam, Mohammad M、Bloom, Rachel E[1]、中村宜督、McClung, C.R[2]、Schroeder, JI[1]、○森泉[3]、村田芳行（岡山大・自、[1]カリフォルニア大サンディエゴ、[2]ダートマス大、[3]岡山大・植物研）

Rayhanur Jannat, Misugi Uraji, Miho Morofuji, Mohammad A Hossain, Hohammad M Islam, Rachel E. Bloom[1], Yoshimasa Nakamura, C. Robertson McClung[2], Julian I. Schroeder[1], ○Izumi C. Mori[3], Yoshiyuki Murata (Okayama Univ., [1]UCSD, [2]Dartmouth College, [3]Okayama Univ. IPSR)

【目的】ジャスモン酸メチル（MeJA）およびアブシジン酸（ABA）はいずれも気孔閉口を誘導する植物ホルモンである。孔辺細胞におけるこれらのホルモンの信号伝達経路に活性酸素種発生が関与していることが示されている。しかし，信号伝達に有効な化学種および細胞内局在は不明である。本研究ではカタラーゼ遺伝子を破壊したシロイヌナズナ変異体およびカタラーゼ阻害剤 3-aminotriazole (3AT)を用い，シグナル経路への細胞内過酸化水素の関与を調べた。

【方法】孔辺細胞で高発現するカタラーゼ*CAT3*のT-DNA挿入変異体および*CAT1 CAT3*二重欠失変異体を単離し、気孔開度を測定した。切取り葉を10 μM MeJAもしくは10 μM ABA溶液に２時間浮遊させ，気孔閉口を誘導した。また、野生型植物を20 mM 3ATで30分間前処理後、閉口を誘導した。孔辺細胞内過酸化水素蓄積はH_2DCFの蛍光強度より検出した。

【結果】*cat3-1*変異および*cat1 cat3*二重変異は気孔のABAおよびMeJAに対する感受性を昂進させた。一方，ABAおよびMeJA非存在下での気孔開度は*cat*変異の影響を受けなかった。3ATは*cat*欠損と同様の効果を示した。

*cat3-1*変異，*cat1 cat3*変異および3AT処理は，MeJAおよびABA非存在下でも過酸化水素蓄積量を増加させた。また，MeJAおよびABA処理は過酸化水素蓄積量をさらに増加させた。

【考察】カタラーゼ活性低下による孔辺細胞内過酸化水素蓄積量の構成的な増加は気孔閉口を誘導しなかったこと、および閉口刺激により過酸化水素蓄積量と気孔閉口がカタラーゼ活性低下により昂進したことから、孔辺細胞内過酸化水素蓄積には気孔閉口を誘導する形態と誘導しない形態があることが示唆された。また、カタラーゼが細胞内に局在し、過酸化水素を特異的な基質とすることから、細胞外で産生されたスーパーオキシドが、過酸化水素に変換され細胞内で気孔閉口に関与することが示唆された。

stomata, catalase, hydrogen peroxide

講演番号：2A30a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ A校舎30会場

イネのストレス応答とトレハロース代謝

Stress response and trehalose metabolism in rice

藪内 威志[1,2]、島　周平[1,2]、佐分利　亘[2]、松井 博和[2]、○今井亮三[1,2]（[1]農研機構・北農研、[2]北大院・農）

Takeshi Yabuuchi[1,2], Shuhei Shima[1,2], Wataru Saburi[2], Hirokazu Matsui[2], ○Ryozo Imai[1,2]（[1]HARC, NARO, [2]Hokkaido Univ.）

【目的】トレハロースはグルコースがα，α-1,1結合した二糖であり，天然二糖としてはショ糖についで存在量が多い．トレハロースは，細菌，真菌，無脊椎動物で普遍的に見出され，昆虫では血糖として利用される．また，乾燥，低温などのストレス時にストレス保護物質として細胞内に蓄積する．一方高等植物においては，トレハロース蓄積は微量であり，これらとは異なる機能を持つと考えられている．本研究は，植物におけるトレハロース代謝の機能を明らかにすることを目的とした．

【方法】発芽後７日のイネ植物体を用いて，低温、塩、乾燥処理を施した。イネ品種「ゆきひかり」を滅菌し，1週間水耕栽培を行った．その後、低温（12℃），塩（150 mM NaCl），乾燥ストレスを与え，経時的に根組織をサンプリングした．滅菌水を用いて可溶糖を抽出し，パルス電流検出器付高速イオンクロマトグラフィーを用いて細胞内糖含量を測定した．また，同様にサンプリングした根組織よりRNAを抽出し，逆転写反応を行い，リアルタイムPCRおよびRT-PCRを行った．光合成活性は光合成蒸散測定装置LI-6400（Li-Cor）用いて評価した．

【結果】イネ幼苗を低温，塩，乾燥ストレス処理し，根におけるトレハロース蓄積量の変化を調べた．処理後約1～2時間にトレハロースの蓄積が観察された．その後一旦減少に転じ，4-6時間後に再度増加した．興味深いことに，最初の蓄積はトレハロース生合成酵素，Trehalose-6-phosphate phosphatase （TPP）の主要遺伝子である*OsTPP1*, *OsTPP2*の発現パターンと強く相関し，２度目の上昇はその前駆体Tre-6Pの合成酵素，Trehalose-6-phosphate synthaseの主要遺伝子発現と相関した．従ってイネではストレス時にトレハロース生合成系が応答し，トレハロース量が細かく変動することが明らかとなった．次に，OsTPP1を過剰発現体の解析を行った．過剰発現体においては，野生型と比べ3-5倍のトレハロースが蓄積しており，同時にグルコースとフルクトースの蓄積も観察された．過剰発現体は葉身，穂首の伸長等形態上の異常を示したが，低温耐性は向上していた．マイクロアレイ解析を行ったところ，過剰発現体において高発現する遺伝子には特徴は見いだせなかったが，抑制される遺伝子には，光合成関連遺伝子が極めて多いことが分かった．　実際に，光合成活性を比較したところ，過剰発現体においてその低下が観察された．以上の結果より以下のとおり考察する．ストレス環境下におけるOsTPP1遺伝子の誘導はトレハロース蓄積と同時におそらくTre-6p量を減少させる．Tre-6Pが光合成活性を正に制御するとする報告があることから，低温下でTre-6P減少させ，光合成活性を低下させることで，生長と耐性獲得のバランスを適応させているのではないだろうか．

trehalose, cold stress, photosynthesis

講演番号：2A30a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ A校舎30会場

イネカリウム/ナトリウム輸送体HKTの耐塩性における機能

Involvement of HKT potassium/sodium transporters in salt tolerance in rice

○森田 重人、丹波 奈津美、古市 卓也[1]、且原 真木[1]、矢内 純太、増村 威宏、佐藤 茂、仲山 英樹[2]、新名 惇彦[3]（京府大生命環境、[1]岡山大植物研、[2]長崎大水産環境、[3]奈良先端大バイオ）

○Shigeto Morita, Natsumi Tamba, Takuya Furuichi[1], Maki Katsuhara[1], Junta Yanai, Takehiro Masumura, Shigeru Satoh, Hideki Nakayama[2], Atsuhiko Shinmyo[3] (Kyoto Pref. Univ., [1]IPSR, Okayama Univ., [2]Nagasaki Univ., [3]NAIST)

【目的】植物が塩ストレスに曝されると、高濃度のNa^+により必須栄養素であるK^+の取込みが阻害される。耐塩性植物においては細胞内のK^+/Na^+比が高く保たれていることから、K^+/Na^+恒常性の維持が耐塩性に重要であると示されている。K^+/Na^+輸送体であるHKT（High-affinity K^+ Transporter）はK^+の取込みやNa^+の取込み・排出に働き、植物の耐塩性に関与している。イネに存在する8種類のHKTのうち、OsHKT2;1はNa^+輸送体として機能し、その変異体であるOsHKT2;1S88G はK^+輸送体であることが酵母発現系の実験で示されている。また、耐塩性イネ品種‘ポッカリ’で見つかったOsHKT2;2はK^+- Na^+共輸送体であることがタバコBY-2細胞を用いた実験で示されている。本研究では、HKTによるK^+取込みと耐塩性の関連を解明することを目的として、これらの輸送体の機能解析を行った。

【方法】上記３種類のHKTをそれぞれユビキチンプロモーターの制御下で過剰発現する形質転換イネを作出した。水耕栽培で育成した過剰発現系統とベクターコントロール系統の芽生えを低K^+高Na^+条件で２週間生育させ、生長を調査した。また地上部のK^+含量、Na^+含量を測定し、K^+/Na^+比を求めた。また各系統の個体をポットで土耕栽培し、出穂前（播種後５週間）から種子が結実するまで長期間NaCl処理を行い、種子の収量と地上部乾燥重量を調査した。またアフリカツメガエル卵母細胞でOsHKT2;1とOsHKT2;1S88Gを発現させ、電気生理実験によりそれらのK^+/Na^+輸送能を調べた。

【結果】高Na^+条件（30-50 mM NaCl）で２週間水耕栽培を行った結果、HKT2;1S88G系統とHKT2;2系統においてコントロール系統に比べ、生育の促進が見られた。また高Na^+条件でHKT2;1S88G系統においてK^+含量が高かったことから、OsHKT2;1S88G がK^+輸送体として機能していることが示された。さらに各形質転換系統に出穂～登熟期にかけ長期間塩（50 mM NaCl）処理を行ったところ、コントロール系統に比べHKT2;1S88G系統で地上部乾燥重量と種子収量が多い傾向が見られた。また電気生理実験の結果、OsHKT2;1S88G がK^+輸送活性とNa^+輸送活性の両方を持つことが明らかとなった。以上の結果から、OsHKT2;1S88G が高Na条件でK^+取込みに機能し、耐塩性に寄与していることが示唆された。

HKT transporter, K^+ uptake, salt tolerance

講演番号：2A30a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ A校舎30会場

過冷却ストレス影響下でのタバコ培養細胞BY-2におけるPCDの検出

Evaluation of programmed cell death in BY-2 by supercooling stress

○生月　俊也[1]、鳴海　明[2]、飯田　泰広[1]（[1]神奈川工科大・応用バイオ、[2]神奈川工科大・工）
○Shunya Ikezuki, Akira Narumi,Yasuhiro Iida (Kanagawa Institute of Technology)

【目的】過冷却とは凝固点を下回る温度で冷却されても凝固しない状態を指す。対象物に電圧を加えることで水分子に振動を起こす事により結晶化を阻害し、氷核が起因する細胞の損傷を防ぐ事が可能であると広く期待されており、特に水分含量の高く、凍結による損傷の起こりやすい植物に於いては有用であるとされる。しかし、実際に過冷却状態が及ぼす細胞への影響や細胞内での応答、作用メカニズムについては報告されていない。当研究室ではタバコ培養細胞ブライトイエロー2号(BY-2)を継代培養しており、本研究では、過冷却状態に曝されたBY-2の細胞レベルでの応答を評価し、解析を行う事を目的とした。

【方法】BY-2の培養は、LS培地を用い、27 ℃、120 rpmで行った。実験で用いた細胞は、培養4日目のものを使用した。FEELTECHNOLOGY社の氷感NTP-17Aを使用し、-4℃で3,500Vの電圧をかけることで過冷却状態を維持し、継代培養4日目のBY-2に曝露した。BY-2の過冷却下における生育割合の検討を細胞染色試薬(FDA・PI)で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光観察し、計測を行った。PCDの評価は、細胞からDNAを抽出し、電気泳動を行なった際のDNAの断片化による評価と、TUNEL法を用い、蛍光観察にて検討した。PCDの抑制は、Ac-DEVD-CHOを細胞懸濁液に添加し、過冷却に曝露しTUNEL法を用いて評価した。

【結果】過冷却に曝露した細胞の生育割合を評価した結果、過冷却状態に曝露した細胞は時間が経過するごとに生育数が減少し、96 h培養後にはほぼ全ての細胞が死滅していることを確認した。以上の結果を基に、過冷却に曝した細胞を再度継代し、通常の状態にて培養を行った結果、生育割合の評価では生育していた時間の細胞でも増殖が確認出来なかった。そこでTUNEL法を用いて細胞に対し、蛍光標識を行った結果、細胞内にて緑色蛍光が確認された。また、細胞からDNAを抽出し、アガロース電気泳動を行なった結果、DNAの断片化が検出された為、この細胞は壊死ではなくプログラム細胞死(PCD)であることを確認した。過冷却に曝露した細胞の曝露時間における蛍光標識の割合の検討を行った結果、時間が経過する度に増加し、48 h曝露後では50%の細胞が蛍光している事を確認した。また、カスパーゼ3様プロテアーゼの特異的阻害剤であるAc-DEVD-CHOを細胞懸濁液に添加し、過冷却に曝露したところ、細胞の生存率は未添加の細胞と比較して約3倍に増加し、PCDの抑制が確認された。

Programmed cell death, BY-2, supercooling

講演番号：2A30a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ A校舎30会場

非生物的ストレス負荷によるヒユ科植物のタンパク質ニトロ化

Protein nitration in amaranthaceous plants under abiotic stress

○植木 達也、橋床 泰之、崎浜 靖子（北大院農）
○ Tatsuya Ueki, Yasuyuki Hashidoko, Yasuko Sakihama
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

【目的】活性窒素は活性酸素と同様に細胞内で生成され、DNAやタンパク質、脂質などの細胞構成成分を酸化またはニトロ化することにより、細胞機能障害の原因となる。活性窒素によるストレスは、活性酸素によって引き起こされる酸化ストレス（oxidative stress）に対して、ニトロ化ストレス（nitrosative stress）と呼ばれている。近年、アラビドプシスやタバコ、ソラマメなどの植物を温度、塩、病原菌感染などのストレスに曝した際に、ニトロ化タンパク質が増加することが報告され、ストレスと活性窒素の関係が注目されている[(1)]。我々はこれまでに、植物色素の一種であるベタレインが、in vitroで高い活性窒素消去能を持つことを見いだした[(2)]。ベタレインはヒユ科やサボテン科など限られた植物にのみ分布する含窒素色素で、植物細胞における生理的役割は分かっていない。また、ベタレインを含有する植物においてニトロ化タンパク質を検出した報告例はない。そこで本研究では、ベタレインの in vivo における活性窒素消去能の検討を目的とし、ヒユ科植物のホウレンソウとビートそれぞれの芽生えにストレスを負荷しタンパク質ニトロ化への影響を調べた。

【方法および結果】ホウレンソウ（*Spinacia oleracea*）、アカビート、ビート（*Beta vulgaris L.*）種子をバーミキュライトの入ったポットに6個ずつ播種し、明期16時間、暗期８時間、25℃で育成した。ストレス処理として、植物体内で活性窒素の一種である一酸化窒素（NO）へ変換されることが知られている亜硝酸ナトリウム[(3)]を用いた。ストレス処理区では、播種後10日目の芽生えポットに20mMの亜硝酸ナトリウム溶液30mlを3日間与え、その後、下胚軸部分のみを回収した。液体窒素で凍結後粉砕した下胚軸に50mMアスコルビン酸ナトリウムを含むリン酸緩衝液（pH 7.0）を加え、可溶性タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質はその30μgをSDS-PAGEで分離し、ニトロチロシン抗体を用いたウェスタンブロッティングによりニトロ化タンパクのバンドを検出した。ホウレンソウ、ビート共にcontrolとストレス処理区間で、外観、芽生え一本あたりの生重量に有意な差はなかった。しかし、亜硝酸塩処理したホウレンソウ、ビートともにコントロールと比較しニトロチロシン抗体陽性のシグナルが強くなるバンドが検出され、亜硝酸塩処理により、ニトロ化ストレスに曝されたことが示された。ニトロ化が進行したバンドのうち3種の植物に共通して存在し、シグナル強度変化が最も顕著だった80 kDa 付近のタンパク質について解析している。

(1) Arasimowicz-Jelonek *et al.* Phytochemistry 72 681-688 2011
(2) 大井ら、2011年日本農芸化学会大会講演要旨集 p,25 2A06p16
(3) Y. Sakihama *et al.* Plant Cell Physiol. 43 290-297 2002

Keyword1 reactive nitrogen species, Keyword2 nitrosative stress, Keyword3 betalain

講演番号：2A30a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ A校舎30会場

N末端アセチル化修飾による葉緑体ATP合成酵素εサブユニットの量的制御

○星安　紗希、 吉田　和生、 藤原　正幸、 深尾　陽一朗、 横田　明穂、 明石　欣也
(奈良先端大・バイオ)
○Saki Hoshiyasu, Kazuo Yoshida, Masayuki Fujiwara, Yoichiro Fukao, Akiho Yokota and Kinya Akashi
(Grad. Sch. Biosci., NAIST)

【目的】葉緑体チラコイド膜の光化学装置は、環境に応答してその構成因子の活性や蓄積量が巧妙に調節されていると考えられているが、この分子機構の詳細については未だに明らかにされていない。これまでに、強光乾燥ストレス耐性能が高い野生種スイカの葉において、葉緑体ATP合成酵素複合体の構成因子の一つであるεサブユニットの蓄積量が、他の光合成タンパク質複合体に先駆けてストレス下で減少することが見出されていた。さらにεサブユニットは、等電点の異なる2種の分子種として存在し、強光乾燥ストレス下において塩基性側εのみの蓄積量が減少することが判明していた。以上の結果より、εは生体内において翻訳後修飾を受けており、その翻訳後修飾がεの蓄積量の減少に関連している可能性が示唆されていた。そこで本研究では、この翻訳後修飾を同定するとともに、翻訳後修飾がεの蓄積に及ぼす影響について解明することで、ストレス下における葉緑体ATP合成酵素εサブユニットの量的制御メカニズムについて新規な知見を得ることを目的とした。
【方法】2分子種のεの分離精製においては、野生種スイカ葉から抽出したチラコイド膜画分を用い、EDTA処理によりCF_1複合体を単離し、逆相HPLCを用いてCF_1複合体を構成する各サブユニットの分離を行った。2分子種εの精製分離は2次元イムノブロット解析により確認した。精製したεの構造はMALDI-TOF MSおよびLC/MS/MSにより分析した。εの分解実験では、野生種スイカ葉から単離したCF_1にブタ由来のaminopeptidase Mを添加し、一定時間反応させた後に2分子種のεの残存量を2次元イムノブロット解析で定量した。
【結果】精製した2分子種εの分子質量をMALDI-TOF MSで測定した結果、塩基性側εの分子質量は遺伝子配列から予想された値とよく一致するのに対して、酸性側εの分子質量は予想値に比べて約42Da増大していた。次に，精製したεをトリプシン消化しMALDI-TOF MSに供したところ、塩基性側に比べ酸性側εのN末端のペプチドにおいて、42Daの増大が見られた。また、LC/MS/MSの結果，酸性側εにおいてのみ、N末端にアセチル基の存在が示された。これらの結果より、2分子種εの構造差をもたらす翻訳後修飾は、N末端に存在するアセチル基であると結論した。さらに、アセチル基修飾がεの量的制御に及ぼす影響を検証するために、プロテアーゼに対する2分子種εの感受性を比較した。その結果、アセチル化されたεよりも、アセチル化されていないεが有意に速く分解され、アセチル基修飾によりεはプロテアーゼ分解から保護されることが示された。この結果は、光合成タンパク質の量的制御に、N末端のアセチル基修飾が関与することを示す初めての例である。

Chloroplast ATP synthase, N-terminal acetylation, Drought

講演番号：2A30a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ A校舎30会場

植物オルガネラDNAの酸化損傷が環境ストレス耐性能に及ぼす影響

Effects of oxidative damage to organelle DNA on tolerance to environmental stresses in plants

○伊藤 大輔[1]、重山 佳太[2]、辻村 昌希[1]、石川 和也[2]、吉村 和也[3]、重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]中部大・応生・食栄）

○Daisuke Ito[1], Keita Shigeyama[2], Masaki Tujimura[1], Kazuya Ishikawa[2], Kazuya Yoshimura[3], Shigeru Shigeoka[1,2]（[1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ. [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ. [3]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.）

【目的】ヌクレオチドやDNAは活性酸素によって酸化されると、突然変異や損傷の原因となるため、生物は様々な防御/修復機構を有している。ヒトではMTH1（hMTH1）が核、細胞質およびミトコンドリアに局在し、ヌクレオチドプール中の(d)GTPや(d)ATPの酸化体、8-oxo-(d)GTPおよび2-OH-(d)ATPを加水分解することで、DNAの酸化損傷を防いでいる。一方、DNA中に過剰に蓄積した酸化グアニン（8-oxo-G）を除去修復する際に生じる一本鎖切断は、細胞死誘導のシグナルとなっているため、各オルガネラでのDNAの酸化損傷の程度は厳密に制御されている。植物は核およびミトコンドリアに加えて、葉緑体にも独自のゲノムDNAを有するが、8-oxo-(d)GTP分解酵素であるAtNUDX1は細胞質に存在するのみである。そこで本研究では、hMTH1を細胞質、ミトコンドリアおよび葉緑体で強制発現させた植物を用いて、各オルガネラでのDNA酸化損傷がストレス耐性能や細胞死誘導に及ぼす影響を検討した。

【方法】hMTH1を細胞質、ミトコンドリアおよび葉緑体で強制発現させた形質転換シロイヌナズナ（*cyt-*, *mit-*および *chl-hMTH1*）を作出し、得られた第三世代（T_3）を解析に用いた。細胞死およびH_2O_2レベルは、それぞれトリパンブルーおよびジアミノベンシジン（DAB）染色法により解析した。

【結果】表現型およびイオン漏出量の変化をコントロール株と比較した結果、*mit-*および *chl-MTH1* 株は、高温（44℃），低温（4℃），パラコート（0.1 μM）および塩（100 mM）ストレスに対する耐性能が向上していることが明らかになった。また、*mit-*および *chl-MTH1* 株では、ストレス下での細胞死の増加およびH_2O_2の蓄積がコントロール株よりも抑制されていた。一方、*cyt-MTH1* 株ではそれらに有意な変化は認められなかった。以上のことから、ミトコンドリアまたは葉緑体ゲノムの酸化損傷はストレス下での H_2O_2蓄積を介した細胞死誘導に関与していることが示唆された。現在、各オルガネラでのDNA酸化損傷による細胞死誘導の制御機構を明らかにするために、DNAの断片化およびポリ（ADP-リボシル）化活性を解析している。

MTH1, oxidative damage, 8-oxo-(d)GTP

講演番号：2A30a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ A校舎30会場

タイリングアレイ法によるシロイヌナズナ強光ストレス応答性ASF/SF2様SRタンパク質、atSR30による選択的スプライシング制御機構の解析

Analysis of regulatory mechanism of alternative splicing events by Arabidopsis ASF/SF2-like SR protein, atSR30, in response to high-light stress using a tiling array

○横山国大[1]、東川将大[2]、若葉 亮[2]、森 達也[3]、田部記章[3]、丸田隆典[4]、佐藤信雄[5]、高橋広夫[5,6]、重岡 成[3]、吉村和也[1,2]（[1]中部大院・応生、[2]中部大・応生・食栄、[3]近畿大・農・バイオ、[4]島根大・生資科・生命工 [5]中部大・植物バイオ、[6]中部大・応生・応化）

○Kunihiro Yokoyama[1], Shouta Higashikawa[2], Akira Wakaba[2], Tatuya Mori[3], Noriaki Tanabe[3], Takanori Maruta[4], Nobuo Sato[5], Hiro Takahashi[5,6], Shigeru Shigeoka[3], Kazuya Yoshimura[1,2]（[1]Biosci. Biotech. Grad. Sch. Chubu Univ., [2] Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., Chubu Univ.,[3]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [4]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [5]Plant Biol. Res. Center, Chubu Univ., [6]Dept. Biol. Chem., Coll. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ.）

【目的】転写後調節機構の１つである選択的スプライシングは、１つの遺伝子から特性の異なる複数のタンパク質の生成を可能にする合理的なシステムであり、真核生物のタンパク質機能の多様化に貢献している。興味深いことに、植物においてそれら選択的スプライシングを受ける遺伝子には多くの環境ストレス応答／耐性に関連するものが含まれる。我々は、シロイヌナズナのスプライシング制御因子、セリン-アルギニンリッチ（SR）タンパク質ファミリー（20種類）の発現パターンから、強光ストレス下での選択的スプライシング制御に機能すると考えられる2種類のSRタンパク質 atSR30とatSR45aを見出した。そして、atSR45aはイントロンリテンション型のスプライシング抑制因子として機能していることを明らかにした(Yoshimura et al. 2011, Plant Cell Physiol.)。一方、atSR30は動物の主要な選択的スプライシング制御因子、ASF/SF2のホモログであるが、その選択的スプライシング制御に果たす役割は不明である。そこで本研究では、atSR30によりスプライシング効率が制御される遺伝子群の同定を試みた。

【方法および結果】タイリングアレイ法を用いて強光ストレス(800 μE/m^2/s,1h)下におけるシロイヌナズナ野生株とKO-sr30の全トランスクリプトーム解析を行った。2回の解析データから、野生株と比較してKO-sr30株において発現レベルが有意に変化（$P<0.05$）した416ヶ所の遺伝子領域(371遺伝子)および70ヶ所の非遺伝子領域を抽出した。遺伝子領域にはゴルジ装置および生物的/非生物的ストレス応答に関与する遺伝子が、シロイヌナズナ全遺伝子中の存在比率と比較してそれぞれ2.7倍および2.5倍高い割合で含まれていた。半定量的RT-PCRによる解析の結果、強光下における選択的スプライシング効率もしくは転写レベルの変化をそれぞれ7個および12個の遺伝子で確認した。選択的スプライシング産物のシークエンス解析の結果、atSR30はイントロンリテンションタイプの選択的スプライシングのサプレッサーとして機能していると考えられた。

alternative splicing, SR protein, tiling array

講演番号：2A30a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ A校舎30会場

グルタチオンペルオキシダーゼ，AtGPX8によるレドックス制御を介したストレス応答/耐性の分子機構

Molecular mechanism of stress response/tolerance mediated redox regulation by Arabidopsis glutathione peroxidase 8, AtGPX8

○尾形知哉[1]、北島一樹[3]、中神莉彩[2]、吉村和也[2]、丸田隆典[3,4]、Ahmed Gaber[3]、田茂井政宏[1,3]、重岡成[1,3]（[1]近畿大院・農・バイオ、[2]中部大・応生・食栄、[3]近畿大・農・バイオ、[4]島根大・生資科・生命工）

○Tomoya Ogata[1], Kazuki Kitajima[3], Risa Nakagami[2], Kazuya Yoshimura[2], Takanori Maruta[3,4], Ahmed Gaber[3], Masahiro Tamoi[1,3], Shigeru Shigeoka[1,3] ([1]. Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ. [2]. Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ. [3]. Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ. [4]. Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.)

【目的】活性酸素種（ROS）は酸素毒としてだけでなく、シグナリング因子としてストレス応答にも重要であることから、ROSの量的バランスからなる細胞内レドックス状態は厳密に制御されなければならない。これまでに我々は、シロイヌナズナに8つ存在するグルタチオンペルオキシダーゼ（GPX1～8）の分子特性について解析してきた。また最近、植物GPXはタンパク質間相互作用を介してシグナル伝達系にも関与することが示唆されてきた。よって、植物GPXは抗酸化酵素およびシグナリング因子としても機能するバイファンクショナルなタンパク質であると考えられた。そこで、本研究では、AtGPX8の生理機能について分子遺伝学的な解析を試みた。

【結果・考察】2週齢のシロイヌナズナ野生株に強光照射あるいはパラコートを処理したところ、AtGPX8発現の増加が認められた。AtGPX8の欠損株および過剰発現株を作出し、それらの酸化的ストレス感受性を野生株と比較したところ、AtGPX8欠損株は酸化ストレスに対して高感受性を示したが、過剰発現株は耐性を示した。このことから、AtGPX8の発現レベルがストレス耐性能に重要な作用を与えることが明らかになった。GFPを用いたバイオイメージング解析により、AtGPX8は細胞質と核の両方に局在することが示された。また、AtGPX8欠損株および過剰発現株では野生株よりもパラコート処理下でのDNA酸化損傷が、各々促進及び抑制されていた。これらの事実から、AtGPX8は酸化ストレスからの核の酸化防御に重要であることが示唆された。さらに、yeast two-hybrid systemによりAtGPX8と相互作用するタンパク質を探索し、GIP1（GPX8-interacting protein1）を同定した。GIP1の欠損株はAtGPX8欠損株と同様に酸化ストレスに対して高感受性を示した。以上より、AtGPX8は抗酸化酵素としてだけではなく、GIP1との相互作用を介してシグナル伝達系にも関与することが示唆された。

stress, reactive oxygen species, glutathione peroxidase

講演番号：2A30a14
講演日時、会場：3月23日11:43～ A校舎30会場

シロイヌナズナ葉緑体型Nudix hydrolase（AtNUDX19）によるNADPH代謝を介した強光ストレス応答機構

Regulatory mechanism of high-light stress response through NADPH metabolism by a chloroplastic Nudix hydrolase, AtNUDX19

辻村昌希[1]、問田英里[2]、吉田幸史[2]、池本圭輔[2]、丸田隆典[3]、田茂井政宏[1, 2]、○吉村和也[4]、重岡成[1, 2]（[1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]島根大・生資科・生命工、[4]中部大・応生・食栄）

Masaki Tsujimura[1], Eri Toida[2], Tomofumi Yoshida[2], Keisuke Ikemoto[2], Takanori Maruta[3], Masahiro Tamoi[1, 2], ○Kazuya Yoshimura[4], Shigeru Shigeoka[1, 2]（[1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [4]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.）

【目的】高等植物において、ピリジンヌクレオチド［NAD(P)(H)］は光合成、呼吸および抗酸化系などの主要代謝の補因子として必須であるだけでなく、細胞内レドックス状態に多大な影響を及ぼす。従って、細胞内におけるそのレベルおよびレドックス状態はオルガネラレベルで厳密に制御されなければならない。これまでに我々は、シロイヌナズナNudix hydrolase（AtNUDX1-27, AtDCP2）の中で、AtNUDX19が葉緑体に局在し、NADPH加水分解活性を有すること、本遺伝子は強光に対して発現応答性を示すこと、およびその遺伝子欠損はNADPHレベルを増加させ、強光ストレス耐性能を高めることを明らかにしてきた。そこで本研究では、AtNUDX19欠損が抗酸化系、光合成および遺伝子発現に及ぼす影響について解析した。
【方法・結果】強光下において、T-DNA挿入によるAtNUDX19遺伝子発現抑制株（KD-*nudx19*）および破壊株（KO-*nudx19*）では種々の抗酸化酵素活性および抗酸化剤レベルが増加していた。また、KD-およびKO-nudx19株では強光下でのカルビン回路の酵素群のイニシャル活性、炭酸同化能および光合成電子伝達速度が増加していた。さらに、マイクロアレイ解析を行ったところ、通常光および強光下のKO-nudx19株においてホルモン応答に関与する遺伝子群の発現増加または抑制が認められた。定量的RT-PCRによる検証の結果、KO-nudx19株ではサリチル酸（SA）合成に関与する酵素遺伝子やSA応答性遺伝子群の発現が増加していた。また、KO-nudx19株においてSAの高蓄積が認められた。さらに、KO-nudx19株は野生株と比較してSA高感受性を示した。野生株にSA処理したところ、AtNUDX19の転写、タンパク質および活性レベルの増加が認められた。以上より、AtNUDX19はSAシグナリングのネガティブレギュレーターとして機能すること、およびSAシグナリングと強光ストレス応答の関連が示唆された。

Nudix hydrolase, NADPH, stress response

講演番号：2A30a15
講演日時、会場：3月23日11:54～ A校舎30会場

シロイヌナズナにおけるストレス応答性遺伝子を用いた植物ホルモンバランスの解析

Relationship between plant hormone balances and stress related gene expression in Arabidopsis

○有野 梓[1]、永田 真紀[1,2]、仲下 英雄[1,2]([1]東農大,[2]理研)
○Azusa Arino[1], Maki Nagata[1,2],Hideo Nakashita[1,2]([1]Tokyo University of Agriculture, [2]RIKEN)

【目的】
植物の様々な生理機能の発揮、制御には植物ホルモンが関与することが知られている。また、植物の自己防御機構においても、植物ホルモンは重要な働きをしていることが明らかになりつつある。そのなかで、病害応答に働くサリチル酸、病傷害応答に働くジャスモン酸、環境ストレス応答に働くアブシジン酸は相互に拮抗的な関係にあり、ストレスに対する応答が三つ巴の関係で制御されることが明らかになってきた。環境ストレスや病害ストレスのような刺激に対して、細胞・組織レベルで各植物ホルモン濃度が調節され、その結果として生じる植物ホルモンシグナルのバランスの変動により様々な生理作用が発揮されることが考えられる。植物ホルモンシグナルのバランスを遺伝子発現を指標として解析するために、植物ホルモン濃度を評価可能な遺伝子の探索を行った。さらに、ストレス応答に対する３つの植物ホルモンシグナルのバランスを明らかにするために、探索した植物ホルモン応答性遺伝子と病傷害応答性遺伝子との関係について解析した。
【方法】
植物ホルモンシグナルのバランスを評価するために、サリチル酸、ジャスモン酸、アブシジン酸を処理したシロイヌナズナの葉組織で各植物ホルモン特異的に発現する遺伝子をリアルタイムPCRにより選抜した。これらを用いて、植物ホルモン濃度の変動と病傷害応答性遺伝子であるPR-１遺伝子やVSP２遺伝子の発現レベルの関係について解析した。
【結果】
内生植物ホルモン濃度を評価可能な植物ホルモン応答性遺伝子を５つ選抜できた。選抜した遺伝子を用いた発現解析の結果、ストレス応答時の生理作用発現には、１つの植物ホルモンレベルの増減だけではなく、内生植物ホルモンシグナルのバランスの変化が重要であることが示唆された。さらに、植物組織中での植物ホルモンバランスの変動を非破壊的に解析するために、選抜した植物ホルモン応答性遺伝子のプロモーター領域に蛍光タンパク質をつないだコンストラクトを作製してアグロバクテリウムに導入し、形質転換シロイヌナズナの作出を進めている。

plant hormone

講演番号：2A30p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ A校舎30会場

イソチオシアネートによる植物高温耐性向上効果

Effects of isothiocyanates on heat-tolerance in plants

○原崎 安紀乃、田端 杏子、原 正和（静岡大農・応生化）
○Akino Harazaki, Kyoko Tabata, Masakazu Hara (Shizuoka Univ)

【はじめに】イソチオシアネート（辛子油、以下ITC）は、主にアブラナ科植物が機械的傷害を受けた時に発生する二次代謝産物である。植物組織には、ITCの前駆体であるグルコシノレートと、その加水分解酵素であるミロシナーゼが、異なる場所に存在しているが、傷害によって互いに混ざり合い、酵素反応が起きてITCを生じる。ITCは、小動物忌避効果や、抗菌作用を示す。そのため、植物の防御物質であると考えられてきた。しかし、ITCの発生量が、活性を示すのに十分な閾値に達しない植物種が多いこと、グルコシノレート含量が著しく低下したシロイヌナズナ変異株は、なおも、十分な病原菌耐性を有することが明らかになってきた。従って、ITCには、外敵の撃退以外の役割が存在する可能性が示唆される。

以前、われわれは、シロイヌナズナにITCを投与した際、植物体内のグルタチオンと速やかに結合することを報告した。その結果、植物体内のグルタチオン含量は一過的に減少するが、その後回復し、以前よりも高い含量に達することを示した。さらに、過酸化水素の発生が増加することも見出した。このように、ITCは、植物に対して防御反応を誘発すると考えられる。しかし、結果として、植物が何らかのストレスに対して耐性を増すか否かは、不明であった。本発表では、非生物学的ストレスのうち、高温ストレスに対する耐性の向上について報告する。

【方法】ピートバンで栽培した3週齢のシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）に、0、2、5 mMのITC（PEITC、AITC、MITC）を水溶性エマルジョンとして一定量噴霧した。ITC処理後2日目に、シロイヌナズナを高温処理し（55度・1時間など）、栽培を続行して、ロゼット期（4週齢）と開花期（6週齢）に植物体の地上部の重量を測定し、熱耐性向上効果を評価した。別に、アルファルファやホウレンソウも、同様の試験に供した。

【結果と考察】PEITCを投与したシロイヌナズナは、高温処理（55度・1時間）によるダメージが少なく、その後の栽培で、植物体重量は増加した（特に1、2 mM PEITC投与区で顕著）。また、ロゼット期（4週齢）より開花期（6週齢）のほうが、重量の増加が高かった。こうしたシロイヌナズナの耐熱性向上効果は、AITC、MITCでも確認された。また、高温条件を37度・10日間とした場合でも、耐熱性の向上が見られた。アルファルファやホウレンソウにおいても、PEITCによる高温耐性向上効果は確認された。以上の結果、ITCは、植物の高温耐性を向上させることが判明した。ITCは、植物のストレス耐性を向上させるシグナルとして機能する可能性が示唆される。

isothiocyanate, heat stress, *Arabidopsis*

講演番号:2A30p03
講演日時、会場:3月23日14:11～ A校舎30会場

塩・乾燥ストレスに応答するミヤコグサARM-repeat Protein遺伝子の特徴付け

Molecular characterization of an ARM-repeat protein gene differentially induced by high-salt and drought stress from the model plant *Lotus japonicus*

○野口 和斗、斎藤 祐一、梅崎 修平、高原 英成、小島 俊雄（茨城大・農・生化）
○Kazuto Noguchi, Yuichi Saito, Shuhei Umezaki, Hidenari Takahara, Toshio Kojima (Biochem. Mol. Biol., Agri., Ibaraki Univ.)

【目的】 アルマジロリピート（ARM）はタンパク質間相互作用に関与する機能ドメインであり、特に細胞骨格制御や細胞内シグナル伝達に関わるタンパク質に多く見られる。植物では、植物ホルモンを介したシグナル伝達や自家不和合性に関わるタンパク質などで見つかっており、植物特有の生命現象にも関与することが知られている。当研究室では、ダイズから単離した機能未知ARMタンパク質をコードする *GmTDF-5* の解析を進めている。これまでの研究で、同遺伝子の過剰発現がシロイヌナズナの耐塩性を向上させることが明らかとなり、GmTDF-5がダイズの塩ストレス応答・耐性機構に関与するARMタンパク質であると推測している。本研究では、マメ科のモデル植物ミヤコグサを用いた機能解析を展開するため、ミヤコグサから *GmTDF-5* ホモログをクローニングし、遺伝子構造やストレス応答性を特徴付けることにした。
【方法と結果】 ミヤコグサホモログ *LjTDF-5* は、全長369アミノ酸残基からなる、推定分子量40.7 kDa、GmTDF-5に対して相同性67.6%のARMタンパク質をコードしていた。Phytozomeに登録された18種類の植物に由来するホモログを対象に、タンパク質構造の保存性を調査したところ、双子葉・単子葉植物のホモログを含めてARMドメインが形成されないC末端領域（約60アミノ酸残基）が高度に保存されていることが明らかとなった。同領域には既知の機能ドメインが存在せず、LjTDF-5を含む一群のホモログを特徴付ける新規な機能領域である可能性が示唆された。一方、*GmTDF-5* で誘導が確認された塩、乾燥およびアブシジン酸（ABA）処理に対する *LjTDF-5* のストレス応答性を調査した。realtime RT-PCRによる解析の結果、塩・乾燥ストレスについて処理後24時間以降のミヤコグサ地上部で強い誘導が見られた。一方で、ABAに対しては処理後72時間まで地上部、根ともに誘導が見られなかった。また、根において塩ストレス処理後6時間で著しい誘導が見られ、同組織での応答が見られなかった *GmTDF-5* と異なる応答性を示した。一次構造レベルでは、LjTDF-5に相同性を示す機能既知タンパク質は見つからなかったが、ホモロジーモデリングによって予測された立体構造が核-細胞質間輸送に関与するARMタンパク質importin αと類似していたことから、同様の分子機能を持つ可能性が示唆された。現在、細胞内局在解析と *LjTDF-5* を過剰発現する形質転換体の作出を進めており、これらの結果も含めて発表する予定である。

armadillo-repeat, *Lotus japonicus* , salt stress

講演番号：2A30p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ A校舎30会場

イネのジャスモン酸応答性MYB遺伝子JAmybの非生物的ストレス応答への関与

Role of the jasmonate-inducible rice MYB gene JAmyb in abiotic stress response

横谷 尚起、市川 尚斉[1]、近藤 陽一[1]、岩渕 雅樹、松井 南[1]、廣近 洋彦[2]、○小田 賢司（岡山生物研、[1]理研PSC、[2]生物資源研）

Naoki Yokotani, Takanari Ichikawa[1], Youichi Kondou[1], Masaki Iwabuchi, Minami Matsui[1], Hirohiko Hirochika[2], ○Kenji Oda (RIBS Okayama, [1]RIKEN PSC, [2]NIAS)

【目的】自ら移動できない植物は、環境変化に対して柔軟に対応する機構を発達させてきた。我々は、植物のストレス応答制御に関わる遺伝子を明らかにする目的で、2万以上のイネ完全長cDNAを発現するシロイヌナズナ（イネFOXシロイヌナズナ）を高濃度の塩を含む寒天培地上に無菌播種し、発芽率や子葉の色を指標に塩耐性の向上した変異体を208ライン単離した。本研究では、選抜された変異体の一つであるR06114に着目し、塩耐性向上の原因遺伝子の同定と機能解析を試みた。

【方法および結果】R06114ゲノムDNAを鋳型にPCRを試みたところ、R2R3型のMYB転写因子JAmybが増幅された。JAmyb遺伝子と塩ストレス耐性の関係を調べるため、野生型シロイヌナズナにJAmyb遺伝子を導入し、高濃度の塩を含む寒天培地上に播種したところ、R06114同様、塩ストレス耐性の向上が確認された。この結果は、JAmybの高発現が塩ストレス耐性の原因遺伝子であることを示している。R06114の塩ストレス耐性向上が発芽時に限定された現象かどうかを明らかにするため、通常の寒天培地上で4日間生育させた幼苗を塩を含む寒天培地に移植し、根の伸長阻害の程度を比較した。その結果、R06114は根の伸長においても塩ストレスに耐性を示すことが分かった。また、マイクロアレイを用いてR06114の遺伝子発現プロファイルを調べたところ、ストレス応答性遺伝子や転写因子が誘導されていることが分かった。さらに、イネ幼苗を用いてJAmyb遺伝子の非生物的ストレス応答性を調べたところ、塩ストレスにより強く誘導され、高浸透圧ストレスや活性酸素によっても誘導が認められた。これまで、JAmybは病害ストレス応答に関与する転写因子として同定されており、ジャスモン酸により誘導されることからジャスモン酸を介した病害応答に機能すると考えられてきた。植物ホルモン応答性を調べたところ、我々の実験条件下でも同様にジャスモン酸に応答性を示し、アブシジン酸には応答しなかった。我々の結果はJAmybがジャスモン酸を介した非生物的ストレス応答に機能することを示唆しており、JAmybは病害応答と非生物的応答のクロストークに関わる可能性がある。

abiotic stress, rice FOX Arabidopsis, MYB transcription factor

講演番号：2A30p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ A校舎30会場

カンバ・リター抽出物のフィンランド森林限界線付近にあるカンバ林・林床土壌微生物の窒素固定に対する寄与

Contribution of leaf litter extracts to nitrogen fixation of birch forest bed soil along forest limit in subarctic Finland

○礒田玲華，原新太郎，Tahvanainen Teemu[1]，橋床泰之（北大院農・応生科，[1]UEF）
○Reika Isoda, Shintaro Hara, Teemu Tahvanainen[1], Yasuyuki Hashidoko (Hokkaido Univ., [1]UEF)

【目的】高緯度帯の森林限界では、わずかな気候変動でも植生が多大な影響を受けやすいため、近年の温暖化によって森林限界のドラスティックな北上が予想されている。しかしながら、森林限界線における森林成立制限要因には不明なものが多い。環境変化に伴う森林限界線付近の植生の変動によって、土壌中の窒素固定細菌の菌叢や活動そのものが変化することも予想することができる。本研究では現地で採取したカンバ・リター抽出物を添加した培地をアセチレン還元試験に用い、植生の段階的遷移が窒素固定細菌の活動にどのような影響を及ぼすかを検討した。
【方法】フィンランド森林限界付近のカンバ林（Kilpisjavis N69°05’,E20°45’）において、*Betula nana*および*B. pubescens*直下の林床土壌O層、E層、およびB層をそれぞれ採取した。また付近の*B. nana*および*B. pubescens*の黄化葉あるいは落葉を集め、これらをリターとしてリターMeOH抽出物を得た。抽出物は最終的に分画に供し、液液分配によってそれぞれ水層、EtOAc層、BuOH層を得た。培地は、炭素源としてフルクトース、グルコース、スクロース、マンニトール、コハク酸、リンゴ酸が2:2:2:2:1:1のモル比で含まれたWinogradsky’s 無機塩無窒素培地（ジェランガム0.3%含有）を基本培地とし、ガスクロバイアルに分注した培地10 mLに各水層を添加し湿重量300 mgの土壌を接種した。この基本培地においては、検証した採取土壌のうち*B. nana*直下のO層に100 nmol h^{-1} $vial^{-1}$の高いアセチレン還元が認められているため、これのリター抽出物無添加区を対照区とした。リター抽出物は各100 mg L^{-1}培地濃度となるように添加した。各バイアルは7日間前培養し、気相10%相当のアセチレンガスを封入後、培養3日目のアセチレン還元量を測定した。また、真正細菌叢の解析を行う場合は、培養後の培地あるいは土壌から直接DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を標的としたDGGE解析を行った。
【結果】終濃度 100 mg L^{-1} の水層を添加した培地に O 層の土壌を接種・培養した結果、*B. pubescens* 直下の O 層においては、*B. nana* および *B. pubescens* のリター抽出物添加区でのアセチレン還元量が上昇した。一方、*B. nana* 直下の O 層においてはどちらのリター抽出物を与えた場合でもアセチレン還元は抑制された。現在、これら両培地中の微生物について菌叢解析を進めており、平行してリター抽出物の他に炭素源を含まない培地での試験も検討中である。抽出物の最適濃度ならびにアセチレン還元の亢進または抑制に最も影響を及ぼしている化学物質の追跡についても報告を予定している。

subarctic forest limit, birch litter extracts, acetylene reduction assay

講演番号：2A30p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ A校舎30会場

ナミハダニ内部共生細菌は被食害植物の防御応答反応を調節する

Microorganism in herbivorous two spotted spider mites (*Tetranychus urticae*) regulate ecological interactions with lima bean plant

○植田 浩一、小澤 理香[1]、Massimo Maffei[2]、後藤 哲雄[3]、高林 純示[1]、松田 一彦（近畿大・農、[1]京大・生態研、[2]Turin Univ. [3]茨城大・農）

○Hirokazu Ueda, Rika Ozawa1, Massimo Maffei[2], Tetsuo Gotoh[3], Junji Takabayashi1, Kazuhiko Matsuda (Kinki Univ., [1]Kyoto Univ., [2]Turin Univ., [3]Ibaragi Univ.)

【目的】植物は食害を受けると、特異的な揮発性物質（Herbivore Induced Plant Volatiles：HIPV）を放出することで植食者の天敵を誘引し、植食者を間接的に防御する。例えばリママメ（*Phaseolus lunatus*）とナミハダニ（*Tetranychus urticae*）の例では、食害を受けたリママメはHIPVを放出することでナミハダニの天敵であるチリカブリダニを誘引するが、その分子機構は不明である。

ナミハダニは吸汁性であり、食害時に共生微生物を植物に注入している可能性が高い。このことを念頭に置いて、これまでに我々は腸内細菌を除菌したナミハダニと通常のナミハダニを比較し、腸内細菌を除くことで食害によって誘導されるHIPVの組成が変化し、チリカブリダニが多く誘引されることを見出している。今回我々は、HIPVの産生、防御遺伝子の発現およびチリカブリダニ誘引活性に対するナミハダニの細胞内共生微生物の寄与について調べたので報告する。

【方法】ナミハダニの細胞内共生微生物は、ナミハダニを抗生物質で処理し、さらに抗生物質含有培地で栽培した無菌リママメで継体飼育することで除いた。リママメからのHIPVの産生はGCMSで定量し、防御遺伝子の発現はRealTime-PCRで定量した。被食害リママメによるチリカブリダニの誘引活性はY型オルファクトメーターによって測定した。

【方法】ナミハダニから細胞内共生微生物を除去した結果、HIPVの一部の成分が減少するとともに、リママメのチリカブリダニの誘引率も減少した。また、ナミハダニから細胞内共生微生物を除くことで、病害応答関連の遺伝子発現にも変化が生じた。これらの結果から、ナミハダニの細胞内共生微生物は、植物および天敵との間で形成される生態系相互作用のネットワークを調節する一つの因子としてはたらいていることが示唆された。

Herbivore induced plant volatiles, Tritrophic system, Symbiotic microbes

講演番号：2A30p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ A校舎30会場

オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生による代謝産物変動

Changes of metabolites in roots of rice plant during attacking by *Rhopalosiphum rufiabdominalis*

○手林 慎一[1,2]、及川 彰[3]、斉藤 和季[3,4]、上手 麻希[5]、間世田 英明[5]、大西 信太郎[2]（[1]高知大・農、[2]愛媛連大・農、[3]理研PSC、[4]千葉大院・薬、[5]徳島大・STS研究部）

○Shinichi Tebayashi[1,2], Akira Oikawa[3],Kazuki Saito[3,4], Uwate Maki[5], Hideaki Maseda[5], Shintaro Ohonishi[1,2] ([1]Kochi Univ., Agri., [2]Ehime Univ., UGAS, [3]RIKEN PSC, [4]Chiba Univ. Grad. School Pharm. Sci., [5]Univ. Tokushima, Grad. School Technol. and Sci.)

【目的】　イネの病害虫に対する抵抗性についての研究は数多く行われているが、その多くは茎葉部を対象とした研究であり、根部を対象とした研究はほとんど行われていない。本研究では陸稲やナスやスイカなど果菜類の根に寄生する農業害虫であるオアカボノアカアブラムシ（ヤサイネアブラムシ：*Rhopalosiphum rufiabdominalis*）がイネ根に寄生した際の代謝産物の変動解析を行うことで、害虫の加害に対するイネ根における応答機構の有無を検証する。

【方法】　（供試植物と供試昆虫）オアカボノアカアブラムシ（*R. rufiabdominalis*）は2009年春に高知大学農学部構内のサクラの木に発生した個体群を採集し、実験室内でイネ幼苗（日本晴）を用いて飼育した（27±3℃, 16L:8D)。

（質量分析方法）植物試料のメタノール抽出物は水とヘキサンで液-液分配し、得られた水層15nLをCE-MS(Agilent)で分析した。分析は1 M ギ酸緩衝液（カチオン）もしくは20 mM ギ酸アンモニウム水溶液（アニオン）を泳動液として用い、内部標準として、カチオン分析ではreserpine ($[M+H]^+$, m/z = 609.2806）およびメタノール２量体イオン($[2M+H]^+$, m/z = 65.0597）を用い、アニオン分析ではreserpine（$[M-H]^-$, m/z = 607.2661）およびギ酸２量体イオン($[2M-H]^-$, m/z = 91.0037）を用いて測定した。

（遺伝子発現分析方法）採取されたイネ幼根から、RNeasy Plant Mini Kit(キアゲン)を用いてTotalRNA を抽出し純度を計測した後にイネ オリゴDNAマイクロアレイ44K（Agilent）を用いたDNAマイクロアレイ分析を行った。DNAマイクロアレイはLow Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent）によりターゲット製作（Low Input Quick Amp Labeling Kit, Agilent)、ハイブリダイゼーション（Gene Expression Hybridization Kit, Agilent）および洗浄（Gene Expression Wash Buffers Pack, Agilent）を行った。データはAgilent Feature Extractionで解析した。

【結果】　質量分析の結果からアミノ酸や生体アミン、低分子有機酸の増加が確認され、特にトリプトファンが減少する一方でトリプタミンやセロトニンの増加が確認された。これらの生体アミンと桂皮酸誘導体類の縮合化合物群は、細胞壁の取り込みによりイネの生体防御の一端を担うことが提唱されている。DNAマイクロアレイ解析の結果から様々なPeroxidaseの発現増大も確認されたことから、イネの根においてオアカボノアカアブラムシの寄生に対して同様の生体反応が生じていることが明らかとなった。

aphid, rice, metabolomics

講演番号：2A30p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ A校舎30会場

ジャガイモそうか病自然発生土壌におけるそうか病菌の時空間動態解析

Spatial distribution and population dynamics of potato scab pathogens in soil during potato cultivation

○牧野　彩花、玉木　秀幸、眞鍋　佳世[1]、小山　修[1]、吉田　穂積[2]、星野　保、鎌形　洋一
（産総研・生物プロセス、[1]日鉄環境エンジニアリング(株)、[2]東農大・生物産業）

○Ayaka Makino, Hideyuki Tamaki, Kayo Manabe[1], Osamu Koyama[1], Hozumi Yoshida[2], Tamotsu Hoshino, Yoichi Kamagata (AIST, [1]NSKE, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】ジャガイモそうか病は *Streptomyces* 属菌によって引き起こされる多くの根菜類に感染する難防除土壌病害の一つである。発病した宿主表面にはコルク状の病斑が形成され、商品価値が著しく低下するために生産者にとって大きな問題となっている。これまでにそうか病の防除に関する多くの研究が行われているが、本病を引き起こす病原菌の土壌中における動態が不明であるため、感染メカニズムが明らかにされておらず有効な防除手段が無いのが現状である。近年、我々は、そうか病の病原性遺伝子の一つである *nec1* 遺伝子を定量することにより、土壌中のそうか病菌を正確かつ簡便に定量できる手法を開発した。そこで、本研究では、本手法を活用し、本病自然発生土壌におけるそうか病菌の時空間動態について詳細な解析を実施した。

【方法】2010 年に北海道道東地域から採取した本病の自然発生土壌を使用してポット栽培し、20 週間のそうか病菌の個体群動態を調べた。温室内で種イモ(品種'トヨシロ')を生育温度 20℃、補助光時間 12 時間で 30 株栽培した。施肥量は硫酸アンモニウム 172mg/kg、過リン酸石灰 454mg/kg、硫酸カリウム 127mg/kg とした。植付け時(0 週間目)、萌芽時(4 週間目)、その後 2 週間ごとに 3 株ずつ掘り上げ、バルク土壌、根圏土壌、塊茎表面土壌を採取した。また、塊茎を全て採取し、直径 1cm 以上の塊茎を調査した。さらに目視で健全塊茎と罹病塊茎に分け、調査全塊茎数に対する発病率を算出した。*nec1* のコピー数は Manome ら（Plant Pathology 57:887-896 (2008)）の方法に従って定量し、試料 1g あたりの *nec1* コピー数を算出した。

【結果】本研究では、ポット栽培における自然発生土壌中のそうか病菌の時空間動態を解析した。植付け前の*nec1*コピー数は10^3copies/g-soil以下であったが、バルク土壌と根圏土壌の*nec1*コピー数は栽培開始後緩やかに増加し、18週目で10^5 copies/g-soilに達し、その後枯凋した20週目までの間に減少した。一方、塊茎表面付近の土壌中の*nec1*遺伝子は8週目から10週目で最大コピー数（10^6 copies/g-soil）まで達した。この期間は、全塊茎数が5個から20個に急増し、病斑が確認され始めた期間と一致した。さらに、塊茎表皮の解析では、健全塊茎、罹病塊茎ともに高い*nec1*コピー数（i.e.>10^5 copies/g-skin）が検出された。特に、10週目から18週目までの塊茎形成期間は高い*nec1*コピー数が維持され、20週目には10^3copies/g-skinまで激減した。以上の結果から、ポット栽培における自然発生土壌中のそうか病菌は植付け後、まず宿主の根域で増殖し、その後塊茎形成の顕著な時期に塊茎表面土壌で植付け前の約1000倍まで増殖して宿主に感染し、一斉に病斑を形成するものと推察された。

spatial distribution, population dynamics, potato scab

講演番号：2A30p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ A校舎30会場

イネの植物免疫反応時に誘導されるTIFYタイプ転写調節因子の解析

Characterization of the TIFY-type transcription regulators upregulated during plant immune response in rice.

○久保健一、宇野雄太、宮田千加、大坪由佳、蔡晃植（長浜バイオ大・バイオ）
○ Ken-ichi Kubo, Yuta Uno, Chika Miyata, Yuka Ohtsubo and Fang-Sik Che
(Nagahama Institue of Bio-Science and Technology)

【目的】単子葉植物を宿主とする病原性細菌*Acidoborax avenae*は、菌株間の宿主特異性が厳密であり、例えばK1菌株はイネに対して病原性を示すが、ヒエを宿主とするN1141菌株はイネに病気を引き起こさず、過敏感細胞死や活性酸素発生などの一連の植物免疫反応を誘導する。これまでの研究から、過敏感細胞死を始めとするイネ免疫反応誘導にOsNACファミリーに属する転写因子や、WRKY転写因子群が関与することが示唆されているが、免疫反応誘導におけるこれら転写因子の個々の働きと、その転写調節ネットワークについては未だ不明な点が多い。そこで本研究は、植物免疫反応の制御に関与する新たな転写調節因子の同定と機能解析を目的とした。
【方法】イネ培養細胞において、非病原性N1141菌株接種時に特異的に発現変動する遺伝子を、マイクロアレイで解析した。得られたデータから、K1接種時または非接種コントロールと比較して、N1141菌株接種時選択的に転写レベルの上昇を示す遺伝子群の中から、転写調節因子をコードする遺伝子を探索した。今回注目したTIFYタイプ転写調節因子について、定量逆転写PCRによって、植物免疫反応誘導時における発現プロファイルを確認した。蛍光タンパク質VenusとTIFY転写因子の融合遺伝子を作成し、イネプロトプラストに一過的に導入して、TIFYタンパク質の細胞内局在パターンを調べた。
【結果】OsNAC転写因子と同様に、TIFYタイプの転写調節因子のいくつかが、非病原性N1141接種後のイネ培養細胞において免疫反応誘導時特異的に発現誘導されることが示された。これらのTIFYタンパク質は、ジャスモン酸シグナル経路に転写抑制因子として関与するJAZタンパク質のメンバーであるが、シロイヌナズナなどに存在するJAZタンパク質とは異なるイネ科特異的なクレードに分類された。また、同定したこれらTIFYタンパク質はすべて核に局在しており、核内における転写に関与する可能性が高いことも示された。現在、TIFYタンパク質の機能や転写調節機構について形質転換法を用いて調べている。

Plant immune response, TIFY-type transcription regulator, *Acidoborax avenae*

講演番号：2A30p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ A校舎30会場

植物病原細菌*Acidovorax avenae*のイネ過敏感細胞死誘導に関与するエフェクターの機能解析

Functional analysisof effector proteinderived from plant pathogenic bacteria thatinduced hypersensitive response cell death in rice

○近藤 真千子、吉田 裕貴、宮田 千加、佐々木 悠、青井 良介、蔡 晃植（長浜バイオ院・バイオ）
○Machiko Kondo, Yuki Yoshida, Chika Miyata, Haruka Sasaki, Ryousuke Aoi and Fang-Sik Che (Graduate School of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

植物病原細菌*Acidovorax avenae*のN1141菌株は非宿主であるイネに対して過敏感細胞死などの免疫反応を誘導する。このような植物による病原菌の認識と免疫反応誘導には、植物病原細菌に存在するTypeIII分泌装置(T3SS)とそこから分泌されるエフェクターと呼ばれるタンパク質をコードする*hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) 遺伝子群が関与することが明らかとなっている。イネにおけるこの菌の認識と免疫反応誘導機構を明らかにするため、我々はこれまでにTypeIII分泌装置を構成するタンパク質をコードする*hrc*遺伝子を含む約35kbpの*hrp*遺伝子群がこの菌株に存在することを明らかにした。また、N1141菌株の*hrc*遺伝子を欠損させたTypeIII分泌装置欠損株（*NΔ T3SS*）を作製して非宿主であるイネの培養細胞に接種したところ、植物の免疫反応のひとつである過敏感細胞死などを含む免疫反応が誘導されなくなり、TypeIII分泌装置から植物細胞内に分泌されるエフェクターがイネによる認識と免疫反応誘導に関与する可能性が示唆された。そこで、このようなTypeIII分泌装置から分泌されるイネの免疫反応誘導に関与するエフェクタータンパク質を同定するため、プロテオーム法により新規エフェクターの同定を試みた。N1141菌株と*NΔ T3SS*をイネ培養細胞に接種し6時間後に各菌体のタンパク質を抽出し、2次元電気泳動で分離したところ、*NΔ T3SS*の菌体内で特異的に蓄積するタンパク質の存在が明らかとなった。これらのタンパク質をトリプシンで消化し、質量分析計で解析したところ、約50個のタンパク質を同定することができた。これらの同定したタンパク質をコードする遺伝子の欠損株をそれぞれ作成し、各変異株のイネ過敏感細胞死誘導能について調べたところ、*Ahp1*と名付けた遺伝子の欠損株が過敏感細胞死誘導能を欠失していた。そこで、次に、イネ細胞内でAhp1が実際に過敏感細胞死を誘導するかどうかを調べるため、*Ahp1*遺伝子をイネ細胞内に導入し、発現させたところ、細胞死が誘導されることが明らかとなった。さらに、*Ahp1*遺伝子を導入した細胞において誘導される細胞死に核DNA断片化が関与するかについてTUNEL染色法によって調べたところ、Ahp1の発現により核DNAの断片化が誘導されていることが示され、この細胞死は免疫反応のひとつである過敏感細胞死であることが明らかとなった。また、Ahp1が菌体細胞外へ分泌されるかどうかについてAhp1のCyaA融合タンパク質を発現させた菌株を用いて調べたところ、Ahp1が分泌されていることが明らかとなった。これらの結果から、Ahp1がエフェクターとしてイネの過敏感細胞死に関与する可能性が示唆された。そこで、Ahp1のイネ細胞内受容体を明らかにするために、Ahp1と相互作用するタンパク質を酵母Two-hybridで解析したところ、AhpBpと名付けたタンパク質が同定され、このタンパク質が細胞内受容体として機能している可能性が示唆された。

pathogen, immunity, effector

講演番号：2A30p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ A校舎30会場

イネの免疫反応を誘導する病原細菌由来タンパク質の同定とその認識機構

Identification of rice immune-inducing factor from plant pathogenic bacteria.

○古川　岳人、平井　洋行、近藤　真千子、蔡　晃植（長浜バイオ大院・バイオ）
○Takehito Furukawa, Hiroyuki Hirai, Machiko Kondo, Fang-Sik Che (Graduate School of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

植物は、病原菌の持つPathogen-associated molecular pattern（PAMP）を認識してPAMP-triggered immunity（PTI）という免疫反応を誘導する。これまでに、キチン、フラジェリン、Elongation Factor Tu（EF-Tu）などがPAMPとして同一植物種に対して機能することが報告されており、植物は複数のPAMPを認識して免疫反応を誘導することが示唆されている。我々は、これまでにイネにおいて病原細菌*Acidovorax avenae* N1141菌株の鞭毛を構成するタンパク質であるフラジェリンがPAMPとして機能することを見いだしたが、フラジェリン欠損株においても一部のPTI誘導能が保持されることから、この菌株にはフラジェリン以外のPAMPの存在が示唆された。そこで、フラジェリン欠損*A. avenae* N1141菌株からイネに対してPTI誘導能を有する新たなPAMPの同定を試みた。フラジェリン欠損*A. avenae* N1141菌株を培養し、菌体を超音波破砕して得られた破砕上清をイネ培養細胞に処理したところ、PTI反応の1つである活性酸素発生が誘導された。この破砕上清のPTI誘導活性はトリプシン処理で完全に失われることから、活性物質はフラジェリン以外のタンパク質であることが示された。次に、この活性物質を精製するため、破砕上清をQ Sepharose担体を用いた強陰イオン交換クロマトグラフィーで分離したところ、活性画分は300 mM NaCl溶出画分に認められた。そこで、この活性画分を脱塩した後、二次元電気泳動で分離し、銀染色で検出されたスポットをゲル内トリプシン分解し、質量分析計を用いてタンパク質を同定した。同定したタンパク質の中に、これまでシロイヌナズナに対してPTIを誘導することが報告されているEF-Tuが存在していたが、イネにはEF-Tuの受容体であるEFR（EF-Tu Receptor）のオルソルグが存在しないことから、イネにおいてはEF-TuがPAMPとして機能しないと考えられていた。そこで、イネが*A. avenae* N1141菌株由来のEF-TuをPAMPとして認識するかどうかを大腸菌で発現させた*A. avenae* N1141菌株由来のEF-Tuを用いて調べた。その結果、このリコンビナントEF-Tuはイネ培養細胞に対してPTIを誘導することが明らかとなり、*A. avenae* N1141菌株由来のEF-Tuはイネに対するPAMPであることが明らかになった。さらに、シロイヌナズナにおけるEF-Tuの認識領域であるN末端18アミノ酸に相当する領域を*A. avenae* N1141菌株由来のEF-Tuのアミノ酸配列をもとに作成し、シロイヌナズナおよびイネ培養細胞にそれぞれ処理したところ、シロイヌナズナ培養細胞において活性酸素発生が誘導されたが、イネにおいては誘導されなかった。このことから、シロイヌナズナとイネではEF-Tuの認識部位が異なることが示唆された。

plant immunity, PAMP, EF-Tu

講演番号：2A30p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ A校舎30会場

イネの全身獲得抵抗性誘導に関するサリチル酸生合成の制御機構の解析

Efect of environmental stress on systemic acquired resistance in rice

○草島 美幸、平山 潤太、安田 美智子、篠崎 聰、仲下 英雄（東農大応生科・生応化、理研・イノベーション）

○Miyuki Kusajima[12], Junta Hirayama[2], Michiko Yasuda[2], Satoshi Shinozaki[2], Hideo Nakashita[12]
(Tokyo University of Agriculture[1], RIKEN[2])

植物の全身獲得抵抗性（SAR）は、病原体の感染部位における防御応答を契機として、全身にシグナルが移行して様々な病原体に対する抵抗性が誘導される防御機構である。シロイヌナズナ等を用いた研究から、SAR の誘導には SA の生合成酵素遺伝子の発現誘導と SA の蓄積が必要であり、SAR 誘導剤 BIT は SA の上流に作用することが明らかになっている。また、我が国において SAR 誘導剤はイネでのみ実用化されているが、冷害などの天候不良時にはいもち病の発生が大きな被害をもたらしていることから、SAR の効果発現には何らかの環境要因が影響を及ぼすことが推察された。そこで、本研究ではイネの SAR 誘導に関する SA の制御機構および環境ストレスの影響の解析を行った。

イネの内生 SA 量は部位および生育ステージによって変化するため、イネの第 4 葉が約 1cm の個体を選抜して SAR 誘導剤 BIT を処理し、伸展した葉身を約 2cm ごとの切片としてサンプリングして LC/MS を用いて解析した。その結果、葉身の下部において内生 SA 量の増加が見られた。次に、環境ストレスと SAR 誘導の関係を解明するために、BIT による SAR 誘導に及ぼす環境ストレス（塩、低温）や ABA の影響を解析した結果、内生 SA 量の増加が見られなかった。これらの結果から、イネの SAR の誘導においても、SA 生合成の活性化が重要であることが示唆された。BIT による病害抵抗性誘導に関与する SA 生合成経路を明らかにするために、*ICS* と *PAL* の関与について解析を進めている。

Rice, Salicylic acid, Disease resistance

講演番号：2A30p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ A校舎30会場

植物病原細菌由来の鞭毛タンパク質フラジェリンのイネにおける認識とその受容体の同定
Flagellin perception system in rice involved in induction of plant immune responses

○桂木雄也、小栗章成、柁山航介、梶本博文、田中佑佳、高井亮太、蔡晃植（長浜バイオ大院・バイオ）
○Yuya Katsuragi, Akinari Oguri, Kohsuke Kajiyama, Hirofumi Kajimoto, Yuka Tanaka, Ryota Takai, Fang-Sik Che (Grad. Sch. of Biosci. Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech.)

イネは、植物病原細菌*Acidovorax avenae*非病原性菌株の鞭毛タンパク質であるフラジェリンを特異的に認識することで免疫反応を誘導する。シロイヌナズナではフラジェリンのN末端領域の共通配列であるflg22を受容体型キナーゼであるFLS2を介して認識することが明らかになっている。そこで、イネにおけるflg22の認識と免疫反応誘導能を調べたところ、イネはflg22を認識せず、免疫反応を誘導しないことが明らかになった。また、FLS2のイネオルソログであるOsFLS2のRNAi抑制体でも、フラジェリン感受性が存在していたことから、イネにはFLS2とは異なる受容体がflg22とは異なるフラジェリン部位を認識していることが示唆された。そこで、イネに存在するフラジェリン受容体の同定と、その受容機構を明らかにするために、まず、イネにおけるフラジェリン認識部位について調べた。フラジェリンのN末端領域とC末端領域を大腸菌で発現させ、精製したタンパク質をイネに処理し免疫反応誘導の有無を確認したところ、フラジェリンのC末端領域に免疫反応誘導活性が存在することが明らかとなった。イネにはフラジェリンのC末端領域を認識する受容体が存在する可能性が示されたので、次に、イネに存在するこの受容体の同定を行った。植物では、様々なリガンドを処理した場合、その受容体の発現量が増加する場合が多いことが示されていることから、フラジェリン処理によって発現誘導される遺伝子をマイクロアレイによって探索したところ、17個の受容体型キナーゼをコードする遺伝子を同定した。これら同定した遺伝子を破壊したイネ変異株におけるフラジェリン感受性を調べたところ、*Flagellin-induced Receptor Kinase 2 (FliRK2)*と名付けた遺伝子破壊株（*flirk2*）がフラジェリン非感受性であることが示された。そこで、*flirk2*変異株に一過的、および恒常的にFliRK2を発現させたところ、フラジェリン認識による免疫反応誘導能が回復した。一方、シロイヌナズナの*fls2*変異株に*FliRK2*を導入した形質転換体では、C末端領域の認識能が付与されなかった。これらのことから、イネにおけるFliRK2を介したフラジェリンの認識情報の伝達経路はFLS2とは異なることが示された。

Acidovorax avenae, flagellin, receptor

講演番号：2A30p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ A校舎30会場

フラジェリン糖鎖構造によって制御されるイネによる*Acidovorax avenae*非病原性菌株のフラジェリン特異的認識とイネ免疫反応誘導機構

The specific induction mechanism of rice immune responses by flagellin glycans of *Acidovorax avenae* avirulent strain and virulent strain

○平井 洋行、中川 幸彦、古川 岳人、迹見 勇樹、蔡 晃植（長浜バイオ大院・バイオ）
○Hiroyuki Hirai, Yukihiko Nakagawa, Takehito Furukawa, Yuuki Atomi, Fang-Sik Che (Graduate School of Biosciences, Nagahama Institute of Bio-Science)

我々はこれまでに、イネは*Acidovorax avenae*非病原性 N1141菌株のフラジェリンを認識し、PTIと呼ばれる免疫反応を誘導するが、病原性K1菌株のフラジェリンは認識できず、PTIが誘導されないことを明らかにした。また、この様なイネの特異的な免疫反応誘導は、K1フラジェリンの糖鎖が関与することを明らかにし昨年までの本学会で報告した。そこで今回、フラジェリンの糖鎖によるイネ免疫反応誘導特異性の制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的として研究を行った。まず、K1フラジェリンの糖鎖付加部位について、糖鎖付加が予想されるSerまたはThr部位をAlaに置換したフラジェリンを作製し、その分子量を精密に測定することによって解析した。その結果、K1フラジェリンは^{178}Ser、^{183}Ser、^{212}Serと^{351} Thrに分子量540の糖鎖が付加していることが明らかとなった。次に、各糖鎖付加部位変異株から精製したフラジェリンをイネ培養細胞に処理したところ、^{212}Alaと^{351}Ala変異フラジェリンは免疫反応を誘導しなかったが、^{178}Alaまたは^{183}Ala変異フラジェリンを処理した場合は免疫反応を誘導した。以上のことからK1フラジェリンに存在する糖鎖によるイネの認識妨害は^{178}Serまたは^{183}Serに付加された糖鎖によることが明らかになった。次に、K1とN1141菌株のフラジェリン間に存在するイネ免疫反応誘導の特異性が両フラジェリンの糖鎖付加部位の違いによるのかを明らかにするため、N1141 フラジェリンの糖鎖付加部位についても調べた。その結果、N1141 フラジェリンは^{178}Thr、^{183}THr、^{351}Thrに分子量551の糖鎖が付加していることが示された。イネによるフラジェリンの認識妨害に関与する糖鎖が付加しているのはK1フラジェリンでは^{178}Serと^{183}Serであるが、N1141 フラジェリンでも同じく糖鎖が付加している。このことは、両フラジェリン間に存在するイネ免疫反応誘導の特異性は糖鎖付加部位の違いではなく、糖鎖構造の違いによって制御されている可能性を示唆する。そこで、両菌株のフラジェリン交換株を作製し、各交換株から精製したフラジェリンをイネ培養細胞に処理した。その結果、K1型の糖鎖が付加されたN1141フラジェリンは免疫反応を誘導しなかったのに対して、N1141型の糖鎖が付加されたK1フラジェリンは免疫反応を誘導した。このことから、N1141とK1フラジェリンに付加される糖鎖構造の違いがイネ免疫反応誘導の特異性を制御していることが明らかとなった。

Acidovorax avenae, flagellin, glycan

講演番号：2A30p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ A校舎30会場

Acidovorax avenae の病原性を異にするK1株およびN1141株のフラジェリン糖鎖構造

Structures of flagellin glycan chains of *Acidovorax avenae* K1 and N1141 strains with different pathogenicity

○吉田 充、小野 裕嗣、知久 和寛、平井 洋行[1]、亀山 眞由美、山本 雅信、蔡 晃植[1]、石井 忠、一瀬 勇規[2]（農研機構・食総研、[1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]岡山大院・自然科学）

○Mitsuru Yoshida, Hiroshi Ono, Kazuhiro Chiku, Hiroyuki Hirai[1], Mayumi Ohnishi-Kameyama, Masanobu Yamamoto, Fang-Sik Che[1], Tadashi Ishii, Yuki Ichinose[2] (NFRI, [1]Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]Okayama University)

【目的】植物に対する病原性を異にする*Acidovorax avenae* の2菌株のべん毛糖タンパク質フラジェリンの糖鎖構造を明らかにし、他の植物病原菌のフラジェリン糖鎖と比較する。
【方法】LB液体培地、30℃で培養した*A. avenae* のフラジェリンをブレンダーによって菌体から切断後、遠心分離操作で精製し、糖鎖をヒドラジン分解により切り離し、ピリジルアミノ標識を行った。この標識糖鎖の構造を、質量分析とNMRスペクトル解析により決定した。さらに、糖鎖に含まれる構成糖をGC-MSで同定した。ラムノースの絶対配置は、(*S*)-(+)-2-ブタノールでグリコシド化したものをTMS化してGC-MSで標品と比較して決定した。
【結果】K1株およびN1141株のフラジェリン糖鎖にはラムノースが含まれ、それらはすべてL型であることが示された。さらにK1株のフラジェリンの^{178}Ser、^{183}Ser、^{212}Ser、^{351}Thrに結合している糖鎖糖鎖はすべて、4-amino-4-deoxy-*N*-(2,3-dihydroxy-1-oxopropyl)-2-*O*-methyl-β-Glc*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-L-Rhaであることが明らかになった。この糖鎖は、*Pseudomonas syringae* のフラジェリンで報告されている糖鎖と類似しているが、ラムノースの結合様式と、非還元末端の糖の4位にアミド結合している修飾鎖が異なっている。一方、N1141株のフラジェリンの^{178}Thr、^{183}Thr、^{351}Thrに結合している糖鎖糖鎖はすべて、*N*-acetylsarcosyl-4-amino-4-deoxy-α-Fuc*p* -(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-L-Rhaと推定された。このN1141株のフラジェリン糖鎖は、K1株のものと比べると、非還元末端のアミノ糖とそれにアミド結合している修飾鎖が異なっていた。今回見出された*A. avenae* の2菌株のフラジェリン糖鎖の非還元末端の修飾基を含む糖構造は、これまでに報告のない新規の構造である。以上のように、*A. avenae* と*P. syringae* ではフラジェリンの糖鎖は類似しているが、構成糖や糖の修飾部分に相違が見られた。また病原性を異にする*A. avenae* の菌株間でも糖鎖の非還元末端に構造の相違があり、病原性とフラジェリン糖鎖構造の関係解明が今後の研究課題である。

Acidovorax avenae, flagellin, glycan

講演番号：2A30p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ A校舎30会場

Acidovorax avenae K1菌株のフラジェリン糖鎖の非還元末端糖によるイネの免疫反応誘導特異性の制御

Specific induction mechanism of rice immune responses by the nonreducing terminal sugar of *Acidovorax avenae* K1 flagellin glycan.

○中川 幸彦、平井 洋行[1]、迹見 勇樹[1]、古川 岳人[1]、小野 裕嗣[2]、吉田 充[2]、蔡 晃植[1]（長浜バイオ大学・バイオ、[1]長浜バイオ大院・バイオ,[2]農研機構・食総研）

○Yukihiko Nakagawa, Hiroyuki Hirai[1], Yuuki Atomi[1], Takehito Furukawa[1], Hiroshi Ono[2] , Mitsuru Yoshida[2], Fang-Sik Che[1] (Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [1] Graduate school of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]NFRI)

我々はこれまでに、イネが*Acidovorax avenæ*非病原性N1141菌株のフラジェリンを認識し、PTIと呼ばれる免疫反応を誘導するが、病原性K1菌株のフラジェリンは認識できず、PTIが誘導されないことを明らかにした。また、このようなイネの特異的な免疫反応の誘導は、両菌株のフラジェリンに付加される糖鎖構造の違いによって制御されていることを明らかにした。両フラジェリンの糖鎖はそれぞれ3糖から構成されているが、K1菌株とN1141菌株のフラジェリンでは非還元末端の糖構造が異なっていた。このことから、両フラジェリン糖鎖の非還元末端の構造がイネ免疫反応誘導特異性を制御している可能性が示唆された。この可能性を検証するため、まず、両フラジェリン糖鎖構築に関与する遺伝子の同定を試みた。両菌株のフラジェラオペロンを詳細に調べたところ、グリコシレーションアイランドと呼ばれるフラジェリン糖鎖合成に関与する遺伝子群内に両菌株間で異なる遺伝子が3つ存在していた。そこで、この3つの遺伝子が両菌株のフラジェリン糖鎖における非還元末端糖の構築に関与すると考え、K1菌株においてこれら3つの遺伝子の欠損株を作製した（KΔ3）。この作製したKΔ3菌株からフラジェリンを精製し、SDS-PAGEで分離後、トリプシンによるインゲル消化を行い、酵素消化産物の分子量を質量分析計で調べた。その結果、K1野生株のフラジェリン糖鎖は分子量540であるのに対し、KΔ3菌株のフラジェリン糖鎖の分子量は293であった。この分子量は非還元末端の糖である修飾ビオサミンが欠如した場合の糖鎖構造の分子量と一致する。そこで、この糖鎖構造を詳細に明らかにするため、精製したKΔ3フラジェリンからヒドラジン分解により糖鎖を切断し、ピリジルアミノ化標識を行った後、逆相HPLCによって精製し、機器分析による糖鎖の構造解析を行った。その結果、KΔ3菌株のフラジェリン糖鎖は、非還元末端の修飾ビオサミンが欠如している糖鎖構造であることが証明された。そこで、次にKΔ3菌株のフラジェリンをイネ培養細胞に処理したところ、K1野生株のフラジェリンを処理した場合とは異なり、免疫反応が誘導された。このことから、K1フラジェリンに付加される糖鎖の非還元末端の糖構造がイネ免疫反応誘導の特異性を制御していることが明らかとなった。

Plant recognition, flagellin, glycan

講演番号：2A30p17
講演日時、会場：3月23日17:15～ A校舎30会場

細菌キトサナーゼを発現するイネの作製とそのいもち病抵抗性の解析

Expression of a bacterial chitosanase in rice improves disease resistance to *Magnaporthe oryzae*

○香西 雄介[1,2]、望月 進[2]、齋藤 明広[3]、安藤 昭一[4]、南 栄一[1,2]、西澤 洋子[2]（[1]筑波大院生命環境、[2]農生資研、[3]静岡理工科大理工、[4]千葉大院融科

○Yusuke Kouzai[1,2]、Susumu Mochizuki[2]、Akihiro Saito[3]、Akikazu Ando[4]、Eiichi Minami[1,2]、Yoko Nishizawa[2]（[1]Tsukubadai、[2]NIAS、[3]Shizuokarikoukadai、[4]Chibadai）

【目的】キトサンは *N*-グルコサミンがβ-1,4 結合した多糖であり、一部の糸状菌の細胞壁構成成分である。キトサナーゼ(EC 3.2.1.132)は、キトサンを特異的に加水分解する酵素で、多数の微生物から単離されているが、高等植物からは見つかっていない。イネいもち病菌や炭疽病菌等の一部の植物病原菌は、宿主感染時に主要な細胞壁多糖であるキチンを脱アセチル化してキトサンに変換することが示唆されている。キトサンは、植物が分泌する溶菌酵素の一つであるキチナーゼの基質にはほとんどならないことから、キチンのキトサン化は宿主の溶菌酵素による分解を回避する植物病原菌の感染戦略の一つであると考えられる。本研究では、キトサナーゼのイネいもち病菌(*Magnaporthe oryzae*)に対する抗菌活性を調べるとともに、耐病性の向上を目的としてキトサナーゼ活性を付与したイネを作製し、そのいもち病抵抗性を解析した。

【方法と結果】*Brevibacillus choshinensis*で発現させた*Bacillus circulans* MH-K1株由来のキトサナーゼ(Cho1)を用いて、イネいもち病菌に対する*in vitro*抗菌活性を調べたところ、Cho1はいもち病菌の付着器形成を強く阻害した。次に、分泌シグナルを除いたCho1、あるいは、Cho1の分泌シグナルをイネのキチナーゼCht2由来の細胞外分泌シグナルに置換したCho1を恒常的に発現する二種類のCho1発現イネ（-SS、＋SS）を作製した。Cho1を発現するイネ培養細胞のキトサナーゼ活性をTLCによって解析した結果、-SS、＋SSいずれの培養細胞からもキトサナーゼ活性が確認された。また、Cho1を発現するイネにおけるCho1の蓄積部位を解析したところ、＋SSイネではCho1が細胞外に蓄積し、-SSイネでもCho1が細胞外画分から若干検出されたが、その量は＋SSイネで多かった。さらに、葉鞘と葉身におけるいもち病抵抗性を検定した結果、＋SSイネでは、いもち病菌侵入部位の過酸化水素の生成が亢進し、菌糸の伸展や病斑形成がコントロールイネと比べて有意に抑制された。以上の結果から、感染時のいもち病菌の細胞壁には酵素がアクセス可能な表層にキトサンが存在していること、また、Cho1を細胞外に十分量分泌させたイネでは、Cho1によっていもち病菌のキトサンが分解され、その生育が阻害されるとともに、いもち病菌由来のエリシター生成が高まり、イネの防御応答がより活性化するために、いもち病抵抗性が向上することが強く示唆された。

chitosanase, rice, *Magnaporthe oryzae*

講演番号：2A30p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ A校舎30会場

アシルポリアミン誘導体のイネ病害抵抗性反応における作用と役割

The effects and roles of acyl polyamine derivatives in desease resistance response of *Oryza sativa*

○彦坂 政志[1]、中村 英光[1]、前田 哲[2]、森 昌樹[2]、岡田 憲典[3]、山根 久和[3]、浅見 忠男[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]農生資研、[3]東大生物工学セ）

○Masashi Hikosaka[1], Hidemitsu Nakamura[1], Satoru Maeda[2], Masaki Mori[2], Kazunori Okada[3], Hisakazu Yamane[3], Tadao Asami[1]（[1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]NIAS, [3]Biotech. Research Center, Univ. of Tokyo）

〈目的〉

スペルミジンは植物のもつ代表的なポリアミン類のひとつであり、過敏感細胞死反応(HR)などの植物の病害抵抗反応において重要な役割を担っている可能性が報告されている。また我々はイネ由来の遺伝子を過剰発現させたイネアクティベーションタギングラインで見出されたいもち病や白葉枯れ病に対して広い抵抗性を示す病害抵抗性変異体 *Sp118* において、アシルスペルミジン類が蓄積している可能性を報告している。そこでスペルミジンのアシル化誘導体を作出し、LC-MSMS 解析によって天然物としての同定を目指すとともにその細胞死や病害抵抗性に対する活性を評価することによって植物におけるスペルミジン類の役割について新しい知見を得ることを目的とした。

〈方法と結果〉

まず有機合成の手法を用い、複数のスペルミジンのモノアシル誘導体を合成した。合成したアシルスペルミジン誘導体を下敷きとして *Sp118* の原因遺伝子である *OsAT1* の過剰発現体と WT（日本晴）に対して LC-MSMS 解析を行った結果、合成したアシルスペルミジン誘導体のひとつである ^{4}N-Lauroylspermidine や ^{4}N-Hydroxylaruroylspermidine の異性体と考えられるピークを過剰発現体に有意に蓄積した化合物ピークとして同定した。

そこで、同定された化合物を中心にアシルスペルミジン誘導体の生物活性を調べることとした。まずスペルミジンにおいて報告されている細胞死活性を評価するべく、化合物水溶液をイネ(日本晴)の葉身に滴下してその経過を観察したところ、アシル基の炭素数が 9, 12 のものにおいても細胞死の誘導が見られ、スペルミジンに構造が近い程活性が高いわけではないという興味深い結果が得られた。次に *Sp118* の病害抵抗性という形質を参考に、これらの化合物について *OsPR1b*, *PBZ1*, *WRKY45* といった既知の抵抗性マーカー遺伝子の発現量測定や、いもち病菌に対する抵抗性検定、抗菌物質であるファイトアレキシン産生量の測定といった病害抵抗性の評価を行ったところ、これらの化合物は病害抵抗性を誘導する plant activator 活性を示し、そこで最も病害抵抗性を上げるアシルスペルミジンとして ^{4}N-Hydroxylaruroylspermidine を同定した。

polyamine, disease resistance, *Oryza sativa*

講演番号:2A30p19
講演日時、会場:3月23日17:37～ A校舎30会場

色変換蛍光蛋白質kikume green redを用いた共生過程における根粒菌の動態解析

Analysis of the rhizobial division in the symbiosis using fluorescent protein, kikume green red

○鳥井　健次[1], 川口　正代司[2], 松岡　健[1.3.4]([1]九大院・生資環, [2]基生研・共生システム, [3]九大院・農、[4]九大・生環セ)

○Kenji Torii, Masayoshi Kawaguchi[1], Ken Matsuoka (Kyushu Univ., [1]NIBB)

【目的】根粒菌はマメ科植物との共生過程において、植物の根毛先端を開始点として形成される感染糸と呼ばれる管状膜構造を介して、植物内へと侵入する。この過程で、感染糸は内部を根粒菌で満たされながら伸長していき、最終的には皮層細胞内へ根粒菌が放出される。この過程で根粒菌は感染糸内において増殖していると考えられているが、その実態は明らかにされていない。本研究では、根粒菌細胞分裂の可視化系の確立と、この系を用いて感染糸内の根粒菌の増殖過程を明らかにすることを目的としている。

【方法】色変換蛍光蛋白質kikume green red (kikume)は、紫光照射によって緑色から赤色に蛍光特性を不可逆的に変化させる蛋白質である。従って、構成的にこの蛋白質を合成している細胞において、蛍光変換後の赤色蛍光を呈するkikumeは、新規に合成された緑色蛍光を呈するkikumeと区別することが出来る。この蛍光変換と細胞分裂によって細胞質が二分されていく性質を利用して、蛍光変換後のkikumeの赤色蛍光強度を定量することで、細胞分裂の評価系の確立を試みた。根粒菌(*Mesorhizobimu loti* TONO)への相同組換え法によって、kikumeを恒常的に発現する根粒菌を作出した。作出したkikume発現根粒菌に対して、培養フラスコごと紫光照射により蛍光変換を行った。蛍光変換後、根粒菌の培養を行い、経時的に蛍光強度を定量した。

【結果】細胞分裂・非細胞分裂下での細胞数と赤色蛍光強度の変化を定量したところ、蛍光変換後のkikume蛋白質が、少なくとも十時間は根粒菌内で安定に存在していた。また、菌体の増殖過程においては、細胞当たりの蛍光変換後のkikume蛋白質由来の赤色蛍光が分裂回数に依存して定量的に減少することを見出した。これらの結果から、蛍光変換後のkikume蛋白質の赤色蛍光強度を検出することで、細胞分裂を評価できる系が確立されたと判断した。現在、この系をマメ科のモデル植物であるミヤコグサと根粒菌の共生成立過程の解析に適用し、共生過程における感染糸侵入中の根粒菌増殖の解析を進めている。

Kikume, Infection Thread, cell division

講演番号：2A30p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ A校舎30会場

ミヤコグサ根粒で発現する糖輸送体候補*SWEET*の解析

Analysis of a putative sugar transporter *SWEET* expressing in nodules of *Lotus japonicus*

○齊田　有桂、杉山　暁史、高梨　功次郎、矢崎　一史（京大生存圏）
○Yuka Saida, Akifumi Sugiyama, Kojiro Takanashi, Kazufumi Yazaki (RISH・Kyoto University)

【目的】

窒素飢餓環境下でマメ科植物に根粒菌が感染すると、主に根で根粒が形成される。根粒内の細胞において根粒菌はバクテロイドとして共生し、宿主植物に窒素固定産物であるアンモニウムイオンを供給する一方、植物からバクテロイドには炭素源のリンゴ酸や無機イオン等、生育に必要な栄養分が与えられる。この植物からバクテロイドへの炭素源の供給は共生窒素固定で重要な役割を担っているにも関わらず未だ不明な点が多い。本研究では、根粒における糖輸送体を同定しその機能解析を行うことにより、バクテロイドへの炭素源供給メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

マメ科のモデル植物であるミヤコグサ（MG-20）を材料として、シロイヌナズナで最近報告された新規のグルコース排出型輸送体（AtSWEET）のホモログを研究対象とした。*AtSWEET* と同じファミリーの遺伝子はミヤコグサゲノム上に少なくとも 13 分子種あることが明らかとなった。各メンバーの地上部、根、根粒での発現を半定量的 RT-PCR により解析したところ、*LjSWEET4* のみが根粒で発現していることが認められた。

そこで根粒菌感染から経時的にミヤコグサ各組織から RNA を抽出し、逆転写により cDNA を調製して定量的 Real-Time PCR を行うことにより、*LjSWEET4* の発現解析を行った。その結果、*LjSWEET4* の発現は根粒菌感染直後から根粒形成段階が進むに従って根粒を含む根全体での発現が上昇し、21 日目の根粒において最も発現が高くなっており、他組織と比較すると根粒での *LjSWEET4* の発現は根の約 3 倍、地上部の約 10 倍であった。このことから、*LjSWEET4* は根粒の形成や機能に関与していることが示唆された。

LjSWEET4 のより詳細な発現組織特異性を明らかにするため、コード領域の上流約 2 kb をプロモーター領域として GUS 遺伝子を融合させたコンストラクトを作製し、毛状根形質転換法によってミヤコグサへ導入した。毛状根に根粒菌を接種し、30 日後に根粒を GUS 染色したところ、根の維管束及び根粒維管束で強い GUS 染色が認められた。この結果より、*LjSWEET4* は根から根粒へと単糖を輸送する所で機能することが推測された。今後は、酵母を用いた輸送活性の測定を行い、輸送基質や特異性、更に蛍光タンパク質融合コンストラクトを用いて膜局在性を明らかにするとともに、RNAi 体を用いた LjSWEET4 の機能解明を行う予定である。

Sugar transporter, Symbiosis, *Lotus japonicus*

講演番号：2A31a01
講演日時、会場：3月23日09:00～ A校舎31会場

イネのリグニン生合成経路の解明

Elucidation of lignin biosynthetic pathway in rice plant

小柴太一[1]，廣瀬孝江[1]，向井まい[1]，山村正臣[1]，服部武文[1]，鈴木史朗[1]，坂本正弘[2]，○梅澤俊明[1,3]
([1]京大生存研，[2]京大院農，[3]京大生存基盤)

Taichi Koshiba[1], Norie Hirose[1], Mai Mukai[1], Masaomi Yamamura[1], Takefumi Hattori[1], Shiro Suzuki[1], Masahiro Sakamoto[2], and ○Toshiaki Umezawa[1,3] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ., [3]ISS, Kyoto Univ.)

近年，化石燃料の枯渇や大気中二酸化炭素濃度の上昇に伴う地球温暖化が大きな社会問題となっており，その解決策の一つとして再生型資源である植物バイオマスの利用が求められている．植物バイオマスの中で最も多く蓄積しているリグノセルロースは再生可能資源として最も注目されているものの一つである．リグノセルロースに含まれるセルロースやヘミセルロースを利用する際，酵素糖化などによりそれらの多糖を単糖へ変換することが多い．しかし，リグノセルロース多糖はリグニンに覆われており，このことが酵素糖化率を著しく低下させる主因となっている．この問題を解決するためには，リグニンの蓄積量や超分子構造を制御することが必要である．一方，イネを始めとしてイネ科にはバイオマス資源として有用な植物が数多く存在するにもかかわらず，イネ科植物のリグニン生合成経路の詳細は不明なままである．そこで本研究ではリグニンの生合成を制御しリグノセルロースの酵素糖化率を向上させるために，イネのリグニン生合成経路（ケイ皮酸／モノリグノール経路；CM経路）を明らかにすることを目的に実験を行った．

CM経路の鍵酵素であるカフェー酸OMT（COMT）を大腸菌で発現させ，組換え酵素を調製した．得られた酵素とCM経路中の候補基質を反応させ，酵素反応生成物をGCMSにて分析した結果，組換えCOMTは5-ヒドロキシフェルラ酸（5-HFA）と5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒド（5-HCAld）をよい基質とした．また，5-HCAldは5-HFAのメチル化を阻害することから，COMTの実態は双子葉植物の場合と同様，5-HCAld *O*-methyltransferase（CAldOMT）であることが示された．また，CAldOMTはCM経路において主に5-HCAldの5位メチル化を触媒することが示された．*CAldOMT*の発現を抑制した組換えイネでは野生株に比べ，ウィスナー反応による呈色が維管束鞘細胞と皮層繊維組織で弱く，リグニン含量もすべての部位（葉身，葉鞘，稈）で減少した．この発現抑制株のリグニン中に含まれる芳香核構成を調べると，シリンガアルデヒドが最大で約87%減少してS/V比が大きく低下し，5-ヒドロキシグアヤシル核が蓄積していた．Hydroxylcinnamoyl CoA: shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase（HCT）あるいは *p*-coumaroyl shikimate/quinate 3-hydroxylase（C3H）の発現抑制イネではリグニン含量が減少することと合わせると，イネのシリンギルリグニン生合成経路は双子葉植物の経路と一致することが強く示唆された．

O-methyltransferase, Syringyl lignin, 5-hydroxyconiferaldehyde

講演番号：2A31a02
講演日時、会場：3月23日09:11～ A校舎31会場

エリアンサスのリグニン及び関連物質の量と酵素糖化率の節間間変動解析

Variation in the lignin and hydroxycinnamate contents and enzymatic saccharification efficiencies among internodes of *Erianthus ravennae*

○山村 正臣[1]、大竹 雄一郎[1]、野田 壮一郎[1]、服部 武文[1]、高部 圭司[2]、鈴木 史朗[1]、櫻井 望[3]、鈴木 秀幸[3]、池 正和[4]、徳安 健[4]、菊地 淳[5]、柴田 大輔[3]、梅澤 俊明[1,6]（[1]京大・生存研、[2]京大・院農、[3]かずさDNA研、[4]食総研、[5]理研・植物、[6]京大生存基盤）

○Masaomi Yamamura[1], Yuichiro Otake[1], Soichiro Noda[1], Takefumi Hattori[1], Keiji Takabe[2], Shiro Suzuki[1], Nozomu Sakurai[3], Hideyuki Suzuki[3], Masakazu Ike[4], Ken Tokuyasu[4], Jun Kikuchi[5], Daisuke Shibata[3], Toshiaki Umezawa[1,6]（[1]RISH, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Kazusa DNA Res. Inst., [4]NFRI, [5]RIKEN PSC, [6]ISS, Kyoto Univ.）

【目的】近年、草本系エネルギー植物として重要視され、注目を集めている大型イネ科植物の一つにエリアンサスがある。しかし、エリアンサスについてはこれまでリグノセルロースの超分子構造はもとよりリグニン単独の性状さえもほとんど解明されていなかった。

エネルギー植物の細胞壁成分の酵素糖化はリグニンや細胞壁結合型ケイヒ酸類により著しく阻害されることが知られている。本研究では、エリアンサスの茎に注目し、リグニン及び関連物質、さらには酵素糖化性が節間間でどのように変動しているかを解析することを目的とした。

【方法】22の節間からなるエリアンサスから各節間をそれぞれ切り出し、これら節間の内側と外側を分割及び粉砕した。そして、溶媒抽出した後、各種化学分析に供した。リグニン含量はチオグリコール酸法、リグニンの芳香核構成（S/V比、及びH/V比）はニトロベンゼン酸化法により測定した。また、試料をアルカリ加水分解することによって放出されるフェルラ酸及び*p*-クマール酸を細胞壁結合型ケイヒ酸類としてそれぞれ測定した。さらに、エリアンサスの各節間の試料に含まれるデンプンをAmylase、Amyloglucosidaseにより分解し除いたのち、Glucanase、Hemicellulase、Cellulase、β-Glucosidaseの混合酵素系により糖化し、生成グルコースをグルコースキットにより定量した。別途もとめた全グルカン量に対する比に基づき酵素糖化率を計算した。組織観察には出穂直後のエリアンサスの茎から作製した切片をフロログルシン-塩酸反応、及びモイレ反応に供した。

【結果】まず、各節間の内側及び外側についてリグニンの量及びその芳香核組成を分析した。リグニン含量は、節間内側では17.1-24.5%、外側では18.4-27.3%であり、またそのS/V比は内側で0.43-0.96、外側で0.63-1.13であった。リグニン含量及びS/V比は基部節間ほど高くなる傾向が認められた。次に、フェルラ酸は頂端節間ほどその含有量は高くなる傾向が認められたが、*p*-クマール酸ではこの傾向は認められなかった。さらに、酵素糖化率は節間内側では17.5-35.8%、外側では2.8-30.9%であり、頂端節間ほど酵素糖化率が高くなる傾向が認められた。本研究では、エリアンサスの節間間変動を解析することにより、リグニン及び関連物質、そして酵素糖化率のおおよその傾向を見出した。

Erianthus, Lignin, Saccharification

講演番号：2A31a03
講演日時、会場：3月23日09:22～ A校舎31会場

ソライロアサガオのクマリン生合成に関わるオルト位水酸化酵素遺伝子のクローニングと機能解析

Cloning and functional analysis of the *ortho*-hydroxylase involved in coumarin biosynthesis in morning glory

○田辺綾野、清水文一（東洋大・生命科）
○Ayano Tanabe, Bun-ichi Shimizu (Toyo Univ.)

【目的】植物の二次代謝産物の一つであるクマリン化合物はリグニンなどを合成するフェニルプロパノイド経路から分岐して合成される。この分岐反応は桂皮酸類のオルト位水酸化によって進行する。クマリン化合物であるスコポレチン（7-hydroxy-6-methoxycoumarin）を蓄積するシロイヌナズナではフェルロイル-CoAオルト位水酸化酵素(AtF6′H1)がこの鍵反応を触媒する。一方、ソライロアサガオにおいては病原菌の感染刺激に応答してスコポレチンとウンベリフェロン（7-hydroxycoumarin）を蓄積する。そこで本研究ではソライロアサガオのクマリン生合成に関わるオルト位水酸化酵素遺伝子のクローニングと機能解析を目的とした。
【方法と結果】サツマイモのAtF6′H1ホモログ配列を参考にプライマーを設計し、ソライロアサガオのtotal RNAを鋳型として部分配列を取得した後、RACE法にて3’,5’末端の配列を調べ、3種類の全長 ORFを取得した。AtF6′H1とのアミノ酸配列での相同性は58%だった。さらに取得した配列を大腸菌を用いて組換え酵素として発現させ、酵素活性を測定した。

coumarin biosynthesis, *Ipomoea tricolor*, *ortho*-hydroxylase

講演番号：2A31a04
講演日時、会場：3月23日09:33～ A校舎31会場

植物の化学防御機構におけるイリドイド配糖体糖加水分解酵素の酵素学的研究

Enzymatic Characterization of Iridoid Glucoside Specific β-Glucosidase

○大上 将司、松野 聡、平田 拓[1]、道羅 英夫[2]、渡辺 修治[1]、大西 利幸[3]（静大院・農、[1]静大院・創造、[2]静大・遺伝子、[3]静大・GRL）

○Shoji Ohgami, Satoshi Matsuno, Hiroshi Hirata[1], Hideo Dohra[2], Naoharu Watanabe[1], Toshiyuki Ohnishi[3] (Grad. School Agric., Shizuoka univ., [1]Grad. School of Science and Technology., Shizuoka Univ., Institute for Genetic Research and Biotechnology., Shizuoka Univ., Division of Young Research Leaders., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】オレウロペイン (Oleuropein) はセコイリドイド配糖体部位とチロソール部位を有するフェノール性セコイリドイド配糖体であり、オリーブやイボタなどモクセイ科植物の葉や果実に多く含まれている (Somanadhan *et al*., (1998), Takahashi *et al*., (1999))。植物が昆虫などの植食者から食害を受けると、オレウロペインは β-グルコシダーゼの糖加水分解反応やポリフェノールオキシダーゼの酸化反応によりグルタルアルデヒド様構造およびカテコール構造を有する反応性の高い化合物 (タンパク質変性物質) へと変換される。さらにタンパク質変性物質は植物中のタンパク質と架橋体を形成することで高分子タンパク質重合体を形成する。高分子タンパク質重合体は食害昆虫に対する難消化性物質として機能するため食害昆虫の成長を抑制する防御物質して働くと提唱されている (Konno *et al*., 1999)。しかし、タンパク質変性物質へと変換する鍵酵素とされる β-グルコシダーゼやポリフェノールオキシダーゼは単離・同定されておらず、またタンパク質重合体の化学構造も未解明のままである。そこで本研究では植物の化学防御機構におけるオレウロペインの生理学的役割を解明することを目的として、防御活性化の鍵酵素であるβ-グルコシダーゼをオリーブ果実から抽出・精製し、その酵素学的解析を行った。

【方法・結果】オリーブ果実からアセトン沈殿法により粗タンパク質を調製し、緩衝溶液に溶解した後に各種クロマトグフィー (陰イオン交換カラム、疎水性カラム、ゲルろ過カラム) により精製した。オレウロペインを基質として精製タンパク質の糖加水分解活性を検討した結果、オレウロペインに対して高い活性を有した。SDS-PAGE 電気泳動解析により精製タンパク質は 65 kDa 付近に顕著なバンドを示すこと、また LC-MS/MS を用いた *de novo* 解析により精製タンパク質の部分アミノ酸配列が植物 β-グルコシダーゼ (ファミリー 1) に属すること、さらにすでに報告されているイリドイド配糖体糖加水分解酵素と高い相同性を示すことを明らかにした。次に PCR 法により全長 cDNA 配列 (Olea europaea Glucoside Hydrolase 1:OeGH1 cDNA) を取得し、大腸菌発現系において OeGH1 の異種発現を行った。OeGH1 の基質特異性を解析するために様々な配糖体を基質として相対活性試験を行った結果、OeGH1 はオレウロペインに対して最も高い糖加水分解活性を有することを明らかにした。

Konno *et al*,. *PNAS*., **96**, 9159-9164 (1999)

Iridoid, olive, ß-glucosidase

講演番号：2A31a05
講演日時、会場：3月23日09:44～ A校舎31会場

オリーブ傷害葉で生じる新規オレウロペイン糖加水分解産物-アミノ酸複合体の構造解析

Chemical structure of oleuropein hydrolyzed metabolite-amino acid in olive leaves

○池田 修也、松野 聡[1]、大上 将司[1]、渡辺 修治[2]、大西 利幸[3]（静大・農、[1]静大院・農、[2]静大院・創造、[3]静大・GRL）

○Shuya Ikeda, Satoshi Matsuno[1], Shoji Ohgami[1], Naoharu Watanabe[2], Toshiyuki Ohnishi[3] (Facul. Agric., Shizuoka Univ., [1]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. School Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]GRL, Shizuoka Univ.)

【目的】環境ストレスから植物自身を守るために生合成される化学防御物質は、植物の成長戦略上重要な役割を担っている。樹木、特にモクセイ科植物に含まれるイリドイド配糖体オレウロペインは糖加水分解反応および酸化反応により活性化され、グルタルアルデヒド様構造を有する防御活性化物質へと変換され、植物中のタンパク質と高分子架橋変性体を形成することで植物の化学防御に寄与していることが提唱されている (Konno, *et al*., 1990) 。しかし、グルタルアルデヒド様構造およびカテコール構造を有する防御活性化物質および高分子架橋変性体の化学構造が明らかになっておらず、未だ生理学的な役割は実証されていない。これまでに我々はオリーブ糖加水分解酵素 (β-GH) とオレウロペインとの反応によって生じるオレウロペイン糖加水分解産物 (OHM) がグルタルアルデヒド様構造を有することを化学構造解析により明らかにした。以上より、我々は OHM が有するグルタルアルデヒド様構造がタンパク質を構成するアミノ酸アミノ基とシッフ塩基を形成することで高分子架橋変性体を生み出していることを推定した。このメカニズムにおいて、 OHM は植物体内の遊離アミノ酸とも反応することが予想される。そこで本研究は OHM とアミノ酸により合成した OHM-amino acid の化学構造の決定および植物体における OHM-amino acid の探索を試みた。

【方法】オレウロペインを β-GH によって糖加水分解することで、グルタルアルデヒド様構造を有する OHM を合成した。また OHM に L- アミノ酸を添加することによって合成した反応物を HPLC にて精製し、単離した化合物を高分解能 MS および2次元 NMR にて構造解析を行った。そして、上記の方法で合成した OHM-amino acid を標準品とし、オリーブ無加害葉およびオリーブ加害葉の抽出物を LC-MS/MS を用いて分析した。

【結果】オリーブ加害葉の抽出物のみにおいて *in vitro* 合成した OHM-amino acid と保持時間および MS^2 フラグメントパターンが一致した OHM-amino acid を検出することに成功した。この結果、オリーブは傷害を受けることによってオレウロペインが代謝され OHM-amino acid を生成することが示唆された。さらに、 *in vitro* において合成した OHM-amino acid の化学構造を決定した結果、 OHM のグルタルアルデヒド様構造とアミノ酸1分子の α- アミノ基が反応し、含窒素六員環を形成した構造であることを明らかにした。今後、その生理的役割について研究を行う。

Keywords: secondary metabolite, oleuropein, chemical defence

講演番号：2A31a06
講演日時、会場：3月23日10:05～ A校舎31会場

分子内エステル転移反応によるラクトン形成を触媒する新規カルボキシルエステラーゼ：チューリッポシドA変換酵素遺伝子のチューリップ花弁からの単離および機能解析

Novel lactone-forming carboxylesterase catalyzing intramolecular transesterification: Molecular identification and functional characterization of tuliposide A-converting enzyme in tulip petals

○野村 泰治、荻田 信二郎、加藤 康夫（富山県大工・生物工）
○Taiji Nomura, Shinjiro Ogita, Yasuo Kato (Dept. Biotech., Toyama Pref. Univ.)

【目的】チューリップにおける主要二次代謝産物である糖エステル「チューリッポシド類」は、チューリップ組織内のチューリッポシド変換酵素（tuliposide-converting enzyme; TCE）によってアグリコンのラクトン化体である「チューリッパリン類」へと変換される。チューリッポシド類は生理活性を有していないが、チューリッパリン類は抗菌、殺虫等の活性を示すことから、チューリッポシド類からチューリッパリン類への変換反応はチューリップの生体防御において重要な役割を担っていると考えられる。球根および花弁から精製されたチューリッポシドA変換酵素(TCEA)は異なる性状を有していたことから、チューリップには少なくとも2種類のTCEAアイソザイムが存在していることが示唆された。今回は、本酵素の分子多様性の解明の一環として、花弁からの酵素遺伝子の単離および機能解析を行った。
【方法・結果】花弁から調製したmRNAを用いて、精製酵素の部分アミノ酸配列に基づいたdegenerate-PCRおよびRACE-PCRを行うことで、*TgTCEA1*および*TgTCEA2*の2種の新規遺伝子cDNAを単離した。大腸菌で発現させた組換え酵素は天然型酵素と同様に2量体として発現しており、チューリッポシドからチューリッパリンへの定量的変換反応を触媒した。反応速度論的解析の結果、本酵素は6-チューリッポシドBよりも6-チューリッポシドAに対して高い触媒効率を示したことから、*TgTCEA*遺伝子がTCEAをコードしていることが確認された。TgTCEA1、TgTCEA2 両酵素の活性に差は認められなかった。定量RT-PCRによってチューリップ各組織における*TgTCEA*遺伝子の発現を調べたところ、*TgTCEA1*, *TgTCEA2*両遺伝子の発現レベルは同程度であり、その発現レベルは花弁において最も高かったが、球根においてのみ全く発現がみられなかった。このことから、球根では他組織とは異なる*TCEA*遺伝子が発現していることが示唆された。これは球根と花弁から精製された酵素の性状が異なることからも支持されるものである。TgTCEA酵素の一次配列は既知のカルボキシルエステラーゼと相同性を有しており、触媒残基を含む同ファミリー酵素の保存アミノ酸残基の変異によって、その活性は著しく低下した。しかしながら、TgTCEA酵素はチューリッポシドAの加水分解産物であるヒドロキシ酸を経由せずに直接ラクトン化体であるチューリッパリンAを生成することから、本酵素は典型的なカルボキシルエステラーゼが触媒する加水分解ではなく、分子内エステル転移反応によるラクトン形成を触媒する新規カルボキシルエステラーゼであることが分かった。

lactone-forming carboxylesterase, tuliposide, tulipalin

講演番号：2A31a07
講演日時、会場：3月23日10:16～ A校舎31会場

タイトル：オイゲノール及び関連物質の抗菌活性における構造活性相関の解析

Title：Analysis of structure-antimicrobial activity relationship of eugenol and its related compounds

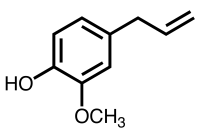
○肥塚　崇男、染谷　信孝[1]、渡辺　文太、松井　健二[2]、平竹　潤（京都大・化研、[1]農研機構・北海道農研センター、[2]山口大・院医）

○Takao Koeduka, Nobutaka Someya[1], Bunta Watanabe, Kenji Matsui[2], Jun Hiratake (Kyotodai, [1]Noukenkikou, [2]Yamaguchidai)

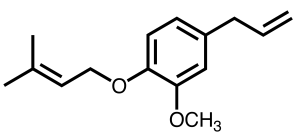
【目的】オイゲノールを含むフェニルプロペン類はバジルやクローブをはじめとするスパイスの主要香気成分であり、特徴的な香気を有するだけでなく抗菌活性や鎮静作用など多彩な生理活性を示すことから、化粧品や香料、医薬品原料として利用されている。フェニルプロペン類は、１）プロペン側鎖の立体構造、２）ベンゼン環の官能基、の２点において構造学的多様性が見られ、近年、我々のグループではフェニルプロペン類の化学構造を規定する生合成酵素を多数クローニングすることに成功している。その一方で、化学構造の違いが生理機能にどのような影響を与えるかは未だ明らかになっていない。そこで、本研究では上述のフェニルプロペン化学構造の違いが生理活性にどのように寄与しているかを明らかにすることを目的とし、オイゲノール及び関連物質の抗菌活性を調べた。

【方法】オイゲノール及び関連物質を含んだそれぞれの濾紙（ペーパーディスク）をPSA寒天平板培地に置き、これに対峙するように植物病原菌である灰色カビ病菌（*Botrytis cinerea*）の小片を置き共に培養した。濾紙の近くではフェニルプロペン類の濃度が高く、離れるほど低いという濃度勾配が形成され、灰色カビ病菌は一定の濃度以上の抗菌活性物質があると発育できないので、同心円状に広がる菌糸生育の幅に阻害が観察される。そこで、この菌糸生育幅の半径を測ることにより、フェニルプロペン類の抗菌活性を評価した。また、灰色カビ病菌の胞子とフェニルプロペン類をインキュベートした後、胞子の発芽阻害による抗菌活性の評価も行った。

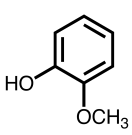
【結果】プロペン側鎖もしくはベンゼン環官能基の化学構造が異なるフェニルプロペン類について抗菌活性を比較したところ、オイゲノール、イソオイゲノール、ジヒドロオイゲノールは顕著な抗菌活性を示した。一方で、プロペン側鎖を持たないグアヤコールやベンゼン環の*p*位水酸基が修飾もしくは欠如した*O*−ジメチルアリルオイゲノールやアリルベンゼンにおいては、抗菌活性が著しく低下した。以上の結果から、フェニルプロペン類の抗菌活性にはプロペン側鎖二重結合はほとんど影響しないものの、フェニルプロペン骨格であるC_6-C_3構造およびベンゼン環*p*位水酸基が重要であることが示唆された。



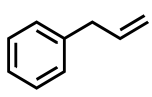
Eugenol



O-Dimethylallyl-eugenol



Guaiacol


Allylbenzene

Eugenol, Antimicrobial activity, *Botrytis cinerea*

講演番号：2A31a08
講演日時、会場：3月23日10:27～ A校舎31会場

ショウガの主要香気寄与成分シトラールの生成に関与するゲラニオール脱水素酵素遺伝子のクローニングと機能解析

Characterization of geraniol dehydrogenase involved in biosynthesis of the main potent aroma compound, citral in ginger.

○飯島　陽子、肥塚　崇男[1]、鈴木　秀幸[2]、久保田　紀久枝[3]（神奈川工科大・応用バイオ、[1]京都大・化研、[2]かずさＤＮＡ研、[3]お茶大・生活科学）
○Yoko Iijima, Takao Koeduka[1], Hideyuki Suzuki[2], Kikue Kubota[3] (Kanagawa Institute of Technology, [1]Institute for Chemical Research, Kyoto Univ,, [2]Kazusa DNA Research Institute, [3]Ochanomizu Univ.)

【目的】ショウガの香辛特性において、ショウガのさわやかな香気特性は重要である。その主要香気寄与成分は、レモン様香気を有するゲラニアールを主体としたシトラールであり、このシトラール量はショウガの成熟により増加することが知られている。しかしながら、その生成について詳細は分かっていない。我々は、シトラール生成に関与する酵素系について研究を進めているが、今回ゲラニオールからのシトラールの生成に関与するゲラニオール脱水素酵素遺伝子のクローニングと機能解析を行ったので報告する。
【方法】ショウガ根茎より粗酵素を抽出し、ゲラニオールからシトラールに変換される酵素系として、ゲラニオール酸化酵素活性、ゲラニオール脱水素酵素活性を調べたところ、ゲラニオール脱水素酵素活性がシトラール生成に関与することが分かった。そこで、ショウガのESTデータベースより根茎に特異的に発現しているアルコール脱水素酵素様遺伝子断片をスクリーニングした。そのうちの一つについて、新鮮なショウガ根茎のtotalRNAより作成したcDNAを鋳型にして、3'-RACEおよび5'-RACE法により完全長配列を取得した。pET28aに導入後、大腸菌で発現させ、タンパク誘導を行った。His-tagタンパクとして精製後、ゲラニオールを基質として酵素活性を調べ、生成物をGC-MSで確認を行った。また、基質特異性、カイネティクスなどの酵素化学的特徴を調べた。
【結果】ショウガの根茎より得たゲラニオール脱水素酵素遺伝子配列は1104bpであった。予想タンパク配列では41.7kDaの大きさであり、実際にほぼ同じサイズの可溶性タンパク質を大腸菌より得た。アミノ酸配列の相同性をBLAST検索した結果、本遺伝子は、多くのシンナミルアルコール脱水素酵素(CAD)と高い相同性を示し、特に茶葉（*Camellia sinensis*）のCADとは、72%の最も高い相同性を示した。酵素活性を調べたところ、補酵素NADPの存在下、ゲラニオールを基質とし、経時的にシトラールが生成されることを確認した。基質特異性を数種のアルコールを用いて調べたところ、ネロール、シンナミルアルコールなどとも反応したが、ゲラニオールに最も高い反応を示した。またカイネティクスの結果からも、本酵素がショウガのシトラール生成に関与すると考察した。現在、この遺伝子の発現パターンについて検討中である。

ginger, citral, geraniol dehydrogenase

講演番号：2A31a09
講演日時、会場：3月23日10:38～ A校舎31会場

レモン果皮におけるクマリン基質プレニルトランスフェラーゼの検出とcDNAクローニング

Coumarin-specific prenyltransferase: detection of enzyme activity and cDNA cloning from lemon peel

○棟方 涼介、井上 剛史[1]、肥塚 崇男[2]、佐々木 佳菜子、鶴丸 優介、杉山 暁史、宇都 義浩[3]、堀均[3]、東 順一[1]、矢崎 一史（京大・生存研 、[1]京大院・農、[2]京大・化研、[3]徳島大院・ソシオテクノ）

○Ryousuke Munakata, Tsuyoshi Inoue[1], Takao Koeduka[2], Kanako Sasaki, Yusuke Tsurumaru, Akifumi Sugiyama, Yoshihiro Uto[3], Hitoshi Hori[3], Junichi Azuma[1], Kazufumi Yazaki (RISH, Kyoto Univ., [1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]ICR, Kyoto Univ., [3]Inst. Tech. Sci., Univ. Tokushima)

【目的】ミカン科の常緑果樹レモン（*C. limon*）はプレニル側鎖を有するクマリン誘導体を外果皮に多量に蓄積している。プレニル化クマリンは一般に高い抗菌活性や捕食者に対する回避作用など様々な生理活性を有し、植物にとっての化学防御物質として働いている。また、この高い生理活性発現にプレニル側鎖の存在が鍵となっている。さらにクマリン類においてプレニル化は、フラノクマリン骨格の形成においても重要な生合成ステップを担う。したがって、プレニルトランスフェラーゼはクマリン類の基本骨格形成と多様化の両面において非常に重要な役割を果たしている。そこで、本研究ではクマリン基質プレニルトランスフェラーゼの単離及び生化学的・分子生物学的な解析を目的とし、レモン果皮のプレニルトランスフェラーゼ活性の特徴を調べ、さらにcDNAのクローニングを行った。

【方法】レモンの外果皮から粗酵素液を調製し、クマリン類を基質としてプレニルトランスフェラーゼ活性の検出を行い、その特徴を調べた。一方、植物で既知の芳香族基質プレニルトランスフェラーゼ間の保存配列を基に縮重プライマーを作成し、レモン外果皮からクマリン基質プレニルトランスフェラーゼ遺伝子*C1-PT1*のcDNAをPCRによってクローニングし、酵母発現系を用いて*C1-PT1*の機能解析を行った。

【結果】レモン外果皮のミクロソーム画分を用いクマリンを基質とする*O*-、並びに*C*-プレニルトランスフェラーゼ活性を検出した。そのうち最も高い活性が得られたベルガプトールのプレニル化反応について、至適pH、K_m値など酵素機能の解析を行った。

cDNAクローニングを行った*C1-PT1*に関しては、酵母発現系を用いた機能解析の結果、C1-PT1はウンベリフェロンのプレニル化反応を触媒する酵素であることが示された。この活性はレモン外果皮から調製した粗酵素において検出された活性の1つと一致した。

prenyltransferase, *C. limon*, coumarin

講演番号：2A31a10
講演日時、会場：3月23日10:49～ A校舎31会場

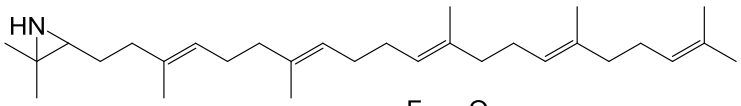
ミドリサンゴ由来β−アミリン合成酵素の酵素学的諸性質および阻害剤の検討

Insight into the β-amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli* and the enzyme inhibitors

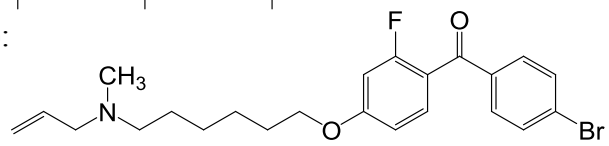
○伊藤 遼介、星野 力（新潟大院自然科学）
○Ryosuke Ito and Tsutomu Hoshino (Graduate School of Science and Technology, Niigata University)

【背景と目的】直鎖状である(3*S*)-2,3-oxidosqualene(OXSQ)を環状トリテルペン(ラノステロール、β-アミリンなど)へと変換する酵素をoxidosqualene cyclase (OSC)と総称する。OSCは真核生物の膜タンパク質であるため、酵素精製しての機能解析が困難であった。我々は農化2010年度大会にてOSCとして初めてミドリサンゴ(*Euphorbia tirucalli*)由来β-アミリン合成酵素(EtAS)の性質の一部を報告した。[1]今回はEtASの更なる酵素学的諸性質を明らかにし、加えて3種の阻害剤(2,3-iminosqualene (iminoSQ)、Ro 48-8071、U18666A)のIC_{50}、阻害様式、K_Iを決定した。iminoSQは基質のOXSQをミミックスした阻害剤であるが、これまでにIC_{50}、阻害様式、K_Iを報告した例はない。Ro 48-8071はラノステロール合成酵素[2),3)]やスクアレンーホペン環化酵素(SHC)[2)]で詳細な研究が行われてきたが、β-アミリン合成酵素での報告例はない。今回、これらの知見を報告する。

iminoSQ (**3**):



Ro 48-8071 (**4**):



U18666A (**5**):

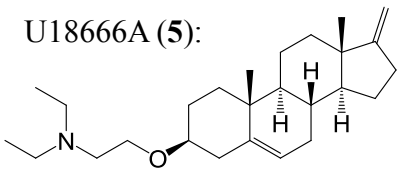


図１. iminoSQ、Ro 48-8071、U18666Aの構造

【精製酵素の調製と酵素反応】プラスミドpYES2-EtAS/CTを導入した酵母GIL77株を培養・誘導し、ガラスビーズで酵母を破砕し、酵母無細胞抽出液を得た。酵母無細胞抽出液をNi-NTAカラムに通し、EtASを精製した。精製EtASを用い、酵素反応を行ない、酵素学的諸性質(至適温度、至適pH、至適界面活性剤濃度、K_M、k_{cat}、k_{cat}/K_M)を決定した。至適条件下で阻害剤を用いた酵素反応によりIC_{50}、K_I、阻害様式を決定した。

【結果】EtAS 酵素学的諸性質は、至適温度: 30°C、至適 pH: 7.0、至適界面活性剤濃度: 0.05 % (w/v) Trition X-100、K_M: 27.6 μM、k_{cat}: 42.0 min^{-1}、k_{cat}/K_M: 1.52 μM^{-1} min^{-1} であった。各阻害剤の IC_{50}、K_I、阻害様式は次の通りであった。<iminoSQ> IC_{50}: 30.9 nM、K_I: 16.9 nM、拮抗阻害、<Ro 48-8071> IC_{50}: 10.7 nM、K_I: 7.0 nM、混合型阻害、<U18666A> IC_{50}: 141.8 nM、K_I: 128.3 nM、非拮抗阻害。阻害活性の強さは、Ro 48-8071> iminoSQ> U18666A であった。また、K_M^{OXSQ}: 27.6 μM と比較して、いずれの阻害剤の K_I も非常に低い値を示したことから、EtAS との親和性は OXSQ よりも非常に高く、強力な阻害剤であることがわかった。

【文献】1) *農化2010年度大会講演要旨集*, p.263. 2) *Biochemistry*, **1998**, 37, 5779-5784. 3) *Nature*, **2004**, 432, 118-122.

β-amyrin, triterpene, inhibitor

講演番号：2A31a11
講演日時、会場：3月23日11:10～ A校舎31会場

ヤマノイモ属トゲドコロにおけるプロトジオシンを加水分解するβ-グルコシダーゼの解析

Isolation and characterization of furostanol 26-O-glucoside β-glucosidase involved in hydrolysis of protodioscin from *Dioscorea. esculenta*

○中安大、川崎崇、山村理恵[1]、遠城道雄[2]、杉本幸裕、水谷正治
（神戸大院・農、[1]神戸大・農、[2]鹿児島大・農）
○Masaru Nakayasu, Takashi Kawasaki[1], Rie Yamamura, Michio Onnjo, Yukihiro Sugimoto, Masaharu Mizutani(Grad. School Agric. Sci., Kobe Univ., Kobe Univ.[1], Kagoshima Univ.[2])

【目的】ステロイドに糖が結合したステロイドサポニンは、様々な生物活性を持つ天然の界面活性剤である。ステロイドサポニンは、ヤマノイモ科、ユリ科などの単子葉植物に含まれることが多い。特に、ヤマノイモ属（*Dioscorea*）は、医薬ステロイドの合成原料として重要なジオシンを多量に蓄積している。ジオシンは6環からなるスピロスタン構造をもつステロイドをアグリコンとする有用サポニンである。また、その生合成中間体として、ジオシンのF環が開環したフロスタンのC-26位水酸基にグルコースが結合したプロトジオシンも見いだされる。これらのステロイドサポニンはコレステロールを出発物質として、酸化と配糖化といった連続的な修飾により生合成されると推定されている(Fig.1)。C-16、C-22、C-26位の酸化反応はP450が、また、C-3とC-26位への糖転移反応はUDP依存性糖転移酵素が、プロトジオシンのC-26位グルコシド結合の加水分解反応はβ-グルコシダーゼが、それぞれ関与することが示唆されているが、現時点では全く不明である。そこで、ヤマノイモ属におけるステロイドサポニンの生合成を研究するため、我々は、ジオシン含量が高いことが知られている沖縄原産のトゲドコロ（*D. esculenta*）からステロイドサポニン生合成酵素遺伝子の探索を行なった。また比較対象として、中央アフリカ原産のイエローギニアヤム（*D. cayenensis*）、および日本産のダイショ（*D. alata*）、ジネンジョ（*D. japonica*）、ナガイモ（*D. batatas*）を用いた。

【結果】上記５種のヤマノイモ属の塊根抽出物をLC-MSで分析した結果、トゲドコロとイエローギニアヤムにおいてジオシンおよびプロトジオシンが顕著に検出されたのに対して、日本産のダイショ、ジネンジョ、ナガイモではほとんど検出されなかった。次に、トゲドコロとイエローギニアヤム、ダイショの塊根においてトランスクリプトームの比較解析を行なった。EST解析の結果を基にして、フロスタノール 26-O-グルコシドであるプロトジオシンを加水分解してジオシンを生成するβ-グルコシダーゼの選定を行ったところ、3種の全長cDNAの配列を決定した。現在、in vitroでの酵素解析を行っている。

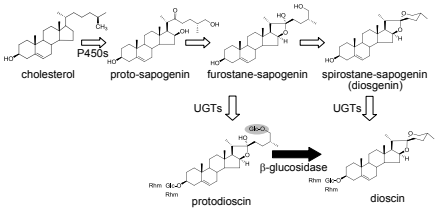


Fig.1.dioscinの推定生合成経路

β-glucosidase, steroid saponin, *Dioscorea spp.*

講演番号：2A31a12
講演日時、会場：3月23日11:21～ A校舎31会場

コムギにおけるベンゾキサジノン発現への植物ホルモンの影響

Influence of phytohormones on benzoxazinone expression in wheat

○須恵　雅之、中村　ちひろ、仲下　英雄（東農大、生物応用化学）
○Masayuki Sue, Chihiro Nakamura, Hideo Nakashita (Tokyo Univ. Agr.)

【目的】

コムギ、ライムギ、トウモロコシなどのイネ科植物には、耐病性化合物として環状ヒドロキサム酸であるベンゾキサジノン類 (Bx) が知られている。コムギおよびトウモロコシに発現している主なBxとしてはDIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one) があり、通常の健全な植物体内ではグルコース配糖体 (DIMBOA-Glc) として液胞内に貯蔵されている。Bx類は、アブラムシやアワノメイガに対する咬害忌避活性や種々の糸状菌に対する生育阻害活性に加え、アレロパシー活性も有する化合物である。

Bx配糖体 (BxGlc) の発現は、一般的に、傷害や感染とは無関係に植物体内で構成的に発現しているとされ、特に発芽後間もない幼植物内に高濃度で蓄積されている。この濃度は植物の生育とともに減少していくため、Bxは特に植物生育段階初期の防御に深く関与しているものと考えられている。近年、病害抵抗反応に関与する植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) 投与や病原菌の接種により、DIMBOA-Glcの7-*O*-メチル体であるHDMBOA-Glcが増加することが報告されるなど、Bx類の誘導的発現の可能性が示されている。しかし、発芽直後の植物に対する影響については不明であるだけでなく、この時期の植物におけるBx高濃度発現の機構についても全くわかっていない。そこで本研究では、コムギの生育初期におけるBx-Glcの一過的発現が植物ホルモンによりどのような影響を受けるかについて検討することにした。

【方法および結果】

植物のストレス耐性において、JA、ABA、エチレン、そしてサリチル酸などの化合物が関与していることが知られている。そこで、これら化合物を含む寒天培地にコムギを播種し、72時間後の植物地上部を凍結・破砕、メタノール抽出を行い、HPLCによりBx類の定量を行った。その結果、JA 5 μMにおいてDIMBOA-Glcの発現が顕著に増大していた一方で、HDMBOAの発現量はDIMBOA-Glcの数%に過ぎないことが示された。これに対し、サリチル酸とアミノシクロプロパンカルボン酸はDIMBOA-Glcの発現を抑制する傾向にあることが示された。JAの影響を経時的に調べたところ、48時間後ではJA添加区と非添加区間で有意な差は認められなかったものの、植物が生育するに従ってJAによるDIMBOA-Glc量の上昇は顕著となっていった。

BxGlcはインドールグリセロールリン酸を出発物質して、数段階の反応により生合成されている。JAをはじめとする植物ホルモンが生合成にどのような影響を及ぼしているかを明らかにするため、コムギBxGlc生合成遺伝子の発現量を解析中である。

Benzoxazinone, wheat, phytohormone

講演番号：2A31a13
講演日時、会場：3月23日11:32～ A校舎31会場

２つの転写因子によるニコチン生合成制御

Two transcription factors regulating nicotine biosynthesis in tobacco

○庄司翼、橋本隆（奈良先端大・バイオ）
○Tsubasa Shoji, Takashi Hashimioto (NAIST)

In Arabidopsis, the MYC2-family basic helix-loop-helix transcription factors mediate transcriptional regulation of jasmonate-responsive genes, and their transcriptional activities are suppressed by physical interactions with jasmonate-ZIM domain (JAZ) proteins. Jasmonate-inducible nicotine formation in *Nicotiana* plants has been shown to be suppressed by tobacco JAZ proteins, and be regulated by both MYC2-related and *NIC2*-locus ethylene response factor (ERF) transcription factors. We here show that tobacco MYC2 (NtMYC2) recognizes the G-box sequences, 5'-CAC(G/A)T(G/T)-3', found in the proximal promoter regions of several nicotine biosynthesis genes, including *Putrescine N-Methyltransferase 2* (*PMT2*) and *Quinolinate Phosphoribosyltransferase 2* (*QPT2*). Transient transactivation assays using cultured tobacco cells showed that *NtMYC2* and *NIC2*-locus *ERF189* additively activated the *PMT2* and *QPT2* promoters depending on their cognate binding sites. RNA interference (RNAi) silencing of *NtMYC2* in tobacco hairy roots strongly decreased transcript levels of jasmonate-responsive structural genes, including those involved in nicotine biosynthesis, as well as the *NIC2*-locus *ERF* genes. Conversely, *ERF189* was not required for the expression of *NtMYC2*. NtMYC2, but not ERF189, interacted with tobacoo JAZs in a yeast two-hybrid assay. These results indicate that NtMYC2 controls nicotine biosynthesis genes in two combinatorial ways, by directly binding the G-box in the target promoters and by up-regulating the *NIC2*-locus *ERF* genes

nicotine, tobacco, transcription factor

講演番号:2A31a14
講演日時、会場:3月23日11:43～ A校舎31会場

イソキノリンアルカロイド生合成系の発現制御に関わるbHLH型転写因子

A basic helix-loop-helix transcription factor involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis

○山田 泰之、古株 靖久、島田 友恵、小山 知嗣、佐藤 文彦（京大院・生命科学）
○Yasuyuki Yamada, Yasuhisa Kokabu, Tomoe Shimada, Tomotsugu Koyama, Fumihiko Sato (Grad. Sch. of Biost., Kyoto Univ.)

【目的】高等植物が生産する多様なアルカロイドはその強い生理活性から医薬品等の成分としての利用価値が高いと注目されてきたが、生産する植物種が限定されているために、一般的に植物が生産するフェニルプロパノイドと比べて生合成系、さらにはその発現制御に関する研究が進んでいるものは限られる。我々は、キンポウゲ科のオウレン(*Coptis japonica*)が生産するイソキノリンアルカロイド、ベルベリンの生合成系をモデルに研究を進め、オウレンプロトプラストを用いた一過的RNAiスクリーニングにより同生合成系を制御するbHLH型転写因子、*CjbHLH1*遺伝子を単離した。*CjbHLH1*の発現を抑制すると、全てのベルベリン生合成酵素遺伝子の発現が抑制されたことから、CjbHLH1はベルベリン生合成系の転写活性化因子として機能していることが考えられた。本研究では、CjbHLH1の制御機構の解明、さらにはCjbHLH1を起点としたベルベリン生合成系の転写因子ネットワークの解明を目的とし、CjbHLH1の機能解析を行った。
【方法・結果】35Sプロモーターの下流に*CjbHLH1*を組み込んだ過剰発現コンストラクトをオウレンプロトプラストに一過的に導入し、各ベルベリン生合成酵素遺伝子の発現量をRealtime PCRにより解析した。過剰発現コンストラクト導入後6時間での解析の結果、各ベルベリン生合成酵素遺伝子の発現量はわずかだが有意に上昇していた。また、ベルベリン生合成酵素遺伝子プロモーターの下流に*Luciferase*遺伝子を組み込んだコンストラクトを用いた一過的ルシフェラーゼアッセイや、CjbHLH1特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行った結果、CjbHLH1が直接ベルベリン生合成酵素遺伝子プロモーター配列に結合し、転写を誘導していることが示唆された[1]。さらに、アルカロイド生合成を誘導するメチルジャスモン酸（MeJA）に対する応答性を、ベルベリン低生産性の培養細胞を用いて解析した結果、*CjbHLH1*の発現量は生合成酵素遺伝子のものと同様に、MeJA処理後1時間で一過的に上昇していた[2]。以上の結果からCjbHLH1は、一過的RNAiの結果から予想された通りベルベリン生合成系の転写活性化因子として機能していると考えられた。また、最近報告されたタバコのニコチン生合成系やニチニチソウのインドールアルカロイド生合成系のシロイヌナズナMYC2ホモログであるbHLH型転写因子との相違点についても合わせて報告する。

[1] Yamada Y et al., *Plant Cell Physiol.*, 52, 1131-1141 (2011)
[2] Yamada Y et al., *Plant Signal. Behav.*, in press (2011)

basic helix-loop-helix, isoquinoline alkaloid, jasmonate

講演番号:2A31a15
講演日時、会場:3月23日11:54～ A校舎31会場

形質転換ハナビシソウ細胞を用いたオウレンTHBOの機能解析

Functional analysis of *Coptis japonica* THBO in transgenic California poppy cells

○松島 康高、南 博道[1]、竹村 知也、佐藤 文彦(京大生命・統合生命、[1]石川県大・資源研)
○Yasutaka Matsushima、Hiromichi Minami[1]、Tomoya Takemura、Fumihiko Sato(Kyoto Univ, [1]Ishikawa Pref Univ)

【目的】イソキノリンアルカロイドの一種ベルベリンは健胃薬として局方に収録されている医薬品である。キンポウゲ科のオウレン(*Coptis japonica*)培養細胞系を用いた研究により、そのほぼ全ての生合成酵素遺伝子が単離、同定されている。ベルベリン生合成系の最終段階である(*S*)-tetrahydroberberine((*S*)-THB)からberberineへの酸化反応を触媒する(*S*)-THB oxidase((*S*)-THBO)についても、精製したTHBOの部分配列をもとにその候補配列がオウレンESTライブラリーより単離されている(AB564543)。しかし、同cDNAを大腸菌等で発現させる試みはいずれも困難であり、わずかにイソキノリンアルカロイド生合成系を有するハナビシソウ(*Eschscholtzia californica*)における遺伝子導入によりTHBO活性の増大を確認するのみであった(南未発表データ)。本研究では、新たにオウレンTHBOを発現導入したハナビシソウ培養細胞を用いたTHBO機能解析について報告する。
【方法】オウレンTHBOcDNAをカリフラワーモザイクウィルス35Sプロモーターに接続したpGWB2:THBOを含むアグロバクテリウムをハナビシソウ切片に感染させ、形質転換細胞を選抜培養した。抗生物質を含む培地にて安定して増殖する細胞株を選び、液体培地にて連続的に選抜培養した。安定して生育する細胞株よりゲノムDNAを抽出し、オウレンTHBO遺伝子の導入を確認した。THBO遺伝子の導入が確認できた細胞株からtotal RNAを抽出し、THBO遺伝子の発現を検出した。THBO遺伝子の発現が確認できた細胞株を材料に細胞ならびに培地中のアルカロイドをLC-MS解析した。
【結果】*Cj*THBO発現ベクターが導入された形質転換細胞19株から*Cj*THBO遺伝子を発現する細胞株17株を選抜した。これら*Cj*THBO発現細胞株と形質転換コントロール株からアルカロイドを抽出し分析した。その結果、THBO発現株全てにおいてcoptisineやdehydrocheilanthifolineなどの野生型のハナビシソウ培養細胞では検出されない化合物の蓄積を確認した。これらのcoptisineとdehydrocheilanthifolineはそれぞれハナビシソウのイソキノリンアルカロイド生合成経路内における中間代謝物であるstylopineとcheilanthifolineの酸化反応により生成しうること、またその蓄積はTHBO発現細胞株においてのみ認められたことより、形質転換細胞中で発現したTHBOにより、これらの化合物が生成したと考えられた。現在、THBO遺伝子の発現とcoptisine等のアルカロイド蓄積との相関性についてより詳細に解析を進めている。

(*S*)-tetrahydroberberine oxidase、coptisine、dehydrocheilanthifoline

講演番号：2A31p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ A校舎31会場

ハツカダイコンβ－アミラーゼを高発現させたシロイヌナズナの表現型に関する研究

Studies on phenotypes of *Arabidopsis* plant overexpressing the radish β-amylase

○高橋郁夫、原　正和（静岡大・農）
○Ikuo Takahashi, Masakazu Hara (Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

【目的】　β－アミラーゼは、デンプンの非還元末端からマルトースを生成する加水分解酵素である。近年、プラスチド型β－アミラーゼが、シロイヌナズナのデンプン分解に関与することが証明された。一方、いくつかの植物種において、幼植物や、成熟植物の光合成器官および貯蔵器官に、高いβ－アミラーゼ活性が検出されている。こうしたβ－アミラーゼは、プラスチド外に存在することから、非プラスチド型β－アミラーゼと呼ばれ、植物体内でのデンプン分解に直接関与しないと考えられてきた。しかし、演者らは、ハツカダイコンの胚軸が肥大する際に、非プラスチド型β－アミラーゼRsBAMY1の発現が高まることを見出だした。この肥大過程では、新鮮重量の急増に伴って、デンプン含量が減少し、単糖含量が増加する。このことから演者らは、ハツカダイコンにおけるデンプンの代謝への、非プラスチド型β－アミラーゼの関与を推察している。本研究は、ハツカダイコンにおけるRsBAMY1の役割を解明する目的で、RsBAMY1を過剰発現させたシロイヌナズナを用いて、デンプンや少単糖および有機酸の含量と植物体の成長について解析をおこなったものである。

【結果と考察】　高いRsBAMY1活性を有する植物を得るため、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターで RsBAMY1を発現させ、β－アミラーゼ活性を100倍以上に高めたシロイヌナズナ植物体を作出した。3週齢のシロイヌナズナ高発現株のロゼット葉の新鮮重量は、野生株に比して、約1.2倍に増加した。また、高発現株ではロゼット葉面積の拡大がみられた。これに加え、高発現株の花茎から発生する側枝数が、野生株のそれに比べて1ないし2本増加した。一方、新鮮重量当たりのデンプン含量は8割程度へと有意に減少したが、少単糖含量に差異はみられなかった。また、クエン酸回路に関わる有機酸（ピルビン酸、クエン酸、フマル酸、リンゴ酸）含量は、減少する傾向にあったが、アスコルビン酸含量は野生株に比べて、高発現株で有意に増加した。RsBAMY1高発現株でみられる、こうした成長および代謝の変化は、ハツカダイコンの肥大時にみられる変化と概ね類似している。

以上の結果、ハツカダイコンの胚軸では、RsBAMY1が何らかのメカニズムによって糖質および有機酸の代謝に影響を、肥大を促進している可能性が考えられる。

β-amylase, radish, starch

講演番号:2A31p03
講演日時、会場:3月23日14:11～ A校舎31会場

保存によるカットキャベツ成分の変化と鮮度保持フィルムの効果

Effects of freshness-keeping package on metabolomic changes of cut cabbage in storage

○阿部　香織[1]、中尾　悟[2]、冨田　勝[1]、曽我　朋義[1]、及川　彰[1、3]（[1]慶應大・IAB、[2]住友ベークライト株式会社、[3]理研PSC(鶴岡)）

○Kaori Abe[1], Satoru Nakao[2], Masaru Tomita[1], Tomoyoshi Soga[1], Akira Oikawa[1、3] ([1]Keio University IAB, [2]SUMITOMO Bakelite Co.Ltd, [3]RIKEN Plant Science Center(Tsuruoka))

【目的】採れたての生鮮野菜は味覚に優れ栄養価も高いが、時間が経過するにつれて味覚や色に変化が現れやすい。そのため、特に鮮度低下の早い野菜は、鮮度保持フィルムを使用した袋に入れられて店舗等に陳列されている。鮮度の低下は、野菜に含まれる様々な化合物の成分量が変動したことに起因している。しかしながら、保存中の生鮮野菜の代謝変動や、鮮度保持フィルムの代謝に与える影響について網羅的に調べられた例はほとんどない。そこで、保存中の生鮮野菜(カットキャベツ)の成分変化を、メタボローム解析技術を用いて明らかにすることを目的とした。

【方法】市販されているキャベツを千切りにし、ジッパー付のポリプロピレン袋で5日間、10℃にて保存した。保存の前後においてサンプリングしたキャベツは凍結乾燥後に粉末化し、メタノールで抽出した後、キャピラリー電気泳動質量分析装置(CE-MS)を用いたメタボローム解析に供した。さらに匂い成分を分析するため、キャベツを千切りにした直後から1日毎に5日間サンプリングし、SPME（固相マイクロ抽出）法により吸着させた揮発性成分をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC/MS)を用いて分析した。

【結果】CE-MSを用いたメタボローム解析により、グルタミンやアスパラギン酸などのアミノ酸やリンゴ酸やクエン酸などの有機酸に加え、アミン類や糖リン酸、ヌクレオチド類などのイオン性化合物が約150種類検出された。検出されたイオン性化合物の多くは、5日間の保存でも大きな量の変化を示さなかったが、アラニンやクエン酸などいくつかの代謝物量で2倍以上の増減が認められた。また、GC/MSを用いた揮発性成分の分析では、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide、hexanalが主要なピークとして検出され、現在保存によるこれらの濃度変動について検討中である。さらに、鮮度保持フィルム(P-プラス、住友ベークライト)、ポリプロピレン袋(OPP)、4か所にパンチ穴を空けたOPPで保存したカットキャベツの成分変化について、今後分析を行う予定である。

freshness-keeping package, cabbage, metabolomic

講演番号：2A31p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ A校舎31会場

ヒヤシンス・プロテアーゼインヒビター前駆体プロセシング酵素の性質

Characterization of a processing enzyme that cleaves the precursor protein for hyacinth protease inhibitors

◯塩井成留実，渡邉美翔，高島由花，寺田成之(福大・理)
◯Narumi Shioi, Mika Watanabe, Yuka Takashima, Shigeyuki Terada (Fukuoka Univ.)

【目的】ヒヤシンス球根には十数種のトリプシンインヒビター（LHTI）が存在する。これらのLHTIはtrypsinだけでなく，chymotrypsinやelastaseを阻害するものもある。cDNAクローニングから，LHTIをコードする遺伝子は成熟タンパク質にはない配列（linker配列）を隔てて複数のLHTIが数珠つなぎにコードされていた。個々の成熟型インヒビターはその前駆体の限定分解によって生じると思われる。今回，ヒヤシンス球根抽出物中にlinker配列を切断する酵素（linker processing enzyme, LPEと略）を見出し，その性質を調べるとともに，球根中のtrypsin阻害活性の年間変動を調べた。
【方法】ヒヤシンス球根抽出物の調製とプロテアーゼ活性の測定：発芽中のヒヤシンス球根を芽と鱗茎にわけて抽出物を得た。ゲルろ過はProtein PAK300カラムを用いて行った。プロテアーゼ活性は，基質としてFTC-caseinを用いて調べた。LHTIのlinker配列切断反応の測定：LHTI-X1（Thioredoxin-S-His tagとlinker配列DGHRAAVGLPASRSDAEVAVがついたcDNAクローンを大腸菌で発現させたもの）と芽抽出物を37℃でインキュベート後，SDS-PAGEで基質の分解を調べた。また，反応液を逆相HPLCにかけて得られたピークのアミノ酸配列を解析し，切断箇所を同定した。
【結果】発芽中のヒヤシンス球根から芽と鱗茎の抽出物を得た。trypsin阻害活性の大半は鱗茎抽出物に見られ，その活性は春の発芽の時期に急激に減少し，秋から冬にかけて増加した。一方，プロテアーゼ活性は専ら芽抽出物に見られ，その最適pHは5.5であった。LPEは大腸菌で発現させたlinker付きのLHTI（X1）に芽抽出物を作用させると経時的にX1は分解され，芽抽出物にLPEが存在することがわかった。LPEはlinker配列のGluとValの間を切断した。X1分解活性の最適pHは約4であった。芽抽出物をゲルろ過で分けると，分子量30,000前後にLPEが溶出されたが，この分画にはFTC-caseinやある種の蛍光性ペプチド基質を分解する活性も見られた。これらの基質の分解やX1の分解はpepstatinやPCMBで阻害されたが，EDTA，DFP，NEMなどでは阻害されなかった。以上の結果から，LHTI前駆体の分解にはある種のアスパラギン酸プロテアーゼやシステインプロテアーゼが関与すると考えられる。

1210　生体高分子―タンパク質
1760　タンパク質、酵素−機能、調節

hyacinth bulbs, protease inhibitors, processing enzyme

講演番号：2A31p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ A校舎31会場

センブリの組織培養とその培養物成分

Plant tissue culture of *Swertia japonica* and their constituents

○川上寛子、野下浩二、原光ニ郎、小峰正史、山本好和（秋田県大院・生物資源）
○Hiroko Kawakami, Koji Noge, Kojiro Hara, Masashi Komine, Yoshikazu Yamamoto (Akitakendaiinn)

【目的】センブリ（*Swertia japonica*）は日本固有の民間薬として利用されている。健胃効果（Yamahara *et al.* 1978）や、育毛効果（Kubo *et al.* 1988）が知られ、市販の医薬品や育毛剤にもエキスが用いられている。また、コリン作用阻害活性や抗酸化活性、変異原性阻害活性についての報告もされ、医薬資源として期待される。主成分には secoiridoid類の swertiamarin、gentiopicroside、その他に、xanthone類、flavonoid類が知られている。現在までに、Agrobacteriumを感染させた毛状根培養による物質生産について報告されている（Ishimaru *et al.* 1990）が、主成分であるswertiamarinの産生は確認されていない。本研究では、センブリに含まれる薬理活性成分を効率的に生産できる培養系の確立を目的に、液体培養の条件検討を行った。さらに、培養物を成分分析し、secoiridoid類に着目して物質生産性を評価した。

【方法】まず、基本培地に Woody Plant（WP）培地、植物ホルモンに10^{-5} M naphthylacetic acid (NAA)と10^{-6} M kinetin（KIN）、材料に seedling を用い、カルスを誘導した。培養物は固体培地に植え付け、4週間隔で植え換え、25 ℃、明所のクリーンルーム内で管理した。次に、固体培地で維持している培養物を液体培養した。液体培養には、基本培地に WP 培地、糖源に sucrose、植物ホルモンに NAA と KIN を用い、基本培地濃度、糖濃度、植物ホルモン濃度、光環境をそれぞれ試験区をもうけ、細胞増殖率と産生される成分を比較した。培養物を植え付け、25℃のクリーンルーム内で110 rpmで振盪培養し、培養期間を5週間とした。得られた培養物の成分をPDA-HPLC と LC-MS/MS を用いて分析した。

【結果】液体培養には基本培地に1/8 濃度の WP 培地、3 %～1.5 % sucrose、を用いる条件が適切であることがわかった。また、植物ホルモン条件について、NAA と KIN ともに低濃度の条件で不定根が顕著に再分化することがわかった。さらに、明条件では不定根の再分化が観察されたが、暗条件では不定根が再分化せず、カルスのみが増殖した。

液体培養で得られたカルスと不定根の成分を PDA-HPLC とLC-MS/MSで分析した結果、不定根にsecoiridoid類の swertiamarin とgentiopicroside を検出した。また、カルスと不定根は天然物には含まれない成分を少なくとも4種含有することがわかった。今後、培養物に含まれる化合物の構造解析を行う。

plant tissue culture, medicinal plants, secondary metabolites

講演番号：2A31p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ A校舎31会場

桑葉に含まれるα-グルコシダーゼ阻害物資の多様性

Variety of α-glucosidase inhibitors in Mulberry leaves

○中西 弘充、大久保 薫[1]、小西 哉、金勝 廉介[1]（信州大・SVBL、[1]信州大・繊維）
○Hiromitsu Nakanishi, Kaoru Ookubo, Hajime Konishi, Rensuke Kanekatsu (Shinshu Univ. [1]SVBL, Shinshu Univ.)

【目的】　桑葉には1-deoxynojirymicin（1-DNJ)に代表される、イミノ糖と称される糖類似物質が豊富に含まれている。1-DNJにはα-グルコシダーゼ阻害効果があり、機能性食品などの分野への応用が期待されている。我々はこれまでに、多くの品種の桑葉抽出液のα-グルコシダーゼ阻害活性および1-DNJ含量を調べており、品種によっては1-DNJだけでは説明できない強い阻害力価を示すことを見出した。その要因として1,4- dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol（D-AB1)という別のイミノ糖の影響が考えられた。しかし、桑品種ごとの阻害物質の組成は詳細に調べられていない。そこで我々は、桑をイミノ糖の組成によって分類することができないかと考えた。本研究では、桑に含まれるイミノ糖のうち1-DNJとD-AB1について、国産品種とタイ在来品種における組成を定量的に求め、桑品種におけるイミノ糖の組成の多様性を検証した。

【方法】　桑葉は、信州大学繊維学部附属農場で露地栽培している国産品種のヤマグワ・カラヤマグワ・ログワから各数品種と、温室栽培しているタイ在来品種のシャムグワから数品種を採取した。α-グルコシダーゼ阻害活性の評価は、酵素に酵母およびラット消化管由来のα-グルコシダーゼ、基質にp-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside（pNPG)を用いた。桑葉に含まれる1-DNJとD-AB1の定量には、親水性相互作用クロマトグラフィーを用いたLC-MSを行った。

【結果】　酵素と阻害物質の特異性を調べるため、酵母由来とラット消化管由来のα-グルコシダーゼ、および、標準品の1-DNJとD-AB1をそれぞれ組み合わせた4通りのα-グルコシダーゼ阻害活性を比較した。その結果、酵母由来のα-グルコシダーゼはD-AB1に強く阻害され、ラット由来のα-グルコシダーゼは1-DNJに強く阻害された。桑葉抽出液においても酵母由来とラット由来の酵素で異なる阻害活性が見られた。そこで、LC-MSにより1-DNJおよびD-AB1の定量を行ったところ、酵母由来のα-グルコシダーゼ阻害活性にはD-AB1量が大きく影響することが分かった。また、ラット由来のα-グルコシダーゼ阻害活性には1-DNJが大きく影響するものの、他の物質の関与の可能性が示唆された。さらに、国産品種とタイ在来品種でα-グルコシダーゼ阻害活性を比較すると、タイ在来品種の方がより強い阻害活性を示すことが分かった。これらの結果は桑が植生する風土や、それに伴う食害虫の多様性が影響するものと考えられる。

α-glucosidase inhibitor, 1-deoxynojirimycin, mulberry

講演番号：2A31p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ A校舎31会場

イソプレノイド生産性シアノバクテリアの創出

Creation of isoprenoid productive cyanobacteria

○清田 浩史[1,2]、伊藤 美千穂[4]、平井 優美[2,3]、池内 昌彦[1]（[1]東京大・理、[2]理研PSC、[3]CREST、[4]京都大・薬）

○Hiroshi Kiyota[1,2], Michiho Ito[4], Masami Hirai[2,3], Masahiko Ikeuchi[1]（[1]Tokyo Univ., [2]RIKEN, [3]CREST, [4]Kyoto Univ.）

【目的】

イソプレノイドはC_5のイソプレン単位からなる物質群であり、香料・医薬品原料・燃料・材料などの幅広い目的に用いられている。工業的には、一部のものは化学合成されたものが使われているが、多くは植物の精油など生物由来のものが使われている。高い光合成能力を持つシアノバクテリアを用いて二酸化炭素から光合成的に直接イソプレノイドを生産できれば、植物を用いて生産するよりも効率的である。シアノバクテリアはC_{40}イソプレノイドのカロテノイド類を生合成するが、C_{20}以下の小さなイソプレノイドはほとんど合成しない。そこで、イソプレノイド生産シアノバクテリアのモデルとするため、モノテルペンを合成するシアノバクテリアを作製した。

【方法】

高等植物から単離されたモノテルペン合成酵素を*Synechocystis* sp. PCC6803に導入し、光独立栄養、または混合栄養条件によって培養を行った。細胞内、培地、及び気相中に含まれるモノテルペンの量を調べることで合成能力を評価した。

【結果】

細胞中での目的物の産生を確認した。培養条件の違いによる生産量の変化や、いくつかの代謝経路について欠失や過剰発現などの代謝改変を行った結果についても検討し、報告を行う予定である。

cyanobacteria, metabolic engineering, isoprenoid

講演番号：2A31p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ A校舎31会場

Metabolic pathway engineering in cyanobacteria *Synechocystis* sp.PCC 6803 for the production of lactate

○Ancy Joseph, Shimpei Aikawa, Tomohisa Hasunuma[1], Fumio Matsuda[1], Akihiko Kondo（Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., [1]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ.）

Lactate has its applications in food, pharmaceutical, cosmetics and in bioplastic production. When using other microorganisms such as *E coli* or any lactic acid bacteria additional carbon source is required. Cyanobacteria possess several advantages as organisms for bioindustrial processes. It can utilize carbondioxide and sunlight. *Synechocystis* sp. PCC 6803 is one of the most highly studied cyanobacteria as it can grow both autotrophically or heterotrophically and the whole genome sequence data and various gene modification techniques have recently became available. Commonly used metabolic engineering organisms, such as *E.coli* and yeast (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*), express a variety of transport systems for exporting waste products as well as importing nutrients. As photoautotroph's *Synechocystis* sp.PCC 6803 lack lactate dehydrogenase and relevant transporters to move it across membranes.

Based on earlier research on lactic acid production using different microorganisms four lactic acid bacteria namely *Lactococcus lactis, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus* was found to be more efficient in the production of L-lactate. To synthesize this compound, Lactate dehydrogenase gene (LDH) and a lactate transporter (lldp) was cloned into PCC 6803 using pTCP 2031V vector and these mutants were grown in BG 11 medium at 30ºC temperature with continuous light of 50 µmol photons m^{-2} $s^{-1}$and at 100 rpm. Later the samples were collected and expression of this genes were checked by real time PCR and lactate production was measured using HPLC.

Expressions of these genes lead to the production of around 2.75 to 26.5 mg/l of lactate in genetically engineered PCC 6803 without affecting the growth. The expression of LDH gene was co-related with lactate production. Higher production of lactate was found to be in the mutant PCC 6803 with LDH gene from *Lactobacillus plantarum.* Further improvement in the growth conditions and in metabolic pathway will help in production of more lactate.

Keyword1, Keyword2, Keyword3

講演番号：2A31p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ A校舎31会場

シアノバクテリア*Arthrospira platensis*を炭素源としたアミラーゼ発現酵母による直接エタノール生産

Direct ethanol production from cyanobacterium *Arthrospira platensis* by amylase expressing yeast

○藍川 晋平、和泉 自泰、山田 亮祐[1]、松田 史生[1]、蓮沼 誠久[1]、近藤 昭彦（神大院・工、[1]神大・自科）

○Shimpei Aikawa, Yoshihiro Izumi, Ryosuke Yamada[1], Fumio Matsuda[1], Tomohisa Hasunuma[1], Akihiko Kondo（Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., [1]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ.）

【目的】シアノバクテリアは光合成産物として細胞内にグリコーゲンを蓄積する．シアノバクテリア由来のグリコーゲンは微生物発酵によりエタノールなどの液体燃料に変換可能であるため，バイオマス資源として有用である．シアノバクテリアの中でも*Arthrospira*（*Spirulina*） *platensis*はグリコーゲン含有率が高く，バイオマス生産量も高いことから，グリコーゲンの供給源として期待できる．しかしながら，我々が知る限りシアノバクテリアを微生物発酵の炭素源として利用した前例はなく，*A. platensis*のグリコーゲン生産能，炭素源としての有用性は明らかではない．そこで本研究では*A. platensis*のグリコーゲン生産能および物質生産の炭素源としての有用性を酵母によるエタノール生産を通して調べた．

【方法】*A. platensis*のグリコーゲン生産量を向上させるためにSOT培地中，30°C，24時間明期条件下で培養光強度を20, 50, 100, 270, 700 µmol photons m^{-2} s^{-1}，硝酸塩投与量を0, 1, 3, 30 mMと変え，グリコーゲン生産に最適な培養条件を調べた．そして*Streptococcus bovis*由来のαアミラーゼ，*Rhizopus oryzae*由来のグルコアミラーゼを発現させた*Saccharomyces cerevisiae* MNIVΔGS株を用いて，微好気条件で*A. platensis*を炭素源としたエタノール生産を行った．

【結果】培養光強度を700 µmol photons m^{-2} s^{-1}，硝酸塩投与量を3 mMに調整したことで，*A. platensis*のバイオマス生産量が1.6 g/L，グリコーゲン含有率が60%と共に増加し，四日間のグリコーゲン生産量が1 g/Lに向上した．これまで報告されている真核微細藻のデンプン生産量およびシアノバクテリアのグリコーゲン生産量よりも高く，*A. platensis*のグリコーゲン生産能が高いことが明らかになった．そしてアミラーゼを発現させた*Saccharomyces cerevisiae* MNIVΔGS株によって，乾燥重量あたり56%のグリコーゲンを含む20 g dry cell weight/L の*A. platensis*から2 g/Lのエタノールが生産された．*A. platensis*が微生物発酵の炭素源として利用できる事が示された．*A. platensis*を炭素源とした場合のエタノール生産量を向上させるために，前処理法の検討を加え，より効率的に*A. platensis*を微生物発酵のための炭素源として利用できるようしたい．

Bioethanol, Glycogen, Cyanobacterium

講演番号：2A31p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ A校舎31会場

プロスタグランジンの生物生産 - 形質転換ゼニゴケを用いて

Bioproduction of prostaglandins using the transgenic liverwort, *Marchantia polymorpha* L.

○竹村美保、金本浩介、長屋進吾、大山莞爾（石川県立大・資源研）
○Miho Takemura, Hirosuke Kanamoto, Shingo Nagaya, Kanji Ohyama (Ishikawa Prefectural Univ.)

【目的】遺伝子工学的手法を用いた、プロスタグランジンの生物生産の画期的な報告をする。プロスタグランジン(PG)はアラキドン酸から合成される動物の重要な生理活性物質で、医薬品や研究用試薬として需要が高い。現在のところ、プロスタグランジンは化学合成によって合成されているため、非常に高価な化合物となっている。そこで本研究では、プロスタグランジンをより効率よく安価に合成することを目的とし、プロスタグランジンの生物生産を試みた。そのために、栽培するのに環境負荷が少ない植物に注目し、高等植物では合成していないアラキドン酸を合成しているゼニゴケを用いた。
【方法】まず、アラキドン酸からプロスタグランジンを合成する経路の初発反応を行う酵素であるシクロオキシゲナーゼの遺伝子を、紅藻オゴノリからクローニングした。ゼニゴケにおいてこのオゴノリ由来シクロオキシゲナーゼ遺伝子(*GvCOX*)を高発現させるために、*CaMV35S* プロモーターあるいはゼニゴケ*MpEF1α*プロモーターと、ゼニゴケにおいて遺伝子発現を上昇させることがわかっているゼニゴケADH様UDPグルコースデヒドロゲナーゼ相同遺伝子(*MpUDP*)の5’-UTRを用いた。作成したコンストラクトを、アグロバクテリウム感染法を用いて、ゼニゴケに形質転換した。得られた形質転換ゼニゴケのうち、遺伝子導入が確認できた形質転換体から、溶媒抽出によりプロスタグランジンを抽出し、LC-MS/MS解析によって、プロスタグランジンが合成されているかどうかを調べた。
【結果】形質転換の結果、形質転換ゼニゴケを100個体以上得ることができた。まず、これら形質転換体の粗タンパク質抽出液とアラキドン酸を反応させ、反応産物（プロスタグランジン$F_{2\alpha}$; $PGF_{2\alpha}$）をLC-MS/MSによって同定することにより、*in vitro*でのシクロオキシゲナーゼ活性を調べた。その結果、野生型ゼニゴケは活性を示さなかったのに対し、ほとんどの形質転換体は有為な活性を示した。次に、得られた形質転換体中、最も*in vitro*でのシクロオキシゲナーゼ活性が高かった形質転換体からプロスタグランジンを抽出し、生体内での蓄積量を調べた。その結果、$PGF_{2\alpha}$が21.3 ng/gFW 蓄積していることが明らかとなった。これらの結果から、形質転換体中では、GvCOX のシクロオキシゲナーゼ活性によってアラキドン酸からPGH_2が合成された後、$PGF_{2\alpha}$が合成されることが示唆された。遺伝子工学的手法を用いた、プロスタグランジンの生物生産はこれが世界で初めての報告であり、非常に画期的な研究である。今後さらに改良を加えて、より効率的で低コストな生産方法を開発することにより、医薬品産業や医薬研究分野の発展に大いに貢献できると考えている。本研究は、生研センター異分野融合研究事業によるものである。

Marchantia polymorpha, prostaglandin, cyclooxygenase

講演番号：2A31p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ A校舎31会場

Sphingobium sp. SYK-6株から単離されたピノレジノール変換酵素遺伝子*pinZ*を発現する組換え植物の解析

Analysis of transgenic plants with the bacterial gene for pinoresinol reductase, *pinZ*, which has been isolated from *Sphingobium* sp. SYK-6

○田村 尚之，中島 正博，辻 幸子，福原 優樹[1]，上村 直史[1]，佐藤 かんな，片山 義博[2]，原 啓文[3]，菱山 正二郎[4]，政井 英司[1]，梶田 真也（東農工大院・BASE，長岡技科大・生物[1]，日大生資料・森林[2]，岡山理大工・生体[3]，森林総研[4]）

○Masayuki Tamura, Masahiro Nakajima, Yukiko Tsuji, Yuuki Fukuhara[1], Naoto Kamimura[1], Kanna Sato, Yoshihiro Katayama[2], Hirohumi Hara[3], Syoujiro Hishiyama[4], Eiji Masai[1] Shinya Kajita (Tokyo Univ Agric Tech, Nagaoka Univ Tech[1], Fac Biores Sci Nihon Univ[2], Dept Biomed Eng Okayama Univ Sci[3], Forestry Forest Res Inst[4])

【目的】我々は芳香族化合物の分解機能を持つバクテリアの数々の遺伝子を用い、植物中で生合成されるリグニンやリグナンの代謝改変を試みている。本研究では*Sphingobium* sp. SYK-6株から単離されたピノレジノール変換酵素遺伝子(*pinZ*)に着目した。今回は研究の初段階として、発現コンストラクトを導入して組換え植物中でのPinZの生産を目指した。

【方法】植物体内でPinZを効率良く発現させる為、高等植物の遺伝子のコドン頻度を参考に、*pinZ*で用いられているコドンを再構成した。クローニングのために付加した制限酵素認識部位を含めて、コドンを再構成した*pinZ* cDNAをDNA合成機により全合成した。次に、合成したpinZ cDNAをCaMV35Sプロモーターの制御下で植物体内で転写させる為、植物発現用バイナリーベクターpBF2-pinZを作製した。これを*Agrobacterium tumefaciens* GV3101株に導入し、*Arabidopsis thaliana* Col-0を形質転換し、*npt*Ⅱを選択マーカーとして組換え個体を選抜した。凍結破砕により選抜した組換え個体の葉から粗酵素を抽出後、ピノレジノール(ラセミ体)を基質として粗酵素中の酵素活性を測定した。

【結果】カナマイシン含む選択培地上でシロイヌナズナを選抜し、T1世代の組換え個体8個体を得た。野生型個体と組換え個体のそれぞれから粗酵素を抽出し、基質であるピノレジノール、補酵素と共に反応させた。反応液のHPLC分析の結果、野生型ではピノレジノールに由来するピークに変化が見られなかったのに対し、組換え個体ではピノレジノールに由来するピークが消失し、それに代って反応生成物であるラリシレシノールと思われるピークが検出された。更に、上記組換え個体に由来するホモラインを選抜し、各々のPinZ活性を定量的に測定した。現在、これらのホモラインを用いて、表現型の観察を行っている。

lignan, pinoresinol, *Sphingobium* sp. SYK-6,

講演番号：2A31p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ A校舎31会場

硫酸イオントランスポーターの硫黄栄養応答性遺伝子下流域を用いた植物組換え遺伝子発現制御法の開発

Potential use of sulfur-responsive downstream region of sulfate transporter gene for control of recombinant gene expression in plant

○陶山　明子、大滝　千皓[1]、丸山　明子（九大院農院・生機科、[1]福井高専）
○Akiko Suyama, Chihiro Ohtaki[1], Akiko Maruyama-Nakashita (Kyushu Univ.、[1]Fukui Nat.coll. Tech.)

【目的】植物における発現誘導系・高発現系の開発は、主として遺伝子上流域の改良により行われてきた。この際の問題点として、組換えに用いる遺伝子本来の上流域が保持する発現特性（発現時期や組織、環境など）の喪失や高発現による植物の生育阻害などがある。

我々は、硫黄欠乏による硫酸イオントランスポーター*SULTR2;1*の発現誘導を遺伝子下流域が担うことを見出した。この領域を用いることで、上流域の任意な選択や硫黄濃度により発現調節が可能な系を確立できるのではないかと考えている。*SULTR2;1*の転写産物量は、硫黄欠乏に応じて根で増加し、地上部では逆に減少する。*SULTR2;1*遺伝子下流域は、上流域を選ばずに硫黄欠乏下での遺伝子発現を硫黄十分下の10～2000倍に高める。

本研究では、*SULTR2;1*遺伝子下流域を用いた植物組換え遺伝子の発現制御に取り組んだ。

【方法】試験遺伝子として、アントシアニンの生合成を活性化する転写制御因子*PAP1*、根毛形成を促進する転写制御因子*CPC*、メチル化によりジベレリンを不活性化する酵素*GAMT1*を用いた。試験遺伝子の上流域からコード領域を含む配列の下流に*SULTR2;1*遺伝子下流域をつなげた組換え遺伝子を作製し、植物に導入した。これらの植物について形質転換後の第3世代を取得し、試験遺伝子の発現および形質転換植物の表現型、硫黄欠乏による遺伝子発現と表現型の変化を解析した。

【結果】*PAP1*上流域：*PAP1*：*SULTR2;1*下流域を含む組換え植物では、根における通常時の*PAP1*遺伝子発現、硫黄欠乏条件での*PAP1*遺伝子発現がともに著しく上昇した。この組換え植物は硫黄欠乏条件で育成すると、根の中心部が顕著な赤色を示した。地上部および地下部におけるアントシアニン量を測定したところ、通常栄養条件、硫黄欠乏条件ともに根でのアントシアニン蓄積が認められ、特に硫黄欠乏条件においては通常栄養条件の2-20倍にアントシアニンが蓄積した。野生型株および空ベクターを導入した組換え植物の根では、通常栄養条件、硫黄欠乏条件ともにアントシアニンの蓄積は認められなかった。一方、*CPC*、*GAMT1*を含む組換え植物では、根における通常時の遺伝子発現の増加、硫黄欠乏条件での発現誘導が認められたものの、形質の発現は観察されなかった。

今回試験したすべての遺伝子で、*SULTR2;1*遺伝子下流域を用いることによる通常栄養条件下の遺伝子発現上昇および硫黄欠乏による遺伝子発現誘導を示すことが出来た。遺伝子発現の上昇が常に形質の発現に結びつくわけではないが、*PAP1*のような成功例があることから、植物の遺伝子組換え技術において*SULTR2;1*下流域が有用性を発揮すると考えられる。

sulfate transporter, downstream non-transcribed region, gene expression

講演番号：2A31p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ A校舎31会場

イネによって *vir* 遺伝子発現が促される *Agrobacterium rhizogenes* 菌株の解析

Physiological and genetic analysis of an *Agrobacterium rhizogenes* strain that can effectively transform the rice plant

○清川一矢、田中克幸、山本真司、平賀良知、守口和基、鈴木克周（広島大院・理）
○ Kazuya Kiyokawa, Katsuyuki Tanaka, Shinji Yamamoto, Yoshikazu Hiraga, Kazuki Moriguchi & Katsunori Suzuki (Grad. Sch. Sci. Hiroshima Univ.)

根頭癌腫病原菌であるアグロバクテリアは主に双子葉植物に感染し腫瘍を形成させるが、裸子植物や単子葉植物でも感染例が報告されている。アグロバクテリアの植物への感染とT-DNA領域の輸送はまず、Tiプラスミドにコードされているセンサーキナーゼ VirAが植物から分泌されるフェノール化合物を感知し、VirGのリン酸化を介して感染に必要な*vir*遺伝子の発現が活性化される。植物の形質転換には*A. tumefaciens*の数株が広く使われているが、他の種の形質転換能はほとんど評価されていない。私達は日本産 *A. rhizogenes*に属する１０数株を同一のノパリン型Tiプラスミドを導入した株に改変して数種の植物に対する形質転換能を比較評価してきた。従来使われるC58株を用いてイネを形質転換する場合、アセトシリンゴン処理して人為的に*vir*遺伝子の発現を促す必要がある。一方、P-Ag-5株はアセトシリンゴンを添加しなくても*vir*遺伝子の発現が十分に促され効果的にイネを形質転換できた。そこで、どのような機構でP-Ag-5株がイネとの共存培養中に*vir*遺伝子の発現が促されるのかイネ培養細胞を用いて解析した。P-Ag-5株はイネ培養細胞と共存培養すると*vir*遺伝子の発現が促されたが、C58株では促されなかった。*virA*を欠損したP-Ag-5株はイネ培養細胞と共存培養しても*vir*遺伝子の発現が全く誘導されず、*vir*遺伝子誘導経路はC58株同様に*virA*に依存していた。培養細胞破砕抽出液と培養液上清から誘導物質の濃縮と分離を試みたところ、培養液上清では酢酸エチル層に強い*vir*遺伝子の誘導活性を検出し、細胞破砕抽出液では水層の方に弱い誘導活性がみられた。P-Ag-5株で誘導活性がみられた画分はC58株でも高い誘導活性があったことから、イネがもつ*vir*遺伝子誘導物質は細胞外に放出される水に溶けにくい物質と細胞内のみにある水に溶けやすい物質の複数種類あり、P-Ag-5株は染色体上にある遺伝子によってイネとの共存培養中に誘導物質を効果的に感知できることが示唆された。現在、オープンカラムクロマトグラフィーおよびHPLCを用いて培養液上清に含まれる誘導物質の単離・同定を試みている。

Agrobacterium-mediated transformation, *vir* gene induction, phenolic compound

講演番号：2A31p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ A校舎31会場

単子葉イネからの翻訳エンハンサーの探索

Search the translational enhancer in the monocotyledonous plant using *O. sativa*

○矢村　寿啓、上田　清貴、大河原　錬也、米田　新、出村　拓、加藤　晃（奈良先端大・バイオ）

○Toshihiro Yamura, Kiyotaka Ueda, Renya Okawara, Arata Yoneda, Taku Demura, Ko Kato(NAIST)

【目的】

近年、遺伝子導入による植物の改良や利用が盛んに研究されている。有用組換え植物作出の鍵は、どのような遺伝子を導入するかという点に加え、導入した遺伝子が機能を発揮するタンパク質として十分に発現するかという点にある。しかし、残念ながら導入した遺伝子の発現レベルは低いのが現状である。そのため、転写レベルに加えて、翻訳レベルで発現効率を向上させる翻訳エンハンサー活性を持つ5’UTRの取得・活用が強く望まれている。一方、双子葉で機能する翻訳エンハンサーは知られているが、これらは単子葉で機能しない。本研究では農業分野で重要な単子葉において、効率的に機能する翻訳エンハンサーの取得を目指す。

【方法】

ポリソーム解析

イネの培養細胞のRNA粗抽出液をショ糖密度勾配液上に重層し、超遠心を行い、リボソームの結合数に応じてmRNAの分画を行った。254 nmの吸光度を記録し、リボソームが2個以上結合しているmRNAが存在する画分をポリソーム画分とし、また、ポリソーム画分を3分割し、最も重い画分をラージポリソーム画分とした。より多くのリボソームが結合していると考えられるラージポリソーム画分に存在するmRNAは効率的に翻訳されているものと考えられる。

マイクロアレイ解析

ポリソーム画分およびラージポリソーム画分を、赤と緑の蛍光色素でラベルし、Agilent oligoarrayを用いた競合ハイブリダイゼーション実験に供し、ポリソーム画分に対するラージポリソーム画分の存在比率(LPR=Large polysome[Cy3] / polysome[Cy5])を各種mRNAについて求めた。また、リボソーム-RNA複合体の重さはmRNAの長さにも依存すると考えられるため、LPRとORFの長さとの関連性についても調べた。

【結果】

ポリソーム／マイクロアレイ解析の結果、各mRNAのLPR値は幅広い値を示したが、中には1近く、すなわちほぼすべてがラージポリソーム画分にあるmRNAも存在した。これらmRNA はより多くのリボソームと結合していると考えられることから、効率良く翻訳されているmRNAと思われる。また、LPRとORFの長さとの関連性を調べると、概ね相関した。LPR値が高いものの中で、真に効率良く翻訳されているmRNAはより短いmRNAと考えられる。本発表では候補mRNAの5’UTRが翻訳エンハンサー活性を持つかについての検証結果についても報告する。

translational enhancer, monocotyledonous plant, *O. sativa*

講演番号：2A31p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ A校舎31会場

植物培養細胞における導入遺伝子高効率発現系

Efficient transgene expression system in plant cultured cells

○大河原 錬也、上田 清貴、矢村 寿啓、米田 新、出村 拓、加藤 晃（奈良先端大・バイオ）
○Renya Okawara, Kiyotaka Ueda, Toshihiro Yamura, Arata Yoneda, Taku Demura, Kou Kato (NAIST)

【目的】近年、植物培養細胞を用いて有用物質を生産させる試みが盛んに行われているが、商業化された例はほとんどない。その主な原因の一つに、導入した外来遺伝子の発現量が低いことが挙げられる。植物の生育環境には温度、塩、浸透圧などの環境ストレスが存在し、これら環境ストレスに曝された細胞では、翻訳過程が抑制される。だが一方で、一部 mRNA からの翻訳は維持され、そういった翻訳の維持には 5’非翻訳領域(5’UTR)が重要であることが、これまでの知見から明らかとなっている。植物培養細胞においても同様に、培養経過に従って栄養飢餓や酸素欠乏などのストレスが生じることで、翻訳抑制を起こしていることが予想される。このことは、導入した有用遺伝子も翻訳レベルで抑制されることを意味する。そこで本研究では、培養経過によって生じるストレス下においても翻訳を維持する mRNA を探索し、その 5’UTR を利用することで、植物培養細胞における導入遺伝子高効率発現系の開発を目指した。
【方法】Ⅰ.ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析： 回収したシロイヌナズナ培養細胞 T87 から調製した RNA 粗抽出液をショ糖密度勾配液上に重層し、超遠心を行った。超遠心後、ショ糖密度勾配液の下部から 254 nm の吸光度を記録した。
Ⅱ.ポリソーム/マイクロアレイ解析： 培養 1 日目及び 8 日目の細胞から調製した RNA 粗抽出液を重層したショ糖密度勾配液を超遠心後、8 つの画分に分画し、ポリソーム画分と全画分から、それぞれ RNA を精製後、Agilent oligoarray を用いたアレイ解析を行った。
Ⅲ.ポリソーム/定量 RT-PCR： 超遠心後のショ糖密度勾配液を 8 つの画分に分画した。その後、各画分から RNA を精製し、逆転写反応後、PCR を行った。
Ⅳ.安定形質転換培養細胞の作出： Ⅱの結果から翻訳抑制を示した At3g47610 及び翻訳維持を示した At1g77120 の 5’UTR を連結した *GUS* 遺伝子をシロイヌナズナ培養細胞 T87 に導入した。
【結果】Ⅰ.各培養日数（0-9日目）の細胞を用いたポリソーム解析の結果、培養経過に従って翻訳過程が抑制され、定常期には著しい翻訳抑制を起こしていた。
Ⅱ.ポリソーム/マイクロアレイ解析の結果、定常期においても活発な翻訳状態を維持する mRNA を見出した。
Ⅲ.Ⅱの結果から、翻訳維持を示したAt1g77120の5’UTRを連結した*GUS*遺伝子を導入した安定形質転換培養細胞におけるポリソーム/定量RT-PCRの結果、*GUS* mRNAは翻訳抑制されることなく、活発な翻訳状態を維持した。
以上の結果より、本発現系は植物培養細胞を用いた有用物質生産を行う上で、培養経過による翻訳抑制を避け、高い生産性を可能にする有用なツールとなることが期待できる。

Protein production, Translation, 5’UTR

講演番号：2A31p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ A校舎31会場

イネカルスにおけるプロラミンGFP融合タンパク質の発現

Expression of prolamin-GFP fusion protein in rice callus

○重光 隆成[1]、森田 重人[1, 2]、佐藤 茂[1, 2]、増村 威宏[1, 2]
([1]京府大院・生命環境、[2]京都農技セ・生資セ)
○Takanari Shigemitsu[1], Shigeto Morita[1, 2], Shigeru Satoh[1, 2], Takehiro Masumura[1, 2]
([1] Kyoto Prefectural University, [2] Kyoto Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Technology Research Center)

【目的】イネ種子貯蔵タンパク質の一種であるプロラミンは ER 内で凝集し，プロテインボディ・タイプ I（PB-I）を形成する．プロラミンは多重遺伝子にコードされ 10 kDa，13a，13b および 16 kDa プロラミン分子種にそれぞれ分類される． 10 kDa，13a および 16 kDa プロラミンはアミノ酸配列中にシステイン残基を複数持っている一方で，13b プロラミンはシステインを全く持たないという特徴がある．PB-I 形成にはプロラミン同士のシステイン残基を介したジスルフィド結合や疎水性相互作用が重要であると考えられているが，プロラミンが PB-I を形成する分子機構については未解明な部分が多い。本研究では、各種プロラミン分子種をイネカルスを用いて異所的に発現させ，PB 形成の有無や形成された PB 様構造体を解析することで PB 形成の分子メカニズムに関する知見を得ることを目的とした．

【方法・結果】ユビキチンプロモーター制御下で各種プロラミンとGFPの融合タンパク質を発現させるコンストラクトを作製し，アグロバクテリウム法によりイネカルスに導入した．遺伝子導入イネカルスからタンパク質を抽出し，SDS-PAGEおよび抗GFP抗体を用いたウエスタンブロット解析を行い，プロラミンGFP融合タンパク質の蓄積を確認した．また，プロラミンGFP融合タンパク質の局在部位を調べるために，イネカルス組織の凍結切片を作製し，蛍光顕微鏡を用いてGFPシグナルの観察を行ったところ，全ての系統においてPB様の顆粒状シグナルが多数検出された．さらにその顆粒を免疫電子顕微鏡観察したところ，プロラミンGFP融合タンパク質はイネカルスにおいてPB-I様構造体を形成することが明らかとなった．次に，PB-I様構造体がPB-Iと同様にER由来であるかを調べるため，抗Bip抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行ったところ，Bip抗体のシグナルがPB-I様構造体で検出されたことから，プロラミンGFP融合タンパク質が蓄積しているPB-I様構造体がER由来であることが明らかとなった．

以上の結果より，各種プロラミンは単独でPBを形成する機能を有し，PBはシステイン残基を介したジスルフィド結合が無くてもプロラミン同士の疎水性相互作用により形成されうることが示唆された．

Prolamin, Protein Body, Rice callus

講演番号:2A31p17
講演日時、会場:3月23日17:15～ A校舎31会場

経口ワクチン用カプセルを目指したイネ種子PB-Iの特定部位への外来タンパク質局在化に関する研究

The study of the controlled localization of foreign proteins to rice seed PB-I as an application for the capsule of oral vaccines

○佐生　愛[1], 斉藤　雄飛[1], 山崎　竜一[1], 田中　愛実[1], 重光　隆成[1], 森田　重人[1,2], 佐藤　茂[1,2], 増村　威宏[1,2] (京府大院[1], 京都農技セ・生資セ[2])

○Ai Sasou[1], Yuhi saito[1], Ryuichi Yamasaki[1], Manami Tanaka[1], Takanari Shigemitsu[1], Shigeto Morita[1,2], Shigeru satoh[1,2], Takehiro Masumura[1,2] (Kyohudaiin, kyotonougise・seishise)

【目的】

近年，感染症を予防するための新たなアプローチとして，形質転換植物を用いたヒト用経口ワクチンの開発が試みられている．しかし，消化管内の胃酸や消化酵素の分解作用からワクチンタンパク質を保護し，免疫原生を保ったまま，粘膜免疫の誘導に関与する腸管上皮組織まで到達させなければならず，その実用化は難しいのが現状である．そこで，本研究では，イネ種子のタンパク質貯蔵オルガネラであるI型プロテインボディ（PB-I）に着目した．PB-Iの特徴的な構造と，難消化性の性質を利用し，ワクチンタンパク質をPB-Iに蓄積させ，腸管へ輸送する経口薬品用カプセルとして利用することを考えた．その第一段階として，GFPをワクチンタンパク質のモデルとし，各種プロラミン-GFP融合タンパク質をイネ種子胚乳内で発現させ，その局在性と消化酵素への耐性を調査することを目的とした．

【方法】

これまでの研究で，PB-Iには，主に10 kDaプロラミン，13 kDaプロラミン，16 kDaプロラミンが層状に蓄積しており，ヒトの消化管では難消化性であることが明らかとなっている．そこで，各種プロラミン-GFP融合タンパク質を胚乳組織で発現する形質転換イネを作出した．その種子を用いて樹脂切片を作製し，PB-I内部におけるGFPの局在を蛍光顕微鏡で観察した．また，それらのイネ種子を粉末化し，ペプシン消化処理を行った．その試料からタンパク質を抽出し，SDS-PAGE，ウエスタンブロット解析を行った．さらに，樹脂切片を作製し，ペプシン消化処理行った後のPB-Iを蛍光顕微鏡で観察した．

【結果】

イネ種子の形態観察において，各種プロラミン-GFP融合タンパク質の局在は，内在性プロラミンの局在と同様であった．また，ペプシン消化処理を行った種子粉末におけるSDS-PAGEとウエスタンブロット解析では，各種プロラミン-GFP融合タンパク質は，ペプシン耐性を示す事が明らかとなった．さらに，蛍光顕微鏡による形態観察では，消化処理後もGFPがPB-I内に局在している事が示された．以上より，PB-Iは外来タンパク質を腸管に輸送するキャリアーとしての可能性が見出された．

protein body, prolamin , transgenic rice

講演番号：2A31p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ A校舎31会場

全て植物由来の遺伝子を用いたフラボノイド類強化レタスの作出

Enrichment of lettuce with flavonoids by all plant-derived genes

○山本峻資[1]，丹羽康夫[1]，小川剛史[1,2]，清水正則[3]，浅尾浩史[4]，小林裕和[1] ([1]静県大院・生活健康, [2]浜松大・健康プロデュース, [3]しずおか産業創造機構, [4]奈良県農業総合センター)

○Shunsuke Yamamoto[1], Yasuo Niwa[1], Takeshi Ogawa[1,2], Masanori Shimizu[3], Hiroshi Asao[4], Hirokazu Kobayahsi[1] ([1]Grad. Sch. Nutr. Envir. Sci., Univ. Shizuoka; [2]Food Sci. Center, Shizuoka Org. Creation Industries; [3]Sch. Health Promot. Sci., Hamamatsu Univ.; [4]Nara Pref. Agr. Exper. Station)

【目的】生活習慣病の予防や治療には、植物由来の機能性・薬効成分の活用が期待される。植物の二次代謝物であるフラボノイド類は、抗がん、抗酸化効果、抗アレルギー、抗炎症作用、ダイエット効果などを有することで知られている。本研究では、植物のフラボノイド代謝系において律速段階の酵素であるカルコン合成酵素 (*CHS*) を強制発現させたレタスの作出を目的とした。植物中におけるこれらフラボノイド類の濃度を増加させるためには遺伝子操作が有効であるが、遺伝子組換え農作物に対する消費者の忌避意識が高いのが現状である。しかしながら、生活習慣病を予防し、健康で長寿を全うできるような機能性成分に富んだ農作物であれば、消費者の評価は異なると考えられる。よって、植物への遺伝子導入 (形質転換) に不可欠な選択マーカー遺伝子としてシロイヌナズナ由来の変異型アセト乳酸合成酵素 (*mALS*) を採用し、これらを含め全て植物の遺伝子を用いて、「食べて安心」なフラボノイド類強化レタスの作出を試みた。

【方法】目的遺伝子である *CHS* をシロイヌナズナから調製し、*CHS-mALS* コンストラクトを作製した (*Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **73**, 936-938, 2009)。 1 週間ほど育成させたリーフレタス (品種：グリーンウェーブ) の子葉を用い、アグロバクテリウム法により、*CHS-mALS* を導入した。25℃にて、共存培養、カルス誘導、シュート誘導、発根誘導を経て順化させた。植物ホルモンとしては、カルス誘導には、0.1 mg/L ベンジルアミノプリン (BA) および 0.1 mg/L ナフタレン酢酸 (NAA)、またシュート誘導には、それらを 0.01 mg/L ずつ添加した。選抜薬剤として、50 nM イマザピル剤 (IP 剤) を使用した。目的遺伝子の導入確認には、Clean PCR 法を用い、DNA の抽出・増幅を行い、形質転換体候補を選抜した。さらに、形質転換体植物 100 mg を H_2O:MeOH:AcOH=100:100:1 を用いて抽出し、UPLC-PDA-TOF-MS (Waters) にてフラボノイド類を分析した。

【結果】リーフレタスの切片約 6,500 個のうち、60 個が発根の形成まで至った。PCR により *CHS-mALS* の導入確認を行ったところ、発根した 60 個体のうち 16 個体が形質転換体候補として確認された。それら形質転換体候補を UPLC-PDA-TOF-MS にて成分分析を行ったところ、約 5 種類のフラボノイド類が 10 倍程度増加していることが分かった。また、*CHS* の発現量は real-time RT-PCR にて評価している。

Chalcone synthase,　Acetolactate synthase,　Flavonoids

講演番号：2A31p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ A校舎31会場

葉緑体ゲノム改変レタスによるアスタキサンチン等ケトカロテノイドの効率生産

Efficient production of ketocarotenoids including astaxanthin with chloroplast genome-modified lettuce

原田 尚志[1]、村上 美由紀、新井 和子、新藤 一敏[2]、音松 俊彦[1]、○三沢 典彦（石川県大・生資研、[1]神戸天然物化学、[2]日女大家政・食物）

Hisashi Harada[1], Miyuki Murakami, Kazuko Arai, Kazutoshi Shindo[2], Toshihiko Otomatsu[1],○Norihiko Misawa (Ishikawakendai, [1]Kobetennenbutsukagaku, [2]Nichijodai)

【目的】アスタキサンチンは強力な抗酸化性や血液脳関門の通過能を持つ機能性食品素材であるが、高等植物は通常、本色素を合成できない。我々はすでに、植物の主要カロテノイドである β-カロテンから本色素を効率的に合成する２つのオキシゲナーゼ遺伝子*crtW*と*crtZ*を明らかにしている[1)]。本研究では、これらの遺伝子をレタス葉緑体ゲノムに直接組み込んで高発現させることにより、アスタキサンチンを始めとするケトカロテノイドを効率生産させることを目的とした。
【方法】海洋細菌*Brevundimonas*属SD212株由来のカロテノイド3,3'-ヒドロキシラーゼ（CrtZ）、カロテノイド4,4'-ケトラーゼ（CrtW）、及び海洋細菌*Paracoccus*属N81106株由来のIPPイソメラーゼ（Idi）をコードする遺伝子をこの順番に*rrn*のプロモータ制御下にタンデムに繋ぎ、レタス（*Lactuca sativa*; var. Berkeley）の葉緑体をパーティクルガン法により形質転換した。なお、薬剤耐性遺伝子としてスペクチノマイシン耐性遺伝子（*aadA*）を用い、本薬剤を含むプレートで生えた不定芽を単離し培養を行った。
【結果】より濃い赤色を示す不定芽を選んで培養し、必要に応じて再分化を繰り返すことにより、ケトカロテノイドを高蓄積する株を選抜し、特定網室内で生育させた。得られた葉緑体ゲノム改変（CGM）レタスの種子は99%の発芽率を示し、非形質転換体の発芽率（93%）よりむしろ高かった。CGMレタスT_1の葉におけるカロテノイド組成を調べたところ、全カロテノイドの97%が、高等植物には本来見られないケトカロテノイドであり、アスタキサンチンを筆頭に、4-ケトアンテラキサンチンやフリチエラキサンチン（4-ケトルテイン）が主要カロテノイドとして生産されていた。これらの色素が、植物が本来有するカロテノイドの生理的機能を代替した可能性がある。我々は以前、*crtZ*と*crtW*遺伝子を利用した類似のプラスミドによりCGMタバコの作出を行ったが[2)]、4-ケトアンテラキサンチンは、CGMタバコの葉において初めて同定された新規カロテノイドであり[3)]、フリチエラキサンチンはアカテガニやハナサキガニに微量含まれる希少カロテノイドであった[4)]。今回作出したCGMレタスは、アスタキサンチン以外にこれらの色素の安定的供給源として期待されるだけでなく、高等植物におけるケトカロテノイドの生理的役割を探るためのモデル植物となるかもしれない。

1) N. Misawa, *Plant Biotechnol*., 26: 93-99 (2009). 2) T. Hasunuma et al., *Plant J.*, 55: 857-868 (2008). 3) K. Shindo et al., *Tetrahedron Lett.,* 49: 3294-3296 (2008). 4) T. Matsuno, *Fisheries Sci.*, 67：771-783 (2001)

Astaxanthin, Carotenoid, Lettuce

講演番号：2A31p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ A校舎31会場

バイオマス増産を目指した遺伝子導入によるサツマイモの光合成増強

Generation of transgenic sweet potato with enhanced productivity

○西山和樹[1]、井上貴之[2]、中村茉樹[2]、大鳥久美[2]、作山治美[2]、田茂井政宏[1,2]、横田明穂[3]、重岡 成[1,2]
([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]奈良先端大・バイオ)
○Kazuki Nishiyama[1], Takayuki Inoue[2], Maki Nakamura[2], Kumi Otori[2], Masahiro Tamoi[1,2], Akiho Yokota[3], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

【目的】世界の主要作物の一つであるサツマイモは、他の植物と比較してシンク能力が高く、光合成代謝産物を塊根に大量に蓄積することができることから、バイオマスの増産のための重要な作物として注目されている。これまでに我々は、カルビン回路のフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ(FBPase)とセドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ(SBPase)を同時に強化することのできるラン藻由来FBP/SBPaseを導入したタバコ、レタス、シロイヌナズナ、ジャガイモなどで、光合成活性の上昇、生育促進、収量増大が見られることを明らかにしてきた。そこで、この技術をバイオマス増産に応用するために、サツマイモ(高系14号)の葉緑体でFBP/SBPaseを発現させ、光合成能能力などに及ぼす影響を検討した。
【方法および結果】35Sプロモーター(p35S)下流にトマトrbcSトランジットペプチド(TP)とFBP/SBPase遺伝子を連結した導入用プラスミドを構築し、アグロバクテリウム法によりサツマイモの胚形成カルスに導入した。抗生物質を含む培地上での選抜、再生を繰り返し、薬剤耐性を示す2株の植物体(IpFS16-1, 20-1)を得た。ゲノミックPCRにより、いずれの植物体においてもFBP/SBPase遺伝子が導入されていることを確認した。また、抗FBP/SBPase抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、FBP/SBPaseタンパク質の発現を確認した。光強度300 µmol photons/m^2/s、明期14時間(28℃)/暗期10時間(25℃)の環境で栽培したところ、FBP/SBPaseの高発現が見られたIpFS20-1株では、FBPase活性は野生株の約2.2倍に、光合成活性は野生株の約1.9倍に上昇していた。現在、光合成代謝産物、生産性に及ぼす影響を検討している。本研究はJSTのALCAプロジェクトとして実施している。

sweet potato, photosynthesis, biomass

講演番号：2A31p21
講演日時、会場：3月23日17:59～ A校舎31会場

グロースチャンバーを用いた簡便な作物の種子生産用水耕栽培法

A simple and versatile hydroponics method for crop seed production in a plant incubator

○黒田昌治、池永幸子（農研機構・中央農研）
○Masaharu Kuroda, Sachiko Ikenaga (NARO Agric.Res.Cent.)

植物体が大きくなる作物の研究、とりわけ組換え植物を用いる場合は、栽培に必要な設備用件のハードルが研究推進を阻害する一因となっている。このような研究を小規模施設で実施できるように、汎用機材を用いる簡便な種子生産用水耕栽培法の確立を試みた。

側面蛍光灯方式の普及型グロースチャンバー（東京理化 FL2000）を用いて、イネをモデルとした栽培系を検討した。栽培条件は、昼 12 時間 27 度／夜 12 時間 22 度の短日条件に統一し、その他の条件調整は一切行わなかった。植物体については、穴をあけたポリプロピレンチューブに 10cm 程度に育った苗を入れてチューブスタンドに立て、それごと希釈した MS 培地で満たした深型ステンレスバットに入れてチャンバーに設置した。培地交換は 2 週間ごと、その間は週 3 回水道水を補給するにとどめた。

この方法では、チャンバー床面あたり 144 個体を同時育成できることを確認し、またインディカを含む 5 品種を栽培できた。日本晴の場合は、育苗に 14 日、そこから出穂まで 60 日弱、登熟期間を含めると 1 世代約 4 ヶ月となった。移植した大半の個体から種子が得られ、稔実率は 80-90%、個体当たり種子数は栽培密度に依存するものの、おおむね 20-30 粒、最大で 100 粒程度となった。また植物体の高さは 65cm 以下となり、チャンバー上部 35cm のスペースは移植直後の苗育成に利用することで、扱える個体数を 144 本以上に増やせた。

以上のように、この方法ではハイグレードなチャンバーは必要なく、その他の機材や培地も汎用品で再利用もできる。栽培労力や実験手技も最低限に抑えてあり、低コスト・省スペース・省エネルギーな手法設計となっている。イネの初期世代の育成や冬場の世代促進等、多系統少量種子生産が求められる場面でとりわけ有用な方法であり、組換えイネの研究にも活用できると考えている。現在、この方法を他の作物にも適用できるかについて検討を始めている。

Hydroponics, Seed production, Rice

講演番号：2A32p02
講演日時、会場：3月23日14:00～ A校舎32会場

ラフト分子の一分子追跡に向けた蛍光ガングリオシドプローブの合成と機能評価３

Synthesis and functional evaluation of fluorescent ganglioside probes for the single molecule tracking of raft marker 3

○河村 奈緒子[1]、安藤 弘宗[1]、池田 泰祐[1]、鈴木 健一[1, 2]、石田 秀治、楠見 明弘[1]、木曽 真[1]（岐阜大・応用生物、[1]京都大・iCeMS、[2]科技振・PRESTO）

○Naoko Komura[1],Hiromune Ando[1], Yasuhiro Ikeda[1]、Kenichi Suzuki[1, 2]、Hideharu Ishida、Akihiro Kusumi[1]、Makoto Kiso[1] (Gifu Univ. , [1]iCeMS, [2]PRESTO, JST)

【目的】我々は1分子追跡法によりラフトマーカーの離合集散を直接観察することで、ラフトマーカーの機能及び静的、動的挙動の解明を目指している。この目的を達成するためには、シグナル分子受容体と協奏的に機能するガングリオシドの1分子追跡用プローブが必須であるが、これまではプローブのラフトマーカーとしての性質を検証することなく、ラフト中のガングリオシドの挙動について論じられてきた。我々は、昨年度の本会にて蛍光分子の糖鎖への導入位置がガングリオシドのラフトマーカー特性に大きく影響することを示し、シアル酸残基の9位に蛍光分子を導入したガングリオシドGM3がラフトマーカーとして機能する可能性が高いことを報告した。今年度は、もう一つの主要ラフト分子であるガングリオシドGM1の蛍光プローブの合成および蛍光GM3、GM1プローブのラフトマーカー特性の評価の結果を報告する。

【結果】蛍光GM3プローブでの結果を踏まえ、GM1のシアル酸9位に蛍光分子を導入することとした。すでに合成法の確立した二糖ユニット（シアル酸－ガラクトース:NG）を起点とし、シアル酸9位をトリフルオロアセトアミド化したNG受容体へ誘導し、二糖供与体とのグリコシル化反応によりGM1四糖部分を得た。続いて、得られた四糖を供与体へと変換し、環状Glc-Cer受容体とのグリコシル化反応に供してGM1骨格を構築後、保護基の脱保護、蛍光標識の導入により蛍光GM1プローブの合成を達成した。合成した蛍光GM3、GM1プローブのラフト親和性を、ラフトマーカーの定義に用いられるDRM及びLo/Ld分配実験、生細胞膜上における他のラフトマーカーとの共局在の観察により評価した。その結果、シアル酸9位に導入した蛍光分子の親疎水性とラフト親和性とに相関がみられた。また、2色同時1分子追跡により、GPIアンカー型受容体CD59クラスター及びEGF受容体に対して蛍光GM3プローブがリクルートされる様子を動画で捉えることに成功した。さらに天然のGM1糖鎖を特異的に認識するコレラ毒素がシアル酸9位標識GM1にも結合することが確認された。以上の結果より、これらのプローブが非常に優れたラフトマーカーであることが示された。

Ganglioside, Raft, Single molecule tracking

講演番号：2A32p03
講演日時、会場：3月23日14:11～ A校舎32会場

ラフト分子の一分子追跡に向けた蛍光ガングリオシドプローブの合成と機能評価４

Synthesis and functional evaluation of fluorescent ganglioside probes for the single molecule tracking of lipid raft 4

○松井 泉美、河村 奈緒子[1]、安藤 弘宗[1]、鈴木 健一[1,2]、石田 秀治、楠見 明弘[1] 、木曽 真[1]（岐阜大・応用生物、[1]京都大・iCeMS、[2]科技振・PRESTO）

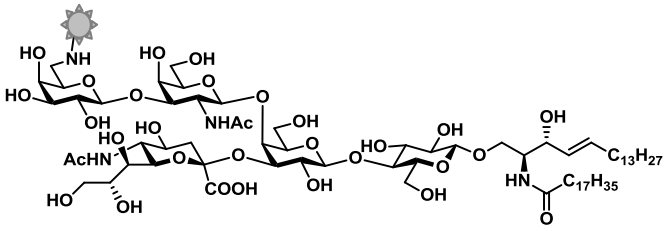
○Izumi Matsui, Naoko Komura[1], Hiromune Ando[1], Kenichi Suzuki[1,2], Hideharu Ishida, Akihiro Kusumi[1], Makoto Kiso[1] (Gifu Univ. , [1]iCeMS, [2]PRESTO, JST)

【目的】細胞膜ドメインであるラフトは、細菌及びウイルスの感染、シグナル伝達などに密接に関わっている。本研究では、一分子追跡法によるラフト分子の離合集散の観察及びラフト分子の機能解明を目指している。この目的の達成のためには、シグナル分子受容体と協奏的に機能するガングリオシドの一分子追跡用プローブが必須であるが、これまではプローブのラフトマーカーとしての性質の検証を経ずに、ラフト中のガングリオシドの挙動が論じられてきた。我々は、天然のガングリオシドと同様の、ラフトマーカーとしての特性を有するガングリオシドプローブを開発することを目指している。これまでの研究結果から、ラフトマーカーとしての性質保持には、水溶性の高い蛍光分子を糖鎖末端に結合させることが必須であると判明している。この結果を受けて、本研究では、末端のガラクトース6位に蛍光分子をもつGM1プローブを合成し、ラフトマーカーとしての機能検証を行うこととした。

【方法及び結果】蛍光分子が化学的安定性に乏しいことを考慮し、GM1のガラクトース6位にアミノ基を導入したアミノGM1を得た後の最終段階で、蛍光分子の活性エステル体とアミド結合形成を行うことにより、目的のGM1プローブを合成することとした。

非還元末端側ガラクトース6位をトリフルオロアセトアミド化した供与体と、既知のGM2コア三糖受容体 (GalNAcβ(1→4){Neu5Acα(2→3)}Gal) とのグリコシル化反応によりGM1四糖部分を得た。この四糖が良好な収率で得られたことにより、今回開発したガラクトース供与体が有用なユニットであることが示された。続いて、得られた四糖を定法に従ってイミデート供与体へと変換し、環状Glc-Cer受容体とのグリコシル化反応に供してGM1骨格を構築した。その後、全保護基の脱保護によりアミノGM1として、最後に蛍光標識の導入を行い蛍光GM1プローブの合成に成功した。

合成したGM1プローブをDRM分配試験、コレラ毒素凝集試験に供して、親分子である天然型GM1との特性を比較した。その結果も併せて報告する。



Lipid raft, Ganglioside, Single molecule tracking

講演番号：2A32p04
講演日時、会場：3月23日14:22～ A校舎32会場

ALS様疾患患者由来IgM抗体と反応するハイブリッド型ガングリオシドの効率的全合成

The First and Efficient Total Synthesis of Hybrid-Type Gangliosides Reacted with IgM Antibodies from the Patient of ALS-Like Disorder

○中島 慎也[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、齋藤 里紗[1]、玉井 秀樹[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS）
○Shinya Nakashima[1,2], Hiromune Ando[1,2], Risa Saito[1], Hideki Tamai[1,2], Hideharu Ishida[1], Makoto Kiso[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は筋肉の萎縮と筋力低下をきたす神経変性疾患で、運動ニューロン病の一種である。ALSは有効な治療法がないが、ALSと診断された後に治療可能な疾患 (ALS様疾患) であると判明した例もあることから、類似疾患の可能性を除外することも重要な課題である。このALS様疾患について、中尾らはウシの脳のガングリオシド成分中、糖鎖の非還元末端にGM2三糖構造[Neuα(2→3){GalNAcβ(1→4)}Gal]を持つガングリオシド (GM2、GalNAc-GM1b、GalNAc-GD1a) が、患者の血清中のIgM抗体と反応することを報告した。これより、自身のGM2糖鎖に対して自己の抗体が攻撃する自己免疫疾患であることが予想され、ALSとALS様疾患との違いを見分ける手段としてガングリオシドが有効である可能性が示唆された。またその報告中で、同じく患者IgM抗体と反応する成分の中から珍しい構造を持ったガングリオシドX1、X2を単離している[1]。それらはGM2三糖を非還元末端に持ち、内部にラクト系糖鎖構造[Galβ(1→3)GlcNAcβ(1→3)Gal]とガングリオ系糖鎖構造[GalNAcβ(1→4)Gal]の両方を有しているユニークなハイブリッド型ガングリオシドである。これらガングリオシドとALS様疾患との関連をより詳細に調査するために、有機化学的手法による合成を試みた。
【方法・結果】ガングリオシドX1についてはすでに全合成を達成し、報告しているが、最終段階のセラミド導入収率に課題があった。その結果を受け、近年当研究室で精力的に研究を進めているグルコシルセラミドアクセプターを利用し、ガングリオシドX1、X2両方を効率的に合成できる新規合成経路を立案し、全合成に取り組んだ。二種類の糖鎖骨格を効率的に合成するため、共通ユニットを活用し、合成の後半でX1、X2それぞれへ分岐する経路を設計して検討した。しかし、分岐構造の構築が困難であり、目的の糖鎖骨格を得ることができなかった。そこで、予め内部のハイブリッドコア構造を構築した後、GM2三糖と結合させる経路に変更し、目的の糖鎖骨格の高収率での合成に成功した。続くガングリオシド骨格の合成では、グルコシルセラミドアクセプターを用いることで、セラミドを直接糖鎖に導入した場合と比べて収率は飛躍的に向上した(26%→83%)。得られたガングリオシドの脱保護を行い、新奇ハイブリッド型ガングリオシドX2の全合成を達成した。合成したガングリオシドX1、X2は、発見当時論文で用いたALS様患者血清と反応することが確認された。

[1] Nakao, T.; Kon, K.; Ando, S.; Miyatake, T.; Yuki, N.; Li, Y.-T.; Furuya, Y.; Hirabayashi, Y. *J. Biol. Chem*. **1993**, *268*, 21028-21034.

Total synthesis, Ganglioside, ALS-like disorder

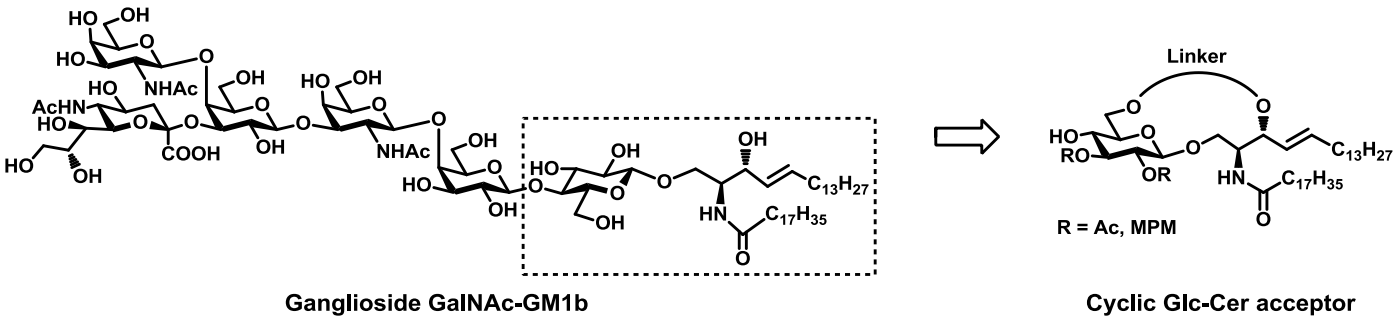
講演番号：2A32p05
講演日時、会場：3月23日14:33～ A校舎32会場

環状グルコシルセラミド受容体の改良検討とガングリオシドGalNAc-GM1bの全合成

Elaboration of cyclic Glc-Cer acceptor and the total synthesis of ganglioside GalNAc-GM1b

○小西 美紅、藤川 紘樹[1]、安藤 弘宗[1]、石田 秀治、木曽 真[1]（岐阜大・応用生物、[1]京都大・iCeMS）
○Miku Konishi, Kohki Fujikawa[1], Hiromune Ando[1], Hideharu Ishida, Makoto Kiso[1] (Gifu Univ., [1]iCeMS)

【目的】ギラン・バレー症候群(GBS)は、急性に発症する四肢筋力低下や深部腱反射消失を主徴とする自己免疫性末梢神経疾患である。治療法として血漿交換が有効であることから、自己抗体が神経細胞を攻撃し、発症に到ると考えられている。近年、患者血清中の自己抗体が、人の神経系に特異的に存在するガングリオシドGalNAc-GM1bを標的とすることが解明された。本研究では、GBSの分子レベルでの発症機序の解明を目的に、GalNAc-GM1bの全合成を行うこととした。
【方法】GalNAc-GM1bを非還元末端側五糖とグルコシルセラミド(Glc-Cer)構造に分割し、収束的な合成経路により合成を行うこととした。これまでの分子内グリコシル化を経て合成される環状Glc-Cerユニットは、2位にBz基、3位にMPM基を有しており、選択的保護が煩雑であり、大量合成への応用において課題があった。そこで本研究では、簡便かつ効率的な合成を目指し、2位、3位水酸基に同じ保護基を用いた環状Glc-Cerユニットを設計した。
【結果】糖鎖部分の構築では、非還元末端側五糖をGM2-core三糖とGalNAc-Gal二糖ユニットに分割し、シアル酸を含む糖鎖分岐構造の構築を行った。環状Glc-Cerユニットの合成においては、グルコースの2位、3位水酸基の保護基として、導入が簡便なAc基と、オリゴ糖鎖供与体によるグリコシル化において高反応性が期待できるMPM基を選択した。MPM基を用いる場合は隣接基効果をもたないため、グルコースとセラミドを架橋するリンカーを変えることによって、分子内グリコシル化の立体選択制御を検討した。その結果、塩化メチレン溶媒中では、リンカーによる立体選択性の制御は難しかったため、ニトリル溶媒効果を用いてβ優先的に分子内グリコシル化を進行させた。リンカー導入から分子内グリコシル化までの収率を考慮し、効率的に合成可能な環状Glc-Cer受容体と非還元末端側五糖供与体の縮合反応を行い、目的構造の保護体を得た後、定法に従って脱保護をすることで、ガングリオシドGalNAc-GM1bの全合成を達成した。



Ganglioside GalNAc-GM1b　　Cyclic Glc-Cer acceptor

Ganglioside, Glc-Cer, stereoselectivity

講演番号：2A32p06
講演日時、会場：3月23日14:44～ A校舎32会場

保護硫酸基を用いた位置特異的硫酸化オリゴ糖の合成

Synthesis of regiospecifically sulfated oligosaccharides with protected sulfate groups

○松下 健也、田村 純一（鳥取大地域・地域環境）
○Kenya Matsushita, Jun-ichi Tamura (Tottori University)

【目的】化学合成によって硫酸化オリゴ糖を得る場合、一般的には糖合成の最終段階で遊離の水酸基に硫酸基を導入する。しかし、多糖のように糖鎖が長く、硫酸化度が高くなるほど、均一な硫酸化糖を得ることが難しくなり、硫酸基の個数や位置の確認も困難になる。そこで、予め硫酸化された糖鎖ユニットの逐次伸長により、任意の位置を確実に硫酸化したオリゴ糖を得ることとした。位置特異的に水酸基やアミノ基が硫酸化された糖鎖は、その硫酸化パターンによって様々な異なる生理活性を示す。特定の水酸基やアミノ基に正確に硫酸基が導入された硫酸化オリゴ糖を得ることは、医薬品への応用など様々な面において有益である。

【方法と結果】一般的に、硫酸化された糖は、ジクロロメタンのような非極性非プロトン性溶媒に不溶であるため、硫酸化糖を用いては通常の糖鎖伸長反応（グリコシル化）が行えない。一方、2,2,2-trichloroethoxysulfate[1]として保護硫酸化された糖は、非極性非プロトン性溶媒に可溶となる。我々はこれまでに、この保護硫酸基が糖鎖合成に必要な種々の有機反応に適用できることを示してきた[2]。その結果をふまえ、今回保護硫酸基を利用して糖鎖ユニットを合成し、その逐次伸長によるオリゴ糖合成を検討した。また、保護硫酸化糖の種々の化学反応に対する耐性についても検討したので報告する。

1) L. J. Ingram, A. D. Ahmed, A. M. Ali, S. D. Taylor, *J. Org. Chem.*, **74**, 6479-6485 (2009).
2) K. Matsushita, S. Funamoto, J. Tamura, *16th Eur. Carbohydr. Symp.*, Abs. p213 (2011).

Protected sulfate, Oligosaccharide

講演番号：2A32p07
講演日時、会場：3月23日15:05～ A校舎32会場

ナイセリア属細菌が産生するリポオリゴ糖内のオリゴ糖鎖の合成研究

Synthesis study of partial oligosaccharides expressed in neisserial lipooligosaccharide

○岸本 勝也、小賀野 美紀、山﨑 良平（鳥大・農）
○Katsuya Kishimoto, Miki Ogano, Ryohei Yamasaki (Tottori University)

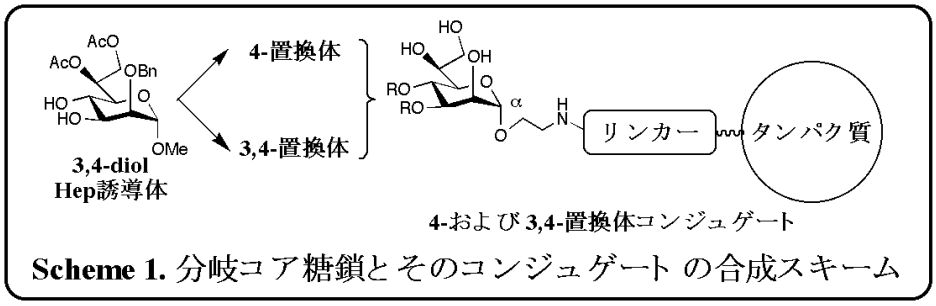
【背景・目的】

髄膜炎菌等のナイセリア属細菌は、オリゴ糖とリピッドAが結合したリポオリゴ糖(lipooligosaccharide, LOS) を産生する。このLOSのオリゴ糖鎖は、変異の少ないコア糖鎖と可変部からなる。このコア糖鎖は、右図に示すように、GlcNAcα1-2Hepα1-3Hepα1-5KDOα2-4KDOの５糖からなり、Hep[I]、あるいは、Hep[I]とHep[II]の両方に糖鎖付加が起き、3,4分岐、2,3:3,4二分岐の構造が生合成される。我々は、これまでに、ヒト血清中に存在するIgGが3,4分岐と2,3:3,4二分岐LOSに共通な糖鎖を認識することを明らかにしている[1)]。しかしながら、このIgGが認識する糖鎖構造は未解明である。本研究では、このような抗LOSヒト抗体の認識する糖鎖構造を明らかにするために、結合するLOSに共通な分岐コア糖鎖と、そのコンジュゲートの合成を目指した。

2,3/3,4分岐構造	3,4分岐構造
Galβ1-4Glcβ1-4Hep[I]-R 3 ↑ Galβ1-4Glcβ1-3Hep[II]α1 2 ↑ GlcNAcα1	Galβ1-4Glcβ1-4Hep[I]-R 3 ↑ Hep[II]α1 R=(KDO)2-Lipid A
GlcNAc;N-Acetyl-D-glucosamine, Hep;L-glycelo-D-manno-heptose KDO;3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid	

図1. ナイセイア属細菌が産生する部分糖鎖

【結果と考察】



Scheme 1. 分岐コア糖鎖とそのコンジュゲート の合成スキーム

結合するLOSに共通な糖鎖構造は、3,4-diol-Hep誘導体を出発物質として、4-置換体と3,4-置換体を合成した。これらの置換体をそれぞれ、還元末端のアノマー位を活性化しグリコシル化反より、スペーサーを導入し、その後、コンジュゲートを合成した。

オリゴ糖鎖、そのコンジュゲート合成における検索条件、およびその結果を合わせて報告する。

[1] Yamasaki, R, Yabe, U, Kataoka, C, Takeda, U, Asuka, S, Infect. Immun, **78** (2010) *3247-3257*

Synthesis, lipooligosaccharide, oligosaccharide

講演番号：2A32p08
講演日時、会場：3月23日15:16～ A校舎32会場

N-結合型複合型糖鎖を有するSaposin Cの合成

Synthesis of Saposin C with N-linked complex type glycan

○小林　甫、田中　洋成、朝比奈　雄也、田野　千春[1]、片山　秀和、中原　義昭、中原　悠子、米重　あづさ[1]、松田　純子[1]、北條　裕信（東海大工・生命化学、[1]東海大学・糖鎖科学研）

○ Hajime Kobayashi, Hiromasa Tanaka, Yuya Asahina, [1]Chiharu Tano, Hidekazu Katayama, Yoshiaki Nakahara, Yuko Nakahara, [1]Azusa Yoneshige, [1]Junko Matsuda, Hironobu Hojo (Department of Applied Biochemistry, Tokai Univ. [1]Institue of Glycoscience, tokai univ.)

【目的】Saposin A,B,C,Dはリソソームにおけるスフィンゴ糖脂質の加水分解に必要な糖タンパク質である。Saposin C　はグルコシルセラミドのグルコシルセラミダーゼによる加水分解を促進する事が知られている。本研究ではSaposin Cの持つ糖鎖機能を解明するため、複合型糖鎖を有するSaposin Cの全合成を試みることとした。

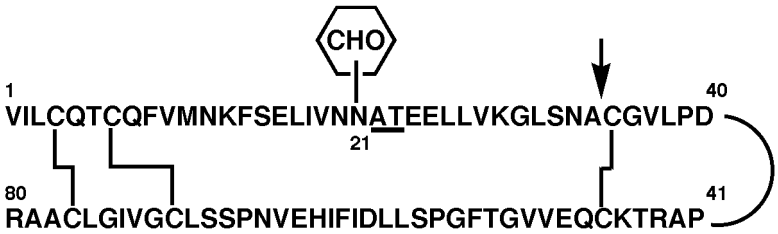


図1.　Saposin Cのアミノ酸配列

【方法・結果】Saposin Cの合成は、ペプチド鎖を上記図の矢印部分で2つに分けて固相合成し、それらを縮合する事により達成することとした。また糖鎖の伸長はEndo-Mによる糖転移反応を利用してGlcNAcを有するSaposin CにN-結合型複合型糖鎖を導入する方法を用いて行うこととした。そのためN末端セグメントの固相合成途上Asn[21]にGlcNAcを持つAsnを導入し、ライゲーション反応、ジスルフィド結合の形成を経た後にEndo-Mによる糖鎖伸長を試みることとした。まず、樹脂にチオエステルLinkerを導入し、順次Boc-アミノ酸を導入することよりN末端セグメントを合成した。しかし合成したセグメントはアセトニトリル水溶液に対する溶解性が極めて低いことが明らかとなった。そこでペプチドの溶解性向上に有効な*O*-acylisopeptide法を用いてセグメントを再合成する事にした。Boc法による再合成途上、Ala[22]-Thr[23]の間でisopeptide結合を形成し、目的のN末端セグメントを得た。次にC末端セグメントも同様にBoc法を用いて合成した。続いてNCL法によるセグメントの縮合反応、ジスルフィドの形成の行いGlcNAcを有するSaposin Cの合成に成功した。現在、このSaposin Cに対してEndo-Mを用いた複合型糖鎖の導入を試みている。

glycoprotein, glycosyltransferase

講演番号：2A32p09
講演日時、会場：3月23日15:27～ A校舎32会場

セグメント縮合法を用いた糖タンパク質Tim-3 IgV ドメインの合成研究

Synthetic study of glycoprotein “Tim-3 IgV domain” using segment condensation method.

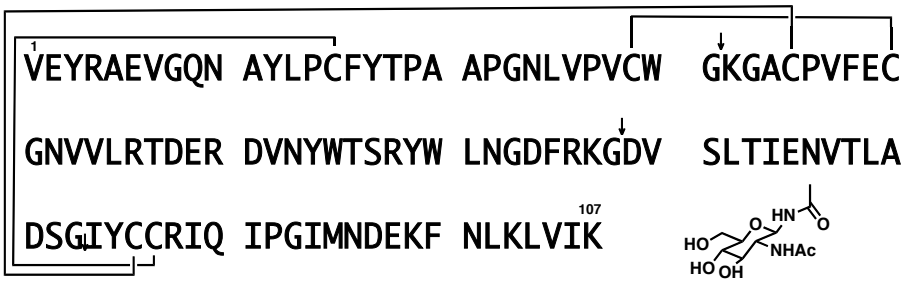
○朝比奈雄也[1,2]、片山秀和[1]、神鳥成弘[3]、北條裕信[1,2,]（[1]東海大・生命、[2]東海大・糖鎖研、[3]香川大・生命センター）

○ Yuya Asahina[1,2], Hidekazu Katayama[2], Shigehiro Kamitori[3], Hironobu Hojo[1,2]([1]Dept. Appl. Biochemistry, [2]Institute of Glycoscience, Tokai Univ., [3]Life Science Research Center, Kagawa Univ.)

【目的】T-Cell Immunoglobulin and mucin containg protein (Tim) 3はTh-1細胞の表面に存在する膜タンパク質であり、自己免疫、アレルギー疾患等に関与していることが知られている。近年、動物レクチンの1つであるガレクチン9は、Tim-3のIgV様ドメイン（107残基）に存在する複合型*N*-glycanに結合し、Th-1細胞の細胞死を誘導することが報告されている。本研究では、ガレクチン9とTim-3との相互作用をより詳細に解明するため、均一な複合型糖鎖を有するTim-3 IgVドメインの化学合成を試みることとした。

【方法・結果】まず目的とするドメインを **1** (1-31)、**2** (32-68)、**3** (69-107)の3セグメントに分けてFmoc固相法により調製した後、チオエステル法により縮合して、IgVドメインの全配列を得ることにした。N-末端アミノ基への選択的なアシル化を行うため、セグメント固相合成の際にリシン残基は側鎖アミノ基をアジド基で保護したものを用いて導入した。またペプチド **1**、**2** は当研究室で開発された*N*-alkylcysteine (NAC) 法により、チオエステルとして得た。糖鎖結合部位であるAsn[78]では、還元末端糖であるGlcNAc残基を導入した。複合型糖鎖の構築は、このGlcNAc残基へのEndo-Mによる糖転移反応により行うことにした。

セグメント **1**, **2** は固相合成、及びHPLCによる精製を効率よく行うことができた。これに対してセグメント **3** は疎水性の高さから、アセトニトリル水溶液に難溶であり、HPLCによる精製が困難であった。そこで、リシン側鎖アミノ基の保護基をアジド基から極性の高いisonicotinyloxycarbonyl (iNoc) 基へ変更して、再度セグメント **3** の合成を行ったところ、セグメントの溶解性が改善された。次に得られたセグメント同士のチオエステル法による縮合を検討した。得られた知見を報告する。



glycoprotein, Thioester method,N-alkylcysteine

講演番号：2A32p10
講演日時、会場：3月23日15:38～ A校舎32会場

Bacillus subtilis 由来 *S*-結合型糖ペプチド sublancin の化学合成

Chemical synthesis of sublancin, an *S*-linked glycopeptides from *Bacillus sabtilis*

○片山　秀和、朝比奈　雄也、北條　裕信（東海大工・生命化学）
○Hidekazu Katayama, Yuya Asahina, Hironobu Hojo (Tokai University)

【目的】Sublancin は、*Bacillus subtilis* 168 株が生産する lantibiotic 様ペプチドである。Sublancin は、5 個の Cys を含む 37 アミノ酸残基からなるペプチドであることが以前から知られていたが、推定される構造と質量分析の結果が一致せず、その正確な化学構造は長い間不明であった。最近になってその化学構造が報告され、22 番目の Cys 残基側鎖にグルコースがチオグリコシド結合するという特異な翻訳後修飾を受けていることが明らかにされた [1]。また、それ以外の 4 個の Cys 残基は、分子内で 2 対のジスルフィド結合を形成していることが明らかにされた。本研究では、sublancin を全合成することを目的とした。

【方法・結果】水酸基がアセチル基で保護されたグルコースとFmoc-Cys-OAllとを酸性条件下においてグリコシル化し、Fmoc-Cys(Glc•Ac_4)-OAllを得た。続いて、Allyl基を脱保護することによって、Cys残基側鎖にGlcを有するFmoc-Cys誘導体を合成した。このCys誘導体をを用いてFmoc固相合成法によってペプチド鎖を合成した。その際、4個のCys残基のうちCys^2およびCys^{36}にはTrityl (Trt)基を、Cys^{14}およびCys^{29}にはAcetamidomethyl (Acm)基を側鎖保護基として用いた。トリフルオロ酢酸(TFA)混合溶液による樹脂からの切り出し、およびアミノ酸残基側鎖保護基の脱保護後、ジエチルエーテルによってペプチドを沈殿させた。それを、ヒドラジンとDMSOを含む水溶液に溶解して一晩撹拌することによって、糖部分のアセチル基の脱保護と同時に、Cys^2-Cys^{36}のジスルフィド結合を形成させた。最後に、Acm基をヨウ素によって酸化的に切断することによってCys^{14}-Cys^{29}間のジスルフィド結合を形成し、目的とするsublancinの全合成を達成した。本発表では、その詳細について報告する。

1) Oman, T. J. *et al*. (2011) *Nat*. *Chem*. *Biol*. **7**, 78-80.

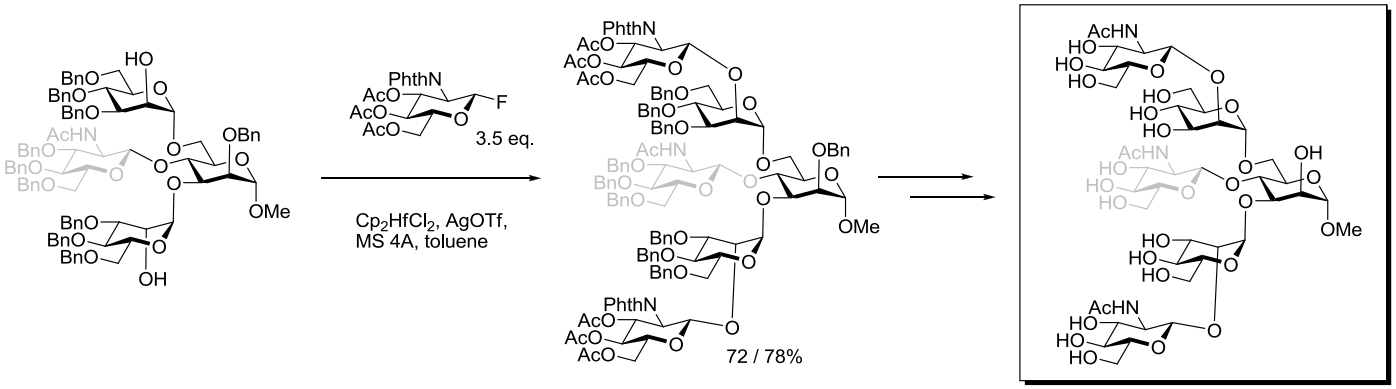
Bacillus sabtilis, *S*-glycoside, sublancin

講演番号：2A32p11
講演日時、会場：3月23日15:49～ A校舎32会場

bisectingGlcNAcをもつ複合型糖鎖部分構造の合成とNMRを用いた構造解析

○花島 慎弥、山口 芳樹（理研ASI・糖鎖構造）
○Shinya Hanashima, Yoshiki Yamaguchi (RIKEN ASI)

【目的】哺乳動物の複合型糖鎖の一部は、ゴルジ内に存在するGnT-IIIの作用によりβ-GlcNAcがコアマンノースの4位に付加された構造として存在する。このbisectingGlcNAcを含む糖鎖は、細胞接着を担うタンパク質の機能を制御してガン細胞の転移能を低下させることが知られている。また、bisectingGlcNAcは分枝の根元に付加され、複合型糖鎖の立体構造、特に(1-6)分枝の回転を制限することが計算化学的手法により示唆されている。そこで、このbisectingGlcNAcを含む複合型糖鎖の構造と機能の相関をNMRを用いて明らかにすることを目的とする。
【方法と結果】bisectingGlcNAcを有する糖鎖構造と対応するbisectingGlcNAcを持たない糖鎖のNMRスペクトルをセットとして比較することで研究を進め、双方の違いを明らかにする。本研究に使用する複合型糖鎖部分構造は化学合成により得た。まずbisectingGlcNAcを有する4糖と対応する3糖を合成、脱保護し、目的の糖鎖構造のセットを得た。続いて同じ出発原料を受容体として用い、フッ化糖を供与体として用いることでグルコサミン残基をマンノース2位に一挙に導入した。続いてフタルイミド基をアセトアミド基に変換したのち、アセチル基、ベンジル基を順次除去して目的の6糖ならびに5糖のセットを得た。合成した複合型糖鎖部分構造に関して全ての^{1}H, ^{13}C-NMRシグナルの帰属をおこなった。コア部分の構造の違いを明確にするため、bisectingGlcNAcを有する4糖と対応する3糖の^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルを比較した結果、コアマンノースの1、3位ならびに(1-3)、(1-6)分枝マンノースのアノマー位のシグナルの化学シフトが特に異なることが明らかとなった。続いて、bisectingGlcNAcを有する6糖と対応する5糖の^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルを比較した場合、(1-3)、(1-6)分枝上の二つのGlcNAcに由来するシグナルが6糖では分離している一方、5糖では完全に重複して観測された。これらの結果を併せるとbisectingGlcNAcは分岐部を中心に糖鎖構造に有意な影響を与えることが示された。



N-glycan, bisecting GlcNAc, NMR

講演番号：2A32p12
講演日時、会場：3月23日16:10～ A校舎32会場

分子内アグリコン転移反応を利用した、*Upis ceramboides* 由来キシロマンナン不凍多糖の合成研究と構造解析

Synthetic study and structural analysis of antifreeeze agent xylomannan from *Upis ceramboides*

○石渡明弘、櫻井絢花、伊藤幸成[1]（理研・基幹研、[1]ERATO・JST）
○Akihiro Ishiwata, Ayaka Sakurai, Yukishige Ito[1] (RIKEN・ASI, [1]ERATO・JST)

【目的】近年、タンパク質を含まない新規な不凍活性物質キシロマンナンが発見された。従来、不凍活性物質は、従来ペプチド骨格を基本としたタンパク質や糖タンパク質がみいだされていたが、新規キシロマンナンは、マンノースとキシロースの二糖の β-(1→4) 結合の繰り返し構造を基本骨格とする多糖でペプチド骨格を持たないと推測されている。しかし、三次元構造や分子量などの構造の全貌は、未だ明らかになっていない。そこで本研究ではキシロマンナン多糖の合成研究の一環として、４糖構造の構築検討、及びその構造解析研究を行うこととした。

【方法と結果】キシロマンナンの合成にあたり、β-マンノシル-(1→4)-キシロシドを共通ユニットとしてまず構築した後に、フラグメントカップリングし鎖長を伸長する計画とした。２糖ユニットは合成上困難な β-マンノシドを有し、当研究室で開発した、ナフチルメチルエーテル (NAP) を介した分子内アグリコン転移 (IAD) を利用し、検討をおこなうこととした。従来、IADを含め、立体選択的 β-マンノシル化の達成には、4,6 位の環状保護基が必須であったが、NAP-IAD を用いた場合、4,6 位が環状保護基でないマンノース供与体を用いた場合でも、効率的にβ-選択的にマンノシル化が進行し、β-マンノシドが立体選択的に得られることを見いだした。目的の β-マンノシル-(1→4)-キシロシドの他、*N*-結合型糖タンパク質糖鎖の還元末端３糖誘導体（$Man_1GlcNAc_2$）の合成にも成功した。得られた共通 β-マンノシル-(1→4)-キシロシド中間体より２糖供与体、および２糖受容体へ誘導し、それらのフラグメントカップリングにより、キシロマンナン４糖フラグメントの合成を行った。合成４糖を用いた NMR 解析の結果、キシロマンナンは、→4)-β-キシロシド、→4)-β-マンノシドなどの内部構造を含むことが明らかとなり、推定構造を支持した。また、分子モデリングの結果、いくつかの分子内残基間水素結合が示唆された。β-(1→4) 結合を有する代表的なセルロースと比べた場合、キシロマンナンは、キシロースの６位ヒドロキシルメチル基が欠乏し、かつ、マンノース２位ヒドロキシ基がアキシアル配向であるために、親水面、疎水面が、大きく異なることが示唆された。このような２面性の影響など、不凍活性発現の機構の詳細は不明であるが、ヒドロキシル基の間隔が、氷結晶の水分子の間隔とは異なっているので、ヒドロキシ基が氷結晶構造に入り込んだ結晶成長阻害ではないと推測している。

Stereoselective glycosylation, antifreeze, structural analysis

講演番号：2A32p13
講演日時、会場：3月23日16:21～ A校舎32会場

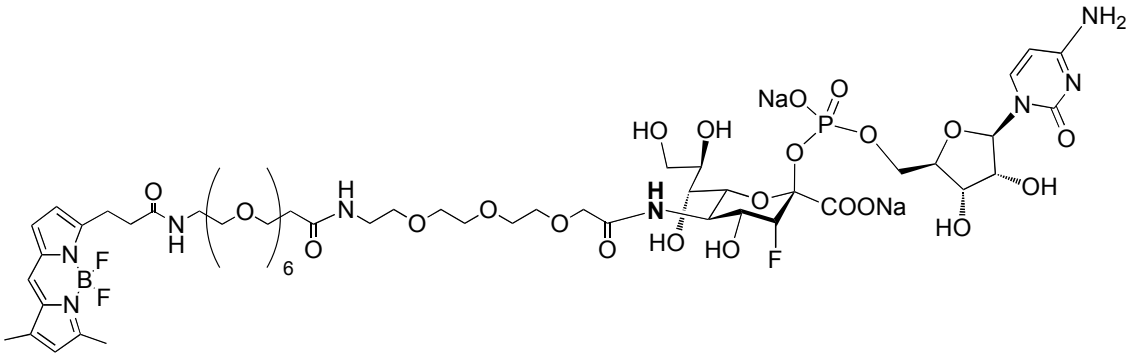
3"-F-CMP-Sia 誘導体の細胞内における挙動に関する検討

Behavior of BODIPY labeled 3"-F-CMP-Sia derivative in living cells

○鈴木克彦[1,2]、大竹敦子[1,2]、大黒周作[1,2]、蟹江治[1,2,3]、伊藤幸成[1,2]（[1]ERATO JST、[2]理研･基幹研、[3]東海大･糖鎖研）

○Katsuhiko Suzuki[1,2], Atsuko Ohtake[1,2], Shusaku Daikoku[1,2], Osamu Kanie[1,2,3], Yukishige Ito[1,2]（[1]ERATO JST、[2]RIKEN ASI、[3]Tokai Univ）

CMP-シアル酸（CMP-Sia）は糖タンパク質および糖脂質の生合成におけるシアル酸供与体であり、核内で合成され核膜・ゴルジ膜を通過してゴルジ装置に運ばれるとさている。CMP−3”-フルオロシアル酸（3"-F-CMP-Sia）は、in vitro でのシアル酸転移酵素阻害として報告された化合物であり、CMP-Sia との構造類似性から CMP-シアル酸輸送体にも何らかの作用があるものと考えられるが、それについては明らかにされていない。我々は、このような糖鎖生合成の基質類似体が未だ謎が多いゴルジ体機能の理解につながるのではないかと期待しており、細胞内での挙動やはたらきを探る道具として蛍光官能基 BODIPY を結合した 3"-F-CMP-Sia 誘導体（１）を合成し、これまでに、PC-12D 細胞への導入したこの化合物が一定時間後にゴルジ付近に局在することなどを報告している。今回は、この細胞内動態をより詳しく理解するために BODIPY 標識 3"-F-CMP-Sia 誘導体のゴルジ体への取り込みと細胞内糖鎖生合成への影響について検討した結果について報告する。



1

Keyword1: CMP-sialic acid, Keyword2: living cells, Keyword3: fluorescent probe

講演番号：2A32p14
講演日時、会場：3月23日16:32～ A校舎32会場

酸化－還元法を用いた *N*-結合型糖鎖部分構造 Glc_3Man_3 の合成

Synthesis of hexasaccharide Glc_3Man_3 using oxidation-reduction method

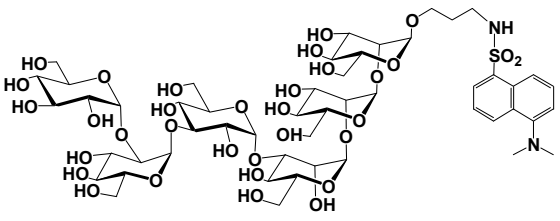
○飯野 健太、岩本 将吾、笠原 佑太、西川 淳[1]、殿塚 隆史[1]、伊藤 幸成[2,3]、松尾 一郎（群大院・工、[1]東農工大院・農、[2]理研、[3]ERATO JST）

○ Kenta Iino, Shogo Iwamoto, Yuta Kasahara, Atsushi Nishikawa[1], Tonozuka Takashi[1], Yukishige Ito[2,3], Ichiro Matsuo (Gunma U., [1]TUAT, [2]RIKEN, [3]ERATO JST)

【目的】小胞体に局在するプロセシング α-グルコシダーゼ I（E.C. 3.2.1.106）は *N*-結合型糖鎖のプロセシングにおいて 14 糖非還元末端部分にある α-1,2 結合したグルコースを 1 残基切断する糖加水分解酵素である [1)]。我々は、酵素活性測定を行うためのプローブを有機合成法を用いて供給し、α-グルコシダーゼ I の基質特異性解明を目指している。本発表では *N*-結合型糖鎖部分構造 Glc_3Man_3**1** の合成について報告する。

【方法】6 糖 **1** は非還元末端部分から、α-グルコシド結合でつながった 3 残基のグルコースと、α-マンノシド結合でつながった 3 残基のマンノースからなる。α-マンノシド結合は隣接基関与を用いることで容易に構築できるが、1,2-*cis* グルコシド結合の構築は立体制御が困難である。そこで我々は、6 糖に存在する 3 連続した α-1,2-*cis* グルコシド結合を、隣接基関与を用いて立体選択的に α-マンノシド結合を構築後、酸化−還元法により 2 位水酸基の立体を Man 型から Glc 型へと反転し構築することとした。

【結果】還元末端側からマンノースを順次カップリング、保護基の変換を行い 4 糖 Man 体へと導いた。得られた 4 糖 Man 体を用いて酸化－還元法による水酸基の反転反応の検討を行った（図 2）。4 糖 Man 体の 2 位水酸基を DMSO, Ac_2O を用いて酸化しケトン体へと導き、得られたケトン体を還元することで Glc 体へと導いた。還元反応の選択性は HPLC を用いて解析した。ケトン体の還元反応条件を種々検討した結果、THF 中 $NaBH(OAc)_3$ を用いることで Glc 体が高選択的に得られることが明らかとなった。得られた Glc 体の保護基の変換、マンノース供与体のカップリング、DMSO 酸化、$NaBH(OAc)_3$ による還元反応を繰り返すことで目的の 6 糖骨格を合成した。得られた 6 糖の保護基を除去、還元末端部分にリンカーを介してダンシル基を導入することにより、全 40 工程で α-グルコシダーゼ I の基質となる **1** の合成に成功した。



1

図 1：目的の 6 糖構造

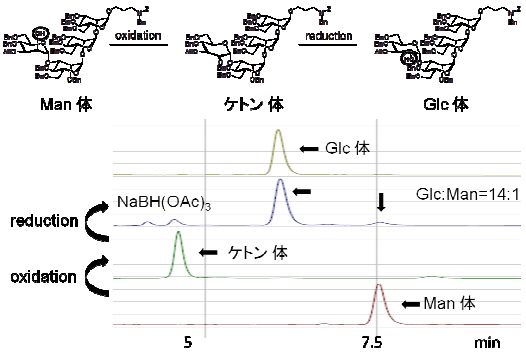


図 2：4 糖における水酸基反転反応の HPLC 分析

1) Tonozuka T. *et.al.*, *Glycoconjugate J.*, **2011**, *28,* 563-571

α-glucosidase I, 1,2-*cis* linkage, oxidation-reduction

講演番号：2A32p15
講演日時、会場：3月23日16:43～ A校舎32会場

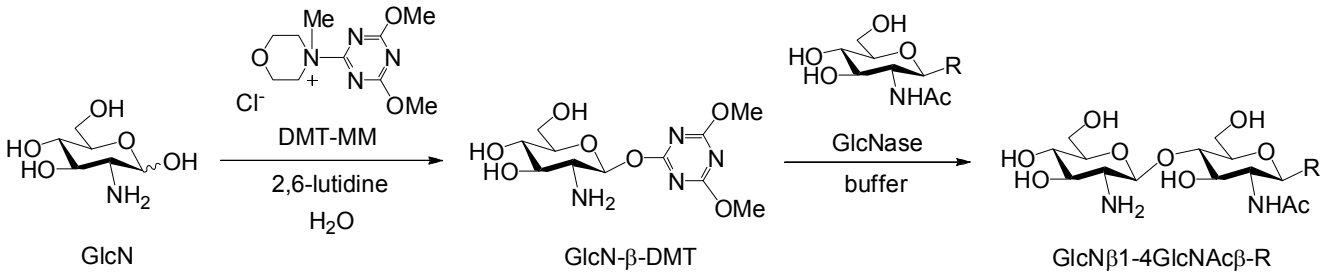
一段階合成可能なDMT糖を利用するアミノオリゴ糖の化学-酵素合成

Chemo-enzymatic Synthesis of Amino Oligosaccharides by Using One-step Preparable DMT-glycosides

○田中知成[1,2]、和田有効[2]、野口真人[2]、小林厚志[2]、大沼貴之[3]、深溝慶[3]、正田晋一郎[2]（[1]京工繊大院・工芸、[2]東北大院・工、[3]近畿大・農）

○Tomonari Tanaka[1,2], Tomonori Wada[2], Masato Noguchi[2], Atsushi Kobayashi[2], Takayuki Ohnuma[3], Tamo Fukamizo[3], Shin-ichiro Shoda[2] ([1]Kyoto Institute of Technology, [2]Tohoku University, [3]Kinki University)

【目的】糖加水分解酵素を用いるグリコシル化反応の収率の向上には、*p*NP糖やフッ化糖などの活性化ドナー基質の利用が有効である。しかしこれらの調製には、ヒドロキシ基の保護が必要な多段階で煩雑な有機合成法が不可欠である。Exo-β-D-glucosaminidase (GlcNase)を触媒とする糖転移反応においては、活性化ドナー基質の入手が困難であるため、キトサンやキトサンオリゴ糖を基質とした報告例がほとんどであり、糖転移生成物の収率は非常に低い。本研究では、水溶性脱水縮合剤である4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-morpholinium chloride (DMT-MM)を用いて一段階で簡便に4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl glycoside(DMT糖)を合成し、DMT糖をドナー基質とした*Amycolatopsis orientalis*由来GlcNaseによる糖転移反応を試みた。
【方法・結果】D-グルコサミン(GlcN)水溶液に、2当量のDMT-MMと2,6-ルチジンを加えて室温で24時間攪拌し、4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl β-D-glucosaminide (GlcN-β-DMT)を収率43%で一段階合成した。得られたGlcN-β-DMTは、酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)中でGlcNaseにより速やかにGlcNと2-hydroxy-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazineに加水分解された。さらに、糖アクセプターへの転移反応を検討したところ、pH 4.0の時に収率が最大となり、*N*-アセチルグルコサミンのチオピリジル誘導体(GlcNAcβ-SPy)、キトビオースおよびそのチオピリジル誘導体、キトサンダイマーへの糖転移生成物が、各々9%、39%、25%、27%の収率で得られた。得られた生成物はいずれもβ1-4結合生成物であった。また、D-ガラクトサミン(GalN)から一段階合成したGalN-β-DMTもGlcNaseにドナー基質として認識され、GlcNAcβ-SPyへの転移生成物が収率7%で得られた。



Scheme 1　DMT糖の一段階合成と酵素的グリコシル化反応.

glucosamine, transglycosylation, chitosanase

講演番号：2A32p16
講演日時、会場：3月23日16:54～ A校舎32会場

2-デオキシ-*scyllo*-イノソース（DOI）を原料としたカルバ-β-D-マンノースとカルバ-β-D-*N*-アセチルマンノサミンの合成研究

A study on synthesis of 5a-carba-β-D-mannopyranose and 5a-carba-β-D-*N*-acetylmannosamine from 2-deoxy-*scyllo*-inosose

○館田 尚家、宮崎 達雄、有坂 和也、狩野 達也、鰺坂 勝美 （新潟薬大・応生科）
○Naoya Tateda, Tatsuo Miyazaki, Kazuya Arisaka, Tatsuya Kano, Katsumi Ajisaka
（Department of Applied life Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences）

【目的】糖の環酸素原子をメチレン基に置き換えたカルバ糖は、糖とよく似た三次元構造をとっているが、糖のようにヘミアセタール部分を持たないので水溶液中で変旋光を示さない化合物である。つまり、カルバ糖は相当する糖のα体、またはβ体のミミック分子として機能することが期待される物質である。そのためカルバ糖は、糖質関連酵素の基質認識機構を詳細に解明するために利用されている。しかしながら、効率的にグラムスケールにて合成可能なカルバ糖はカルバ-β-D-グルコースとカルバ-α-D-ガラクトースなどのみであるため、多種多様なカルバ糖を糖鎖生物学研究の試料として十分提供できるには至っていない。またカルバ糖の生理活性に関しても未知の部分が多いのが現状である。そのため、当研究室では近年微生物による物質変換技術を利用することで数百グラムスケールでの合成が可能となった2-デオキシ-*scyllo*-イノソース（DOI）を出発原料とした系統的なカルバ糖合成研究を展開している。初めにDOIの有する四つのヒドロキシ基の立体配置をそのまま利用することで、カルバ-β-D-グルコースとカルバ-α-L-イドースの効率的な合成を達成した（*Glc*：47%, 8工程、*Ido*：48%, 8工程）。昨年度は、DOIを2工程にて1,3-di-*O*-Piv体へと変換したのちに再度ピバロイル化することで1,2,3-tri-*O*-Piv体（70%）と1,3,4-tri-*O*-Piv体（12%）を一挙に合成し、その後、ヒドロキシ基の反転反応、Wittig反応、ヒドロホウ素化反応を順次行うことでカルバ-β-D-ガラクトースとカルバ-β-D-マンノースの合成に成功した。しかしながら、カルバ-β-D-マンノースの合成は、副生成物である1,3,4-tri-*O*-Piv体（12%）を合成原料に利用していたので、総収率が0.2%（13工程）と非常に低かった。そこで、本発表では効率的なカルバ-β-D-マンノースの合成を検討した結果について述べる。併せてカルバ-β-D-*N*-アセチルマンノサミンの合成研究についても述べる。

【方法及び結果】1,3-di-*O*-Piv体に対するピバロイル化反応の結果から、2位ヒドロキシ基の反応性は4位よりも高いことが示唆される。そこで2位のヒドロキシ基に位置選択的に脱離基を導入後に立体反転をするルートを検討した。トリフレート化反応は予想通り2位優先的に進行したが、得られた生成物は非常に不安定であった。一方、副生成物として得られたジトリフレート体は比較的安定であった。これらの知見は遊離のヒドロキシ基が化合物の安定性に関与していることを示唆していた。そこでトリフレート化後にアセチル化し、続いて酢酸セシウムによる反転反応を試みることとした。その結果、2位反転体を中程度の収率にて得ることに成功した（56%）。一方、同手法はアジ化ナトリウムを求核剤として用いた場合も良好な収率で目的物を与えた（68%）。

2-Deoxy-*scyllo*-Inosose, Carbasugar, 5a-carba-β-D-mannopyranose

講演番号：2A32p17
講演日時、会場：3月23日17:15～ A校舎32会場

マイコプラズマ肺炎関連医療材料の創製に向けた*M. pneumoniae*由来グリセロ糖脂質の合成研究

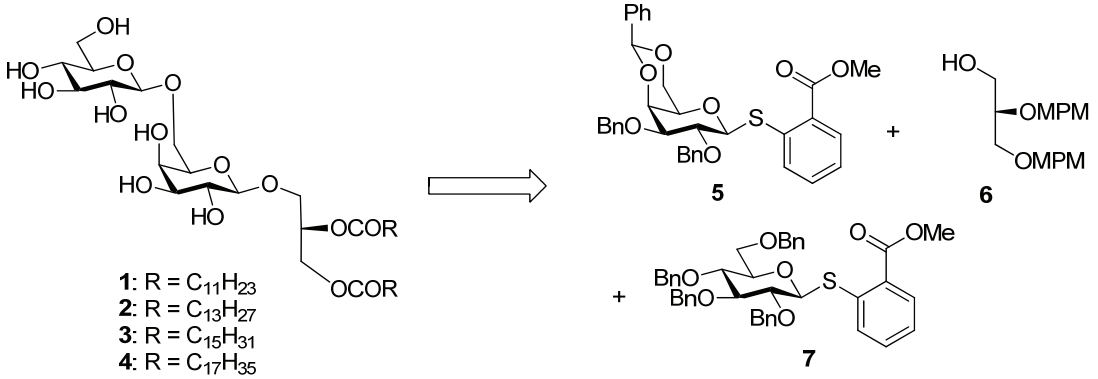
Synthetic study of glyceroglycolipids from *M. pneumoniae* for development of mycoplasma pneumonia related biomedical materials

○福田 和男[1]、土肥 博史[2]、田村 真奈美[3]、松田 和洋[4,5]、西田 芳弘[2]（[1]千葉大院・園芸、[2]千葉大院・融合科学、[3]千葉大・園芸、[4]慶大・医、[5]エム バイオ テック）

○Kazuo Fukuda[1], Hirofumi Dohi[1], Manami Tamura[1], Kazuhiro Matsuda[2,3], Yoshihiro Nishida[1] ([1]Chiba University, [2]School of Medicine, Keio University, [3]M Bio Technology Inc.)

【目的】*Mycoplasma pneumoniae* を原因菌とするマイコプラズマ肺炎は、近年感染者数が増加傾向にある。*M. pneumoniae* から単離されたグリセロ糖脂質 GGL（Glcβ1−6Galβ1DAG）は、*M. pneumoniae* 特有の抗原であることが明らかとなっているため、マイコプラズマ肺炎に対する正確な診断法の開発に重要な鍵化合物であり、リポソーム化することでワクチンへの応用も期待される。しかしながら、天然の GGL は脂質鎖長が均一でなく分離・精製が困難であるため、大量供給には化学合成法が望ましい。本研究では、GGL を用いたマイコプラズマ肺炎関連医療材料の開発に向けた GGL の大量合成法の確立、および最適な脂質鎖長を探索することを目的として、脂質鎖長の異なる GGL 群 **1**−**4** を設計し、これらを効率的に合成する方法を検討した。

【方法・結果】当研究室で開発した調製時に不快臭を発しないチオサリチル酸メチルグリコシドを用いて目的化合物群の合成を試みた。まず、チオサリチル酸メチルガラクトシルドナー**5**と(*s*)−グリシドールから誘導したグリセロールアクセプター**6**を用いて、立体選択的なグリコシル化を行ってβ−ガラクトシドを得た。得られたβ−ガラクトシドの6位水酸基を遊離した後、チオサリチル酸メチルグルコシド**7**とβ−選択的なグリコシル化反応を行って、グリセロ二糖を構築した。得られた二糖のMPM基を選択的に除去後、鎖長の異なる脂肪酸をそれぞれ導入し、水素添加により脱ベンジル化することで目的化合物**1**−**4**を得た。さらなる効率的合成法の確立を目的として、煩雑な合成法を伴う(*s*)−グリセロール骨格をβ−アリルガラクトシドに対する酸化反応によって構築することを試みた。その結果、mCPBAを用いたエポキシ化が最も高い収率およびジアステレオ選択性を示した。



mycoplasma pneumonia, mycoplasma lipid antigens, glycosylation

講演番号：2A32p18
講演日時、会場：3月23日17:26～ A校舎32会場

セレン標識糖鎖の合成と糖鎖-蛋白質複合体の立体構造解析への応用

Synthesis of Selenium-containing glycan probes and its application for the X-ray structural analysis of glycan-protein complex

○鈴木 達哉[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、牧尾 尚能[3]、山田 悠介[3]、加藤 龍一[3]、若槻 壮市[3]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS、[3]高エネ機構・放射光）

○Tatsuya Suzuki[1,2], Hiromune Ando[1,2], Hisayoshi Makio[3], Yusuke Yamada[3], Ryuichi Kato[3], Soichi Wakatsuki[3], Hideharu Ishida[1], Makoto Kiso[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS, [3]KEK-PF)

【目的】糖鎖の高次機能発現には糖鎖‐蛋白質複合体の形成が重要であり、その認識複合体の立体構造情報の取得は、分子レベルでの糖鎖の生物学的意義の解明において不可欠である。近年、セレン原子の異常散乱性を利用する X 線結晶構造解析法（MAD 法、SAD 法）は、蛋白質、核酸の立体構造解析を飛躍的に進展させている。しかしそのためには、蛋白質をセレン含有培地で発現させるなど時間と手間のかかる作業が必要で、セレン標識が上手く行かないこともあった。そこで我々は、セレン標識した糖鎖が糖鎖‐蛋白質複合体の X 線結晶構造解析に有効ではないかと発想した。本研究では、このコンセプトの有用性を証明するために、ガレクチン 9 のリガンドとなるラクトースの水酸基の酸素原子をメチルセレノ基で置換したセレノラクトースを合成し、ガレクチン 9 との共結晶化、MAD 法および SAD 法による X 線結晶構造解析を試みることとした。

【方法及び結果】メチルセレノ基の導入が及ぼす蛋白質の糖鎖認識への影響を検証するため、ラクトースのグルコース残基の 6 位またはガラクトース残基の 6’位にメチルセレノ基を導入したラクトース誘導体を、当研究室で開発したセレン導入法を鍵反応として合成した。また、蛍光偏光測定法によりヒト由来ガレクチン 9 の N 末端 CRD（糖鎖結合ドメイン）との親和性測定を行うために、アグリコン部の末端に蛍光分子を結合させた類縁体も合成した。蛍光偏光測定法によるガレクチン 9 との結合試験の結果では、6’位セレノ体はガレクチン 9 に結合せず、6 位セレノ体は通常のラクトースと同程度にガレクチン 9 に結合することが明らかとなった。結合試験の結果と同じく、ヒト由来ガレクチン 9 の N 末端 CRD との共結晶化では、6’位セレノ体からは共結晶は得られず、6 位セレノ体からは共結晶を得ることができた。得られた共結晶について放射光ビームラインを用いて X 線結晶構造解析を行ったところ、MAD 法および SAD 法により構造決定を行うことができた。決定できた立体構造は、我々が過去に報告したヒト由来ガレクチン 9 N 末端 CRD の結晶構造解析の結果と同様であった。これらのことから、セレン標識糖鎖が X 線結晶構造解析の位相決定分子ツールとして有用であることが示された。

Glycan, Selenium, X-ray crystallography

講演番号：2A32p19
講演日時、会場：3月23日17:37～ A校舎32会場

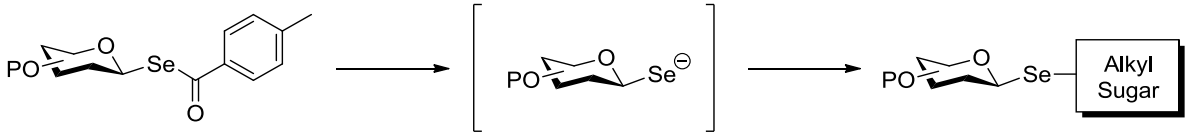
シアル酸セレノグリコシドの合成と加水分解酵素に対する耐性の検証

Synthesis of selenoglycosides as hydrolytically stable pseudoglycosides and examination of their resistancy toward sialidases

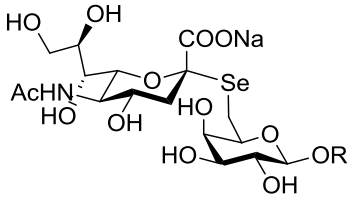
○林 知衣香、安藤 隆幸[1]、毛受 雅典[2]、安藤 弘宗[1]、石田 秀治、木曽 真[1]（岐阜大・応用生物、[1]京都大・iCeMS、[2]岐阜大・工）

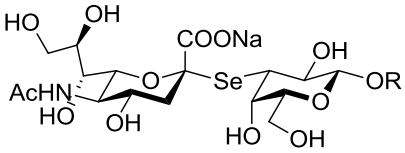
○Chieka Hayashi, Takayuki Ando[1], Masanori Menjo[2], Hiromune Ando[1], Hideharu Ishida, Makoto Kiso[1] (Gifu Univ., [1]iCeMS, [2]Gifu Univ.)

【目的】天然糖鎖の*O*-グリコシド結合は、生体内で糖加水分解酵素による分解を受け速やかに代謝されてしまうため、グリコシド結合の酸素原子を硫黄や炭素、窒素などの原子によって置換し、加水分解酵素耐性を付与した糖鎖ミミック（擬似糖鎖）が開発され、それらの医薬品への応用が試みられている。我々は、セレン導入試薬と1-ハロ糖とのS_N2反応によって得られる*p*-トルオイルセレノグリコシドをアミンで活性化し、系中にセレノラートアニオンを発生させた後に求電子剤と反応させることで、*Se*-グリコシド結合を立体選択的に合成する方法を報告してきた。本研究ではこの手法を応用して、糖鎖の機能発現に重要な役割を果たすシアル酸の*Se*-グリコシドを合成し、シアロシドミミックとしての機能評価を行うことを目的とした。



【方法及び結果】セレノシアロ糖鎖の合成に向けて、シアリルセレノラートアニオン前駆体となる基質の合成を行った。シアル酸β-塩素体および求核的セレン導入試薬であるセレノトルオイル酸無水物とのS_N2反応により、α-*p*-トルオイルセレノシアロシドを合成した。さらに、これをPiperazineにより活性化して系中でシアリルセレノラートアニオンとし、種々の求電子剤と反応させることにより、各種α-セレノシアロシドの合成を達成した。同様に、6位および3位に脱離基を有するガラクトース誘導体およびグロース誘導体を求電子剤とすることで、*Se*-グリコシド結合を有するシアリルガラクトース骨格の構築にも成功した。次に、脱保護したセレノグリコシドを用いて、シアリダーゼによる加水分解実験を行い、シアリダーゼ耐性について評価したので、その結果についても報告する。





Selenoglycoside, Sialic acid, Sialidase

講演番号：2A32p20
講演日時、会場：3月23日17:48～ A校舎32会場

DDSを指向した糖修飾リポソームの合成と機能評価

Synthesis and evaluation of glyco-coated liposomes as drug carrier for positive targeting in DDS

○植木 章晴[1,2]、美濃 由佳[1]、運 敬太[3]、吉田 允[3]、川上 茂[3]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、山下 富義[3]、橋田 充[2,3]、木曽 真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS、[3]京都大・薬）

○Akiharu Ueki[1,2], Yuka Mino[1], Keita Un[3], Mitsuru Yoshida[3], Shigeru Kawakami[3], Hiromune Ando[1,2], Hideharu Ishida[1], Fumiyoshi Yamashita[3], Mitsuru Hashida[2,3], Makoto Kiso[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS, [3]Kyoto Univ.)

【目的】薬物輸送システム（DDS）は標的とする臓器および細胞へ特異的に薬物を送達することが可能であり、その中でもがん、および肝臓病などの難治性の疾病に対する治療法として非常に有用な手法の一つである。ある種の細胞では、糖鎖を特異的に認識する受容体が細胞表面に多数発現することが知られている。近年、我々のグループでは、このような糖鎖受容体を細胞表面に有する肝細胞を標的とした糖鎖修飾リポソームを利用するDDS法の開発を行なっており、修飾糖鎖に対応する受容体を有する肝細胞への選択的な取り込み作用、および薬物送達の機能評価を行なってきた。その結果、β-ガラクトース、β-マンノース、あるいはα-フコースで修飾されたコレステロール誘導体を認識部位とする糖鎖修飾リポソームは、それぞれ対応した受容体を有する肝細胞に特異的に結合することが明らかとなった。また、これらの糖修飾コレステロール誘導体は結合構造としてアミジン基を有しており、カチオン性リポソームを用いる核酸との複合体形成において、その含有量に関わらず良好な結果を与えることがわかった。しかしながら、そのアミジン構造由来の正電荷は、細胞膜表面へ非特異的に結合する可能性があり、また、その合成段階において酸性糖の導入が困難であると考えられた。そこで今回我々は、アミジン構造をアミド構造へと変換した新規中性型糖修飾コレステロール誘導体および糖鎖修飾リポソームの合成を検討するとともに、各種標的細胞への特異的取り込み作用における機能評価を行うこととした。

【方法】既知化合物であるグリコシルチオアセテートを出発原料としβ-Gal-、α-Man-、β-Man-、α-Fuc-S-$(CH_2)_3$-NHBocをそれぞれ合成した。これを別途合成したβ-アラニル-コレステロール誘導体と縮合した後、脱保護を行い糖修飾コレステロール誘導体の合成に成功した。また、β-Man-S-$(CH_2)_3$-NHBocからマンノース6位選択的保護を行った後、コレステロールを導入した。脱保護、6位選択的リン酸化により6-ホスホ-マンノシルコレステロール誘導体の合成を達成した。

【結果】合成した糖修飾コレステロール誘導体、ホスファチジルコリン（DSPC）、コレステロールを用いてリポソームを作成し、対応する受容体を有する細胞内取り込みを評価した。今回合成したガラクトース、マンノース、およびフコースを担持する糖鎖修飾リポソームは以前のカチオン性リポソームに比べ特異的な結合量が増加する結果を与えた。また、各種受容体の阻害剤共存下ではその取り込み量が顕著に抑制されることから受容体を介する特異的取り込み作用を有することが示唆された。さらに、マンノース-6-リン酸を有するリポソームでは、対応する受容体を発現する癌細胞（B16BL6）に対する特異的結合能を有していることが明らかとなった。

Glycosyl cholesterol, Glyco-coated neutral liposomes, 6-Phospho-mannoside

講演番号：3C01a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ C校舎01会場

微細藻類からの *n*-アルカンを主成分とするバイオ燃料の生産：好熱性・嫌気性モデル栄養共生菌の培養の影響

Production of *n*-alkane rich biofuels from micro-algae：Effect of cultivation of a model syntrophic microbial system under thermophilic and anaerobic conditions.

◯山根國男、松山　茂、五十嵐健輔、内海真生、白岩善博、桑原朋彦（筑波大院生命環境）◯Kunio Yamane, Shigeru Matsuyama, Kensuke Igarashi, Motoo Utsumi, Yoshihiro Shiraiwa, Tomohiko Kuwabara (Graduate School of Life and Environmental Sciences, U. Tsukuba)

石油は地下の高温・高圧・嫌気性条件下で生成されると予想され、*n*-アルカンが主成分である。石油と類似したバイオ燃料を培養が簡単で成長の早い微細藻類から生産させることは、太古の地球における石油生成機構の解明だけでなく、現代の地球環境の維持・改善および我々の生活に必要なエネルギーを獲得するうえで重要である。地下の原油地層には微生物が生息し、主要な微生物は栄養共生する可能性がある嫌気性の細菌とアーキアであることを示してきた[1)]。微細藻類 *Arthrospira platensis* (*Cyanobacteria*), *Dunaliella tertiolecta* (*Chlorophyta*), *Euglena gracilis* (*Euglenophyta*), *Emiliania huxleyi* (*Haptophyta*)の乾燥粉末を硫黄が含まれない Tc 培地にけん濁後凍結融解・超音波処理し、成長が速く、CH_4 を高生産するモデル栄養共生菌(*Thermosipho globiformans* と *Methanocaldococcus jannaschii*)を嫌気性条件下で 68°C、9 日間培養した。凍結乾燥標品を真空中で加熱処理(300°C,4 日)後,クロロフォルムで抽出し、*n*-アルカン画分を得て、GC-MS で解析した。収量は *A. platensis* と *D. tertiolecta* では乾燥重量の 3~4%、*E. gracilis* では 5~6%、*E. huxleyi* では 8~9%であり、炭素数は前 3 者では 13~17 が主要であるのに対し、*E. huxleyi* では 13~35 であった。培養によって *n*-アルカン量が増大するだけでなく、不純物が減少した。

[1)] K. Yamane et al., FEMS Microbiol Ecol, 76:220(2011).

講演番号:3C01a02
講演日時、会場:3月24日09:11～ C校舎01会場

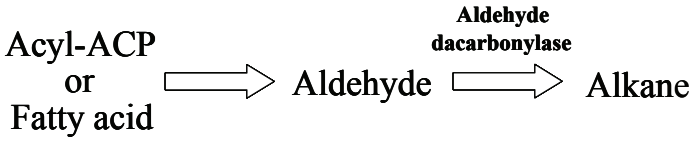
腸内細菌*Klebsiella sp.*からの新規アルカン合成遺伝子の単離と解析

Isolation and characterization of a novel synthetic gene of alkanes from *Klebsiella sp.*

○伊藤 正和、村松 正善（トヨタ自動車・ＦＰ部バイオラボ）
○Masakazu Ito, Masayoshi Muramatsu (Toyota Motor Corporation)

【目的】

近年、原油価格の高騰とその消費による二酸化炭素排出量増加の問題がクローズアップされている。これらの問題を解決するため、バイオエタノールを始めとする種々のバイオ燃料の研究が盛んに行われている。演者らは、自動車や既存インフラに改修を加えることなくガソリンや軽油に混合可能な燃料（Drop-in fuel）であるアルカンに着目し、微生物発酵によるアルカン製造法の確立を目指してきた。アルデヒドをアルカンに変換するデカルボニラーゼの研究例があることから、本研究では種々の微生物よりアルカン発酵のキー酵素であるデカルボニラーゼ遺伝子の探索を行ったので報告する。



【方法と結果】

アルカン前駆体と考えられるアルデヒド（終濃度1ｍM）を添加した培地で、種々の細菌・酵母を数日間培養し、培養液中のアルカンをGC-MSで分析することによってアルカン合成菌の探索を行った。その結果、*Escherichia*属や*Salmonella*属、*Klebsiella*属などの腸内細菌科の一群に、１μM程度アルカンを合成する株を発見した。

試験株の中で最も高いアルカン合成能を示したことから、*Klebsiella sp.*のゲノムＤＮＡを用いてアルカン合成遺伝子の探索を行った。まず、本菌株のゲノムＤＮＡより調製したフォスミドライブラリーを用いて形質転換した大腸菌をアルデヒド添加培地で培養した。その培養液をGC-MS分析することによりアルカン生産性の向上したクローンを探索したところ、約1,000クローンの中よりアルカン生産を有意に向上させるクローンを取得した。このクローンからフォスミドベクターを回収し、デリーションベクターを作製して遺伝子の特定を行ったところ、アルカン生産を向上させる遺伝子を特定することができた。塩基配列解析の結果、本遺伝子はアルデヒドデヒドロゲナーゼに特徴的なモチーフ配列を有することが判明した。また細胞抽出液を用いた酵素アッセイでは、本酵素は補酵素としてＮＡＤＨもしくはＮＡＤＰＨを利用してアルデヒドをアルカンに変換するアルカン合成酵素であることが明らかとなった。

biofuel, fatty acid, fermentation

講演番号：3C01a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎01会場

電気化学システムによる有機性廃棄物からの水素生成の制御

Electrochemical regulation of hydrogen production from the artificial garbage slurry

佐々木建吾、○佐々木大介[1]、森田仁彦[1]、松本伯夫[1]、大村直也[1]、石井正治、五十嵐泰夫
（東大院農生科・応生工、[1]電中研）
Kengo Sasaki, Daisuke Sasaki[1], Masahiko Morita[1], Norio Matsumoto[1], Naoya Ohmura[1], Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi (GSALS, The univ. of Tokyo, [1]CRIEPI)

【目的】有機性廃棄物を処理しエネルギーを回収するために嫌気処理が注目されている。微生物の生育には酸化還元反応がかかわっており、H型の電気化学システムを用いて通電する事により水素生成が起こる事を以前に報告した[1)]。本報告では、スケールアップに適したsingle-chamber型の電気化学システムを用いて、模擬有機性廃棄物からの水素生成に対する通電の効果について得られた知見を報告する。
【方法】模擬有機性廃棄物基質としてドッグフードスラリーを使用して55℃で連続運転した。電極として炭素板を使用し、3電極方式で通電した。また種汚泥として有機性廃棄物を嫌気処理していた汚泥を使用した。水理学的滞留時間を徐々に短くして有機物負荷量を上げていった。
【結果】有機物負荷量が19.6gCOD（化学的酸素要求量）/L/日において、水素生成速度530mL/L/日が観察され、電気化学的に予想される水素生成量よりも大きい速度であった。以上の結果より、single-chamber型の電気化学システムによる制御下において、有機物からの水素生成が起こっている事が明らかとなった。今後はさらに負荷量を上げて運転を行うつもりである。

1)　2011年日本生物工学会大会講演要旨集　p.125

electrochemical system, hydrogen fermentation, organic solid waste

講演番号：3C01a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎01会場

水素発酵過程における*Megasphaera*属の迅速モニタリング技術の開発

Rapid detection and quantification methodology for genus *Megasphaera* as a hydrogen producer in hydrogen fermentation system

○阿部 新子、板東 由起子、大西 章博[1]、藤本 尚志[1]、鈴木 昌治[1]
（東農大院農・醸造、[1]東農大・応生）
○Shinko Abe、Yukiko Bando、Akihiro Ohnishi[1]、Naoshi Fujimoto[1]、Masaharu Suzuki[1]
（Tounoudai・jozou、[1]Tounoudai・ousei）

【目的】

前報にて、生ごみを基質とした簡便な水素発酵システムにおいて、*Megasphaera elsdenii*が有用な水素発酵微生物である可能性を報告した。本発表では、*M. elsdenii* の迅速な検出及び定量化技術としてFuorescence *in situ* hybridization(FISH)法を適用し、水素発酵過程における挙動を解析するための技術開発を試みた。

【方法及び結果】

第１に*Megasphaera*属の５菌種に特徴的な16S rDNA配列を基にFISH Probeを設計し、５属１０種の近縁菌種との識別試験を行った。結果、FISH Probe Mega-Xは１ミスマッチの領域を有する*Anaeloglobus geminatus*との混合試料中からも*Megasphaera*属の細胞のみを明確に識別することが可能であった。このように*Megasphaera*属を迅速かつ特異的に検出するFISH ProbeとしてFISH Probe Mega-X（GACTCTGTTTTTGGGGTTT, 1315-1297）を開発した。

第２にこの FISH Probe Mega-X を用いた FISH 法により、生ごみを基質とした簡便な水素発酵システム中に存在する *M. elsdenii* のモニタリングを試みた。本システムは前処理や嫌気的な環境の制御といった工程を必要としない簡便な水素発酵システムであり、PCR-DGGE 解析により *M. elsdenii* が主な水素発酵微生物として示唆されている。また、HRT14~48h において 14.1~24.0 ml H_2/g VS の収率で水素を生産可能であった。これらの試料中の全細胞数と、*Megasphaera* 属菌種及びその他の微生物細胞の存在率を基に *M. elsdenii* の挙動を解析した。

解析の結果、HRT の変化に関係なく、*M. elsdenii* の細胞は 30~58%(1.07~1.92×10^8 cells/ml)と高い優占率を示した。また、本システムにおいて短い HRT(HRT16、14h)においても安定した水素発酵が保たれたことは、水素発酵を担う *M. elsdenii* が 10^8cells/ml 以上の高い個体数を維持していたことに起因するものと考えられた。特に水素発収率が高かった HRT48h(24.0ml H_2/g VS)では、*M. elsdenii* に対するその他の球菌、及びその他の桿菌の存在割合は、1：0.92：0.35であった。このように、FISH Probe Mega-X は、水素発酵過程における *M. elsdenii* の挙動を迅速にモニタリングするための技術論を提供する。

International Journal of Hydrogen Energy.doi:10.1016/j.ijhydene.2011.10.094
International Journal of Hydrogen Energy.doi:10.1016/j.ijhydene.2010.05.113
2011年度農芸化学会大会講演要旨集　p.172

Megasphaera, Mega-X, FISH

講演番号：3C01a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ C校舎01会場

りんご搾り粕を原料とした*Clostridium beijerinkii* HU-1株による水素生産

Hydrogen production from apple pomace by *Clostridium beijerinkii* HU-1

○鈴木　由麻[1]、佐藤　夕貴[1]、佐藤　圭[2]、林　成司[2]、園木　和典[1,2]
（[1]弘前大院農生・応生工、[2]弘前大農生・分子生命）
○Yuma Suzuki, Yuki Sato, Osamu Sato, George Hayashi, Tomonori Sonoki (Hirosaki Univ.)

【目的】エネルギーの生産とともに効率的な廃棄物処理が可能であるバイオマス（農産廃棄物）を原料とした水素生産の実用化には、微生物細胞や培養プロセスの改良による生産性の向上や安価かつ安定な原料供給が要求されるため、原料が排出される地域で地域の特性を考慮したプロセスを採用して生産することが重要である。青森県は、りんご搾り粕を始めとした未利用バイオマスが毎年豊富に排出される、熱水分布地域が多い、日照時間が少ないという特性を持つ。そのため青森県における水素生産方法は、光に依存した発酵プロセスではなく、りんご搾り粕等の未利用バイオマスに含まれる多様な糖類を原料とした暗発酵プロセスを選択することが望ましい。

我々はこれまでに、青森県土壌から*Clostridium* sp. HU-1株を単離した。HU-1株は、これまでに水素生産能力が報告されている*C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*の標準株と比較して、多様な栄養条件下で良好な増殖を示した。さらに、16SrDNA解析及び生理・生化学試験の結果から、*C. beijerinkii* HU-1株と同定した。本報告では、HU-1株の有する水素生産能力を評価し、さらなる効率生産に向けた検討結果について報告する。

【結果】対照に水素やブタノール生産能力が高いことが多数報告されている*C. beijerinckii* NCIMB8052株を用い、*C. beijerinckii* HU-1株の水素生産能力を評価した。グルコースを基質したFed-batchを行った結果、HU-1株は高い乾燥菌体重量あたりの水素収量及び水素生産速度を示した。特に、pH6における乾燥菌体重量あたりの水素収量（mmol/L/g-cell）及び生産速度（mmol/L/h）はそれぞれ、NCIMB8052株の1.5及び2倍の値を示した（Fig.1, 2）。HU-1株の糖資化性試験を行った結果、グルコース、キシロースなど主要な糖質に加え、りんご搾り粕に由来するガラクツロン酸の資化性も有していた。現在、りんご搾り粕の加水分解物を基質とした水素生産について検討を進めている。

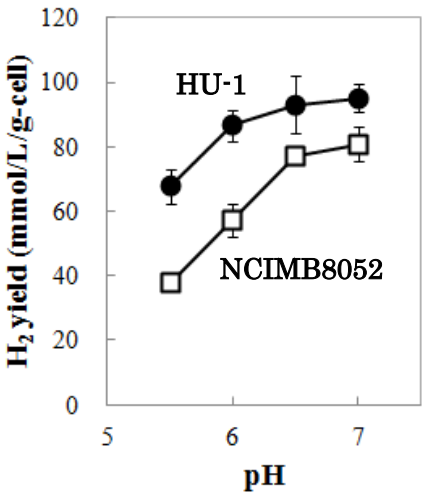


Fig.1 水素収率

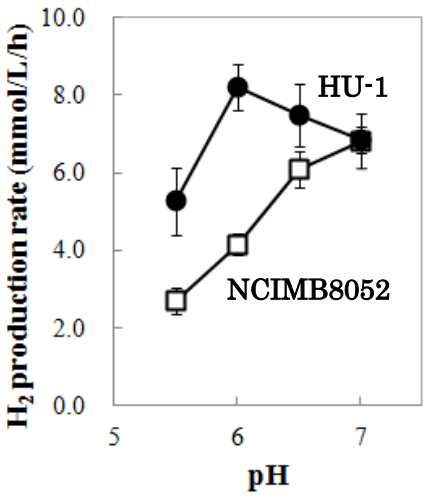


Fig.2 水素生産速度

本研究の一部は、弘前大学若手研究者支援事業の助成を受けて実施した。

hydrogen production, Clostridium , apple pomace

講演番号：3C01a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ C校舎01会場

超好熱始原菌*Thermococcus kodakarensis*での水素発生に関与するピルビン酸酸化経路の解析

Analysis of pyruvate-oxidation pathways involved in hydrogen evolution by hyperthermophilic archaeaon *Thermococcus kodakarensis*

○野原 健太、折田　和泉、中村　聡、今中　忠行[1]、福居 俊昭（東工大院生命理工・生物プロセス、立命館大[1]・生命科学・生物工学）

○Kenta Nohara, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Tadayuki Imanaka[1], Toshiaki Fukui Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. & Biotechnol., Tokyo Tech.,[1]Dept. Biotech., Col. Life Sci., Ritsumeikan Univ.）

【目的】クリーンな次世代エネルギーとして期待されている水素は、地球上に単体としてほとんど存在せず、現状では化石燃料を原料として生産されているため、未利用バイオマスや有機性廃棄物を原料とした微生物による発酵水素生産の研究が進められている。超好熱始原菌*Thermococcus kodakarensis*はピルビン酸やデンプンをエネルギー源とした硫黄非依存増殖の際に、還元型フェレドキシンを電子供与体、プロトンを電子受容体とする膜結合型ヒドロゲナーゼの作用により水素を発生するが、その菌体あたり水素発生能は他の微生物と比べて高いことがこれまでに示されている。本菌は全ゲノム配列が決定されており、また遺伝子操作系が確立されているため発酵水素生産を目的とした分子育種の対象として適している。本研究では*T. kodakarensis*での水素発生に関与するピルビン酸酸化経路について解析した。

【方法】遺伝子組換えの宿主株として*T. kodakarensis* KUW1株（Δ*pyrF*, Δ*trpE*）を用い、選抜マーカー*pyrF*を有するベクターを用いたpop in-pop out相同性組換えにより目的遺伝子を破壊した。水素発生能の検討では、ピルビン酸を添加した人工海水栄養豊富培地100 mlを用いて*T. kodakarensis*を85℃で10時間培養し、発生した気体をアルミニウムバッグで捕集した。捕集した気体の体積を水上置換法によって測定し、ガスクロマトグラフィーにより測定された捕集気体の水素濃度から水素発生量を求めた。

【結果】*T. kodakarensis*や近縁の*Pyrococcus*属ではピルビン酸の酸化はピルビン酸：フェレドキシン酸化還元酵素（PorGDAB）によるものと推測されている。一方、*T. kodakarensis*では*Pyrococcus*属にない固有遺伝子としてピルビン酸：ギ酸リアーゼおよび活性化酵素（PflDA）の遺伝子を有しており、PorGDABによる酸化に加えてギ酸を経由した酸化経路の存在も推測されているが、その詳細は検討されていない。そこで、それぞれの遺伝子を破壊したΔ*por*株とΔ*pfl*株、および二重破壊株ΔΔ*pfl_por*株をそれぞれ作製した。各破壊株について生育能および水素発生能の検討を行ったところ、Δ*pfl*株は宿主株と同程度の生育速度および水素発生能を示した一方で、Δ*por*株とΔΔ*pfl_por*株は生育速度の明らかな低下とともに、水素発生能の著しい低下が確認された。この結果から*T. kodakarensis*でのピルビン酸酸化は主にPorGDABが担っており、PflDAはほとんど寄与していないことが強く示唆された。

Thermococcus kodakarensis , hydrogen production, pyruvate metabolism

講演番号：3C01a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎01会場

藻類バイオ燃料の実用化に向けた、油脂高生産変異株の単離と解析

Isolation of mutants of *Pseudochoricystis ellipsoidea* with increased oil productivity for biofuel production

○井出　曜子、原山　重明（中大・理工）
○Yoko Ide, Shigeaki Harayama (Chuo Univ.)

【目的】Biofuel production from microalgae is a promising approach to break the current dependence on fossil fuels, and the development of low-cost production system has attracted great interest. *Pseudochoricystis ellipsoidea* (MBIC11204) is a unicellular photosynthetic microorganism that can accumulate large amount of oils in cells under stressed conditions such as nitrogen deficiency. We aimed to isolate mutants with increased oil productivity for the advanced utilization of *P. ellipsoidea* for biofuel production.
【方法】The oil vesicles in living cells are stainable with fluorescent dyes such as BODIPY 493/503, and the fluorescent intensity is a good indicator of oil accumulation. For rapid screening of mutants with increased oil productivity, flow cytometory analysis and cell sorting were performed using the fluorescent activated cell sorting (FACS) system. *N*-Methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG)-mutagenized *P. ellipsoidea* cells were cultivated in liquid media under several conditions and stained with BODIPY 493/503, then the cells with increased fluorescent emission compared to those of the wild-type cells were selected by FACS. Individual colonies were isolated and the mutants with increased oil accumulation were finally selected, and further characterized.
【結果】By using NTG-mutagenized *Pseudochoricystis ellipsoidea* and FACS, we could isolate several mutants with increased oil productivity. By modifying the growth conditions, those mutants accumulate high amounts of lipids in cells. Those mutants are good candidates for the practical application.

Pseudochoricystis ellipsoidea, fluorescent activated cell sorting, biofuel

講演番号:3C01a08
講演日時、会場:3月24日10:27～ C校舎01会場

マレーシアの土壌から単離した*Penicillium rolfsii* のオイルパーム廃棄木搾汁残渣に対する分解活性

Degradation activity of a *Penicillium rolfsii* strain isolated from the soil in Malaysia against the sap extraction residue of oil palm trunks

○Lee Kok Chang[1,2]、荒井　隆益[1]、小杉　昭彦[1]、Darah Ibrahim[2]、Panida Prawitwong[1]、村田　善則[1]、森　隆[1]（国際農研[1]、マレーシア理科大[2]）

○Lee Kok Chang[1,2], Takamitsu Arai[1], Akihiko Kosugi[1], Darah Ibrahim[2], Panida Prawitwong[1], Yoshinori Murata[1], Yutaka Mori[1] (JIRCAS[1],USM[2])

【目的】Oil palm trees are replanted at an interval of approximately 25 years because of decreased oil productivity of old trees. Consequently the felled trunks are the enormous amount of biomass resources in the palm oil producing countries such as Malaysia and Indonesia. We found that the felled oil palm trunk contains large quantity of sap with high concentration of free sugar contents. The oil palm trunk residues which are the residual substances after squeezing sap will be discharged in large quantity. We conducted the screening of filamentous fungus capable of produce hydrolytic enzyme(s), active against oil palm trunk residues for the purpose of obtaining sugar for bioethanol.

【方法】We have isolated 164 fungal isolates which grow on oil-palm trunk residues. After one week cultivation, the culture broth was collected by filtration method. The resulting supernatant was precipitated with 80% saturated ammonium sulfate and then dissolved in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0). The excess salt was removed with desalting column. Enzyme activity was determined by incubating the enzyme preparation in the presence of destarched-oil-palm trunk 1% (w/v) residues as substrate.

【結果】We selected a filamentous fungus with strong activity against oil-palm trunk residues. By analysis of the rDNA sequence, it was identified as *P. rolfsii*. We found that oil-palm trunk residues-hydrolyzing specific activity of the culture supernatant from *P. rolfsii* was superior to that of the commercial enzymes Celluclast 1.5L and Accellerase® 1500: 3 to 5-fold and 2 to 4-fold higher activity than Celluclast 1.5L and Accellerase® 1500 relatively. Oil palm trunk residues hydrolyzing activity was compared with type strain NBRC7735 as well and the result showed that higher activity of 1 to 2-fold of isolated *P. rolfsii*. We also found that *P. rolfsii* exhibited a greater xylan, arabinan and laminarin-hydrolyzing activity than those commercial enzymes.

cellulase, biomass, saccharization

講演番号：3C01a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎01会場

バイオ・ディーゼル植物ヤトロファの登熟期果実における脂質代謝の転写制御

Regulation of Lipid Metabolism during Fruit Development in a Biofuel Plant Jatropha curcas L.

○明石　欣也、梶川　昌孝、尾形　善之[1]、Sony Suharsono[2]、Utut Widyastuti[2]、足立　直樹[3]、近藤　伸二[3]、菊地　淳[1,4,5,6]、横田　明穂（奈良先端大・バイオ、[1]理研・PSC、[2]ボゴール農大、[3]理研・ASI、[4]理研・BMEP、[5]名大院・生命農、[6]横市院・生命）

○Kinya Akashi, Masataka Kajikawa, Yoshiyuki Ogata[1], Sony Suharsono[2], Utut Widyastuti[2], Naoki Adachi[3], Shinji Kondoh[3], Jun Kikuchi[1,4,5,6], Akiho Yokota (Grad. Sch. Biosci., NAIST, [1]RIKEN PSC, [2]Bogor Agric. Univ., [3]RIKEN ASI, [4]RIKEN BMEP, [5]Grad. Sch. Bioagri., Nagoya Univ., [6]Grad. Sch. BionanoSci., Yokohama City Univ.)

【目的】ヤトロファは種子に30-40%程度の油脂を含有し、耐乾性に優れ荒廃地でも生育可能である。ヤトロファ油脂はオレイン酸を多く含み、ディーゼル・エンジン等の燃料源として好適である。本植物は食糧作物との耕作地の競合を回避できるなどの利点があり、次世代のバイオ･ディーゼル原料の主力の一つとして注目されている。一方、その果実登熟段階における脂質生合成の分子制御機構の全体像についてはほとんど判明していない。そこで本研究では、果実登熟過程における脂質蓄積と脂質関連遺伝子の発現プロファイルを網羅的に解析し、その分子制御機構についての基盤情報を得ることを目的とした。
【方法】インドネシア・ボゴール農業大学の実験農場でヤトロファを栽培し、その開花直後から成熟に至までの果実の各成熟段階における脂質含量および組成、遊離糖組成およびタンパク質含量の変化を解析した。あわせて同段階における網羅的な遺伝子発現解析を、次世代シーケンサーおよび定量的RT-PCRにより行い、脂質代謝に関わる遺伝子群の発現情報を取得した。
【結果】受粉直後のヤトロファ幼果実には主としてデンプンが蓄積しているが、果実発達の中期にはデンプンが分解消失し、ショ糖やブドウ糖などの低分子糖類が多く蓄積していることが示された。さらに果実の成熟期には、脂肪酸トリグリセリドが大量に合成され、高蓄積することが判明した。この大規模代謝変動を担う遺伝子制御を明らかにするため、各段階毎に約600万リード、合計3690万リードのcDNA配列を解読した結果、総計で40,488種類のcDNA配列を取得することに成功した。cDNA配列の頻度分析の結果、果実発達の中期にはフラボノイド代謝など4系統の代謝経路が強く活性化する一方、果実の成熟期には脂肪酸合成経路や二次代謝経路など3系統の代謝経路が活性化することが判明した。また、果実成熟期には、種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子群が強く発現上昇することが示された。これらの結果は、ヤトロファ種子の脂質およびタンパク質生合成過程において、大規模な代謝制御と遺伝子転写調節の機構が存在することを示唆している。

Jatropha, Lipid, Transcriptome

講演番号：3C01a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ C校舎01会場

ジャトロファフォルボールエステル分解微生物の探索

Screening of phorbol ester degrading microbes for *Jatropha* bio-diesel production.

○大池 達矢、松川 哲也、岡南 政宏、阿野 貴司、梶山 慎一郎（近畿大院生物理工・生物工）
○Tatsuya Ohike, Matsukawa Tetsuya, Masahiro Okanami, Ano Takashi, Shin’ichiro Kajiyama (Div. Biotechnol. Sci., Grad. Sch. Biol.-oriented Sci. and Technol., Kinki Univ.)

【目的】

Jatropha curcas は、トウダイグサ科の落葉低木であり、種子中に40-60%もの油脂を含むことから新しいバイオディーゼル原料植物として注目されている。また、*J. curcas* は、干ばつや病害に強く、貧栄養な土壌環境下でも生育可能なため、世界中の多くの地域で栽培でき、工業排水などによって重金属汚染された土壌のファイトレメディエーションなど、環境浄化にも利用できると考えられている。このように、*J. curcas* は、多くの利点を有するため、次世代バイオ燃料としてすでにEUやアジア・アフリカなどではその試験栽培と生産性や経済性の実証研究が開始されている。しかしながら、一方で *J. curcas* は、留意すべき問題点も併せ持っている。*J. curcas* の油脂には、発がんプロモーション活性を有する二次代謝物質であるフォルボールエステル類を含み、生産者や消費者の健康に与える影響が懸念されている。現在のところ、ジャトロファバイオ燃料の実用研究は主に、生産性の向上のための育種研究などに集中しており、毒性の問題があまり議論されていない。しかしながら、今後 *J. curcas* が高密度かつ大規模に生産されるとなると、毒性の問題は必ず重要課題として浮上することが考えられる。以上のことより、フォルボールエステル類の環境中への放出は、自然環境や人体への毒性影響などを考慮する必要があると考えられ、早急な処理方法の開発が求められている。

【方法】

環境中の様々な場所から微生物を単離し、いくつかの微生物を混合した微生物群培養液を作製した。また、微生物の生育に必要な最低限のミネラルと窒素源を含む培地に、*J. curcas* の種子から抽出したフォルボールエステル類を添加した培地を作製し、その培地を用いて各々の微生物群の培養を行った。培養後、培養ろ液を凍結融解法により破砕し、3倍量の酢酸エチルを用いてフォルボールエステル類の抽出を行った。微生物群の分解能の確認は、LC/MSにより行った。

【結果】

現在、*J. curcas* 由来のフォルボールエステル類を含んだ最少ミネラル培地で微生物群を培養し、増殖を確認した結果、21の微生物群において増殖を確認することができた。さらに、それらの微生物群においてLC/MSによるフォルボールエステル類の分解を確認した結果、5つの微生物群で高い分解を確認することができた。現在、分解する菌の同定を進めている。

Jatropha curcas, phorbol ester, biodegradation

講演番号:3C01a11
講演日時、会場:3月24日11:10～ C校舎01会場

タイトル *Jatropha curcas* の種子採油残渣を用いた微生物農薬の開発

Title Development of microbial pesticide using *Jatropha curcas* seed cake

○吉川 諒、大池 達矢[1]、松川 哲也、岡南 政宏、梶山 慎一郎、阿野 貴司（近畿大生物理工・生物工、[1]近畿大院生物理工・生物工）

○Ryo Yoshikawa , Tatsuya Ohike[1] , Tetsuya Matsukawa , Masahiro Okanami , Shin'ichiro Kajiyama , Takashi Ano (Department of biotechnological Science,Faculty of Biology-Oriented Science and Technology,Kinki University, [1]Division of biotechnological Science,Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology,Kinki University)

【目的】*Jatropha curcas* （和名：ナンヨウアブラギリ）は種子の仁の中に40-50%の油を含んでいるため、バイオ燃料の原料として期待されている植物である。しかし、油を抽出した種子採油残渣には、タンパク質(60%)、脂質(0.6%)、灰分(9%)、繊維(4%)、炭水化物(26%)などの豊富な栄養源が含まれているにも関わらず、抗栄養因子（トリプシン阻害剤、レクチン、サポニン、フィチン酸など）や毒性化合物（フォルボールエステル類）を含んでいるため、採油残渣を利用することが難しく、その処理が問題となっている。本研究では、病原菌への抑制能を示す *Bacillus subtilis* RB14 を、今まで利用方法がほとんどなかった *J. curcas* の種子採油残渣を用い、培養することにより微生物農薬生産の可能性を検討することを目的とした。

【方法】フォルボールエステルを抽出した安全な*J. curcas* の種子採油残渣と水を混合した培地を用いて*Escherichia coli* DH5α を培養し、その増殖を微生物培養に一般的に用いられているTSB培地と比較することで微生物が利用可能な栄養素の含量を調べた。次に、同様の培地を用いて、*B. subtilis* RB14を培養することにより、増殖能を調べるとともに、培養液、培養上清が植物病原菌、*Rhizoctonia solani* に対して示す抑制能を検討した。

【結果】*J. curcas* の種子採油残渣を用いた培地で*E. coli* DH5α を培養した結果、TSBよりも弱い増殖が認められたが、この増殖は、1/50TSB培地における*E. coli* DH5α と同等の増殖量であることが示された。しかし、採油残渣を用いた培地で*B. subtilis* RB14 を培養した時は、TSB培地を用いて培養した時よりも高い増殖能を示した。また、採油残渣で培養した*B. subtilis* RB14の培養液、培養上清ともに*R. solani* の増殖を抑制することが示された。*B. subtilis* RB14 が合成する抗菌物質イチュリンAをHPLCを用いて分析した結果、採油残渣を用いた培養液から、イチュリンAが検出されたため、合成されていることが示された。また、採油残渣の添加量を増やすにつれ、イチュリンA生産量の増加が認められたことから、採油残渣が効果的な培地として機能していると考えられた。しかし、通常のTSB培地を用いて培養した場合は上清による効果的な抑制能も認められず、イチュリンAもほとんど検出されなかった。以上の結果から、*J. curcas* の採油残渣は*B. subtilis* RB14 の良好な培地であり、微生物農薬として利用できる可能性があることが示された。

Jatropha curcas seed cake 、*Bacillus subtilis* 、microbial pesticide

講演番号:3C01a12
講演日時、会場:3月24日11:21～ C校舎01会場

ヤトロファ栽培・収穫時未利用バイオマスの資源化を目指した物理化学特性解析

Physico-chemical analysis of unused biomass of Jatropha for utilization as a new resource.

○渡辺 太二[1]、篠 阿弥宇[2]、明石 欣也[3]、菊地 淳[1, 2, 4, 5] ([1] 横市大院生命、[2] 理研PSC、[3] 奈良先端大バイオ、[4] 理研BMEP、[5] 名大院生命農)

○Taiji Watanabe[1], Amiu Shino[2], Kinya Akashi[3], Jun Kikuchi[1, 2, 4, 5] ([1] *Grad. Sch. NanoBioSci., Yokohama City Univ.*, [2] *RIKEN PSC*, [3] *Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST*, [4] *RIKEN BMEP*, [5] *Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.*)

【目的】現在ヤトロファは、その種子がバイオディーゼル原料として注目を集めているが、枝葉や種子の残渣もバイオマス資源として重要視され始めている。本研究では、リグノセルロースの組成や前処理による組成変化・影響を解析することで、ヤトロファ由来リグノセルロース系バイオマスの効率的な処理方法や新たな利用手段の構築を目指している。今回は、NMRシグナルの帰属とシグナル強度を用いたリグノセルロース組成プロファイリング、熱処理による組成変化の解析を行った。

【方法】ヤトロファの種子（種皮と内部組織)、茎（樹皮、木部、髄)、葉を部位ごとに分別し、粗粉砕した粉末を試料とした。組成プロファイリングには、粗粉砕粉末の油分や低分子群を抽出除去した残渣をボールミルによって微粉化し、DMSO-Pyridine 混合液に可溶化させた溶液を用いた。^{1}H-^{13}C HSQC、2D HSQC-NOESY、2D HSQC-TOCSY スペクトルを測定し、HSQC シグナルの帰属を行った。熱処理は窒素雰囲気下で行い、残渣の HSQC スペクトルを測定、シグナルの強度変化を追跡した。

【結果】リグノセルロースのHSQCシグナルの帰属は既往研究を元にして行うことが可能だが、今回は2D HSQC-NOESYや2D HSQC-TOCSYを併用することで、未同定シグナルの帰属が可能となり、より詳細に各組織の組成解析が可能となった。帰属したHSQCシグナルを用いたプロファイリングの結果、木部と種皮ではβ-D-xylopyranosideとアセチル化したxylopyranosideが主要なヘミセルロース成分であるが、木部ではSyringyl、種皮ではGuaiacylが多く含まれる傾向にあり、主要なリグニン成分は異なることがわかった。他に、樹皮、髄、葉ではglucopyranosideが主要な構成成分であること、種子の内部組織ではリグノセルロースは少なく、タンパク質を多く含むことなどが示唆され、組織ごとの組成情報を抽出できた。熱処理による解析では、500 ℃以下でのリグノセルロース分解は ①一部のヘミセルロースの分解、②キシランとセルロースの分解、③リグニンの分解 の三段階に分けられることがわかった。また、リグニン含量の高い木部と種皮、特に種皮ではキシランとセルロースは他の組織に比べ、より高い温度で分解されていた。このことから、熱処理の効率を高めるためにはリグノセルロース組成が重要な情報となると考えられた。

Biomass, Jatropha curcas, NMR

講演番号:3C01a13
講演日時、会場:3月24日11:32～ C校舎01会場

BDF生産をめざしたラビリンチュラ類の高密度培養の検討

Studies of high density cultivation of thraustochytrids for the BDF production.

○林　雅弘、平井大介、長友宏子、田岡洋介、原田佳子[1]、泉可也[1]（宮崎大・農、[1](株)BITS）
○Masahiro Hayashi, Daisuke Hirai, Hiroko Nagatomo, Yousuke Taoka, Keiko Harada[1], Yoshiya Izumi[1] (University of Miyazaki, [1]BITS)

【目的】ラビリンチュラ類は高い脂質蓄積性を示す海洋微生物であり、特にドコサヘキサエン酸（DHA）を多量に生産する事から注目されている。演者らは特にヤブレツボカビ科に属するラビリンチュラースラウストキトリッドーによるバイオディーゼル燃料（BDF）生産をめざし、スラウストキトリッドの高密度培養を試み、脂質特性および脂質生産性について検討した。
【方法】沖縄県八重山諸島周辺海域より分離したスラウストキトリッドのなかから、増殖性および脂質蓄積性を指標に選抜した、*Aurantiochytrim*、*Parietichytrium*、*Schizochytrium*の各属の分離株を実験に供した。グルコースを炭素源として２Lジャーファーメンターにより培養した菌体からBligh-Dyer法により脂質を抽出・分析した。トリグリセリド画分から脂肪酸メチルエステルを調製し、副生物として得られた粗グリセロール画分の炭素源としての利用可能性を検討した。
【結果】用いた分離株はそれぞれ脂肪酸組成は異なるものの、いずれもDHAなどの高度不飽和脂肪酸を生産した。しかしグルコースを添加してFed-Batch培養を行うと飽和脂肪含有率が増加し、高度不飽和脂肪酸含有率が減少する傾向を示した。いずれの分離株も脂質の主成分はトリグリセリドであり、BDFとして利用可能な脂肪酸メチルエステルを調製することができた。また、脂肪酸メチルエステル調製時に副生物として発生する粗グリセロール画分を培養時の炭素源として利用可能な株もあり、副生物の有効利用による効率的なBDF生産の可能性が示唆された。

thraustochytrids, BDF, glycerol

講演番号:3C01a14
講演日時、会場:3月24日11:43～ C校舎01会場

トリグリセリド合成系遺伝子の過剰発現による油脂蓄積酵母の分子育種

Molecular breeding of oleaginous yeast by overexpression of genes of the triacylglycerol biosynthetic pathway

○高桑 直也（農研機構・北海道農研）
○Naoya Takakuwa (NARO)

【目的】*Kluyveromyces lactis* は、*Saccharomyces cerevisiae*と同じくSaccharomycetaceae科に属し、製パン・菓子用途にも使用できる食用酵母である。また、*K. lactis* は*S. cerevisiae* と比べて油脂トリグリセリド（TG）を高濃度蓄積し、その脂肪酸組成はバイオディーゼル品質規格に適合することから、食用のみならず燃料用途の油脂生産に好適である。本研究では、*K. lactis* のTG高蓄積株の分子育種の一環として、TG合成系遺伝子の過剰発現株を作成し、TGの高蓄積化に関わる遺伝子の特定を試みた。
【方法】*S. cerevisiae* のTG合成系遺伝子の配列情報を基に、*K. lactis* NBRC 1267（全ゲノム解読株）のゲノムDNAからTG合成系遺伝子をそれぞれPCRクローニングした。発現ベクターとしては、細胞内で各種遺伝子を発現させるため、pKLAC1（New England Biolabs, Ipswich, MA）のα-mating factor（リーダー配列）部分を除去したpKLAC:intを使用し、PCR 産物をそれぞれ同ベクターに連結した。得られた構築ベクターを制限酵素*Sac* IIで直鎖化した後、*K. lactis* GG799（New England Biolabs）のコンピテントセルに導入した。形質転換株は、アセトアミド含有寒天培地での生育ならびにPCRによるインサートチェックにより、ゲノムDNA中の*LAC4* プロモーター部分における相同組み換えを確認して単離した。組み換え株は、それぞれ1% Yeast extract-S(日本製薬)、2% Polypepton-S(日本製薬)および2% ガラクトース（Wako）からなる培地で、バッフル付三角フラスコで30℃、48h、200rpmで培養した。培養菌体は、水洗・凍結乾燥した後、菌体重量を測定した。菌体脂質は、メタノール性KOH等で抽出し、得られた脂肪酸メチルエステルをTLC-デンシトメトリー法で定量することにより菌体TG量を推定した。
【結果】データベース検索の結果、計15種のTG合成系遺伝子は、*K. lactis* の6つの染色体のうち5つにそれぞれ保存されていた。*S. cerevisiae* のTG合成系遺伝子との相同性は34～81%だった。造成した組み換え株は、菌体収量については親株と差は認められなかった。ジヒドロキシアセトンリン酸からTG合成までの酵素遺伝子の過剰発現株において、最もTGの生産量が増加したのは、*DGA1*（アシル-CoA:ジアシルグリセロール アシル基転移酵素）発現株であり、親株と比べて1.4倍増加した。また、*LPP1*（ホスファチジン酸脱リン酸化酵素）などの発現株においてもTG量の増加傾向が見られた。

Kluyveromyces lactis, triacylglycerol, biodiesel

講演番号：3C01a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ C校舎01会場

タイトル　バイオディーゼル生産過程で生じるグリセリンからの乳酸生産

Title　Lactic acid production from glycerin, by-products of biodiesel process

○保井 秀太、山出 和弘（関西大・化学生命工）

○Shuta YASUI, Kazuhiro YAMADE (Dept. Biotech., Fac. Eng., Kansai Univ.)

【目的】 バイオディーゼル燃料(BDF)は軽油の消費量を低減でき、カーボンニュートラルで地球温暖化を多少なりとも防ぐことができるということで生産され、自動車燃料等へ利用されている。しかし、BDF 製造時に多量のグリセリンが副生成物として生産されるため、このグリセリンの有効利用としてエタノールや有機酸などへの微生物変換が試みられている。そこで、本研究では微生物変換により、生分解性プラスチックの原料になる乳酸をグリセリンから得ることを目的とし、その生産条件について検討を行った。

【実験方法と結果】微生物消臭液から分離した *Lactobacillus paracasei* K-1 と同定した菌株を用いてグリセリンからの乳酸生産を行った。先ずは乳酸生産に適した pH、温度を得るために JAR-FERMENTOR を用いて pH が 6.0～8.0、温度が 30～50℃における乳酸生産について検討した結果、pH 7.5、37℃が最適であり、50 g/l の純グリセリンから 30.5 g/l の L-乳酸が得られた。続いて、pH を制御しながら繰り返し回分操作について検討した結果、10 回の操作で 50 g/l の純グリセリンから約 40 g/l の L-乳酸を安定して得ることができた。これらの結果に基づき、廃グリセリンからの乳酸生産について検討した結果、50 g/l の廃グリセリンから 29.4 g/l の L-乳酸が得られた。現在、廃グリセリンから高濃度 L-乳酸生産のための最適生産条件の検討ならびに繰り返し回分操作や連続操作について検討している。

Keyword1, Keyword2, Keyword3 lactic acid production, biodiesel, glycerin

講演番号：3C01p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ C校舎01会場

微生物燃料電池における細菌群集の動的変化と発電特性

Dynamics of Bacterial community and properties of electricity production in microbial fuel cells

山本脩二、Owen RUBABA、荒木葉子、鈴木渓、○二又裕之（静大工・物質工）
Syuji YAMAMOTO, Owen RUBABA、Yoko ARAKI、Kei SUZUKI、○Hiroyuki FUTAMATA (Shizuoka Univ. Eng.)

【目的】廃棄物の削減とクリーンエネルギーの生産は、持続可能社会の構築にとって必要不可欠である。微生物燃料電池（MFC: Microbial Fuel Cell）は、微生物による生物化学変換機能により有機物から直接電気を取り出せる発電機であり、有機性廃棄物の処理とエネルギー生産を同時になし得る次世代型のエネルギー生産システムとして期待されている。しかし、実用化には大幅な電流密度の向上が必要である。そこで本研究では、電気生産に関わる負極槽内の微生物生態系の好適制御を最終目標として、MFC内の細菌群集と発電特性の関係について解析した。
【方法】空気正極型MFCを用い、負極槽（36 mL）に負電極として125 mm^3（5 mm × 5 mm × 5 mm）サイズのカーボングラファイトを130個封入し水田土壌（0.4 g）を接種した。負極と正極の間にプロトン交換膜（Nafion 117）を挿入し、10 Ωの外部抵抗で接続した。対照のMFCは正極と負極が繋がっていない状態とした。850 mLの30 mM $NaHCO_3$溶液（生ゴミ分階槽）に生ゴミを20 gから40 g投入し、MFCと対照MFCに生ゴミ分解溶液を滞留時間1日の早さで連続的に供給した。生ゴミ分解槽には、流出速度と同じ速度で30 mM $NaHCO_3$溶液を供給した。5分間隔で電圧を測定し、発電特性を把握するため適時電流電圧曲線を測定した。HPLCを用いてMFCへの供給水および排出水の有機酸分析を行い、供給水の水質と有機物利用特性について解析した。細菌群集構造の変化を調べるため、培養34日目および168日目の試料を用いた16S rRNA遺伝子ライブラリーの比較を行った。さらに、時系列的にDGGE解析を行い多次元尺度構成法による細菌群集の動態解析を実施した。
【結果】電流密度は徐々に増加し約200 mA m^{-2}に達し、最大の電圧および電力は約450 mVおよび7.2 W m^{-3}で安定した。内部抵抗は約2000 Ωから100 Ωに減少し、メディエーター様物質の集積あるいはバイオフィルムの関与が推察された。クローンライブラリー解析の結果、培養34日目と168日目では群集構造が大きく異なり、また他の全ての試料（生ゴミ分階槽、水田土壌、対照MFCの負極溶液および電極表面）と比較しMFC内では独自の群集構造が構成されていたことから、MFCには強いバイアスが生じていることが示された。負極溶液中には発酵性の微生物が検出された。168日目のMFC電極表面には*Geobacter*属細菌に近縁の細菌が約７割を占め、既存の*Geobacter*属細菌群とは異なっていた。動態解析の結果、生ゴミ分階槽の細菌群はランダムな動きを示した。一方MFCでは、負極溶液中の細菌群は変動しながらも平衡点が示唆されるのに対して電極表面の細菌群は著しく変化し、それらの挙動は対照MFCとは異なっていた。以上の結果から、負極溶液中に存在する多様な発酵性細菌群からの有機酸供給と電極表面上に単集積した高発電性細菌による消費（発電）という電子フロー構築の重要性が示唆された。

microbial fuel cell, population dynamics, exoelectrogen

講演番号：3C01p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ C校舎01会場

微生物燃料電池における細菌群集の動的変化と発電特性

Microbial Community Dynamics and Electrochemical Properties of Microbial Fuel Cells under Different External Resistances

○Rubaba Owen, 加藤豊、山本脩二、二又裕之（静大工・物質工）
○Rubaba Owen, Yutaka KATO, Shuji YAMAMOTO, Hiroyuki FUTAMATA (Shizuoka Univ. Eng.)

Effects of external resistance on electrochemical and microbial properties were investigated using a pair of lactate fed (20 mM) air cathode microbial fuel cells (MFCs) operated at different external resistances. The MFCs were initially connected to either a 10 Ω (LR-MFC) or a 1000 Ω resistor (HR-MFC). The external resistance for LR-MFC was increased to 20 Ω and then 50 Ω while that of the HR-MFC was decreased first to 510 Ω and then 100 Ω. There was a sudden power increment for both MFCs with the first external resistance change. Subsequent external resistance changes had marginal effect on power densities. Polarization analyses showed that the LR- MFC had lower internal resistance (average 130 ± 8.0 Ω) than the HR-MFC (720 ± 130 Ω) and had higher current and power densities compared to the HR-MFC. Power densities for LR-MFC averaged 30 ± 4.0 mW m^{-2} and those for HR-MFC averaged 10 ± 3.0 mW m^{-2}. LR-MFC had its highest current density at 50 Ω (510 mA m^{-2}) while that for HR-MFC was at 510 Ω (170 mA m^{-2}). Cyclic voltammograms of the two MFCs were different from each other and their profiles suggested presence of mediators-like compounds during electricity production. Scanning electron microscopy revealed that the biofilm on LR-MFC anodes was more dense and less morphologically diverse. The LR-MFC favored round shaped bacteria while the HR-MFC favored long rod shaped bacteria Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) showed presence of a band that appeared when electricity production become significant and this band was common for both MFCs. Multidimensional scaling analysis based on the profiles of DGGE targeting the 16S rRNA gene showed that bacterial communities shifted with time and external resistance change. LR- and HR community dynamics were quite different from each other. There was a major shift when LR-MFC was changed from 10 Ω to 20 Ω compared to the shift that occurred when HR-MFC was changed from 1000 Ω to 510 Ω. The bacteria in the LR- and HR-MFCs were different from each other and so were the dominant anolytic bacteria and biofilm in each MFC. It was intriguing that the LR-MFC did not obey ohms law and actually had a power increment when external resistance was increased. This may point out the importance of low internal resistances in producing higher power densities as it may be the key factor. These results showed that external resistance has an effect on bacterial community and might be a key factor for specific enrichment of highly efficient exoelectrogens.

Microbial fuel cell, bacterial community dynamics, external resistance

講演番号：3C01p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎01会場

微生物発電を用いた油脂の処理・発電に関する検討

Evaluation of microbial fuel cells for treating lipid and generating electricity

○浜本 一洋[1]、石黒 隆[1]、松本 晃暎[1]、橋本 和仁[2,3,5]、渡邉 一哉[2,4,5]（[1]ミヨシ油脂㈱、[2]東大先端研、[3]東大院・工、[4]東京薬科大・生命科、[5]JST ERATO）

○Kazuhiro Hamamoto[1], Takashi Ishiguro[1], Akiteru Matsumoto[1], Kazuhito Hashimoto[2,3,5], Kazuya Watanabe[2,4,5]（[1]Miyoshiyushi, [2]Toudaisentanken, [3]Tokyodai,[4]Tokyoyakkadai, [5]JST ERATO）

【目的】微生物燃料電池（Microbial Fuel Cell：MFC）は微生物を触媒とする燃料電池である。微生物や微生物群集が酸化分解できる多様な有機物を燃料にできることが特徴である。本研究では、油脂、特に廃油脂や含油排水の処理およびそれらの有効利用を目指し、MFC の可能性を検討した。

【方法】MFC としては、空気正極とグラファイトフェルト負極を備えた一槽型リアクターを用いた。接触を防止するために、負極と正極の間に濾紙を挟んだ。微生物源として油脂に曝された土壌を実験開始時に加え、燃料として用いた乳化した油脂は一定量を適時添加した。ロガーを用いて正極と負極間の電圧をモニタリングし、またポテンショスタットを用いて適時電圧・電流曲線を測定することにより MFC の出力特性を求めた。油脂の分解は、GC や LC によって把握した。

【結果】微生物源として、油脂工場の排水処理槽汚泥や油脂汚染土壌を検討し、土壌により高出力が得られることが判明した。また、グラファイトフェルトをZhaoらの方法によりカーボンナノチューブで修飾すると出力および処理効率の向上が見られた。その結果、COD負荷速度1.0 g/L, dayにおいて、反応液体積あたりの出力密度として31.6 mW/L、クーロン効率として20.1 %での発電が確認され、またこの時のCOD除去率は77.9%であった。油脂処理および発電に関与する微生物を検出する目的で、開回路および閉回路で運転したMFCのアノード付着微生物群集からDNAを抽出し、そこからPCR増幅した16S rRNA遺伝子断片のクローンライブラリーの配列解析を行った。その結果、*Burkholderiales*や*Geobacter*などの微生物種が発電に関与する可能性が示唆された。以上の結果から、MFC は廃油の有効利用において有望であることが示された。

本研究は、『JST ERATO 橋本光エネルギー変換システムプロジェクト』の支援を受け実施したものである。

Microbial fuel cell, Lipid

講演番号：3C01p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ C校舎01会場

果糖と酸素で発電する直接電子移動型バイオ電池の高性能化

High Performance DET-type Biofuel Cell with D-Fructose and Dioxygen

○宋　慶盛、浜野泰如、河井翔太、浅野　達、白井　理、加納健司（京大院農・応用生命）
○Keisei Sou, Yasuyuki Hamano, Syota Kawai, Itaru Asano, Osamu Shirai, Kenji Kano (Kyoto Univ.)

【目的】バイオ電池は酸化還元酵素を利用して糖やアルコールなどから電気エネルギーを取り出すことができ、環境に優しいクリーンなエネルギー源として期待されている。また、反応条件が穏和かつ安全であり、携帯用の電源や体内埋め込み式電源としての応用も期待されている。いくつかの酵素は、そのコファクターを介して直接電極と電子移動を行うことができ、この反応を直接電子移動(DET)型反応と呼ぶ。DET型反応が可能な酵素を用いることで、メディエータを必要としないバイオ電池を構築することができる。本研究では、このようなDET型バイオ電池の構築と性能向上を目的とした。アノードにはDET型反応を示すD-フルクトースデヒドロゲナーゼ(FDH)、カソードにはマルチ銅オキシダーゼ(MCO)を用いた。電池の性能向上のためには、DET反応が進行する電極表面積を増やすことが重要であると考えられる。このため、当研究室で開発しメソ孔を持つカーボンクライオゲル(CCG)を電極として用いることで比表面積を増加させ、酵素の吸着量を向上させることができると予想される。さらに、親水化処理や振盪による浸漬で電極を改質し、酵素を高密度に吸着させることを試みた。
【方法】CCGスラリーをカーボンペーパーに塗布し、これをFDH溶液に振盪しながら浸漬させてアノードを作製した。FDHの吸着前に電極をエタノール処理、あるいはプラズマエッチング処理し親水化を図り、その影響を評価した。バイオ電池は静止、空気雰囲気下で、pH 5.0の1 Mクエン酸バッファー中で作動させた。自発的酸素供給速度を向上させるため、測定セルのカソード側に穴を空けたガス拡散型のセルを用いた。
【結果】エタノールで親水化処理した電極にFDHを吸着させ、そのアノード特性をサイクリックボルタンメトリーによって評価したところ、0.5 V (vs. Ag|AgCl)で約25 mA cm^{-2}の酸化電流を観測した。これは従来の結果と比較して約6倍の電流密度であった[1)]。また、電極への親水化処理や吸着時の振盪が効果的であることがわかり、この理由としてCCG電極内に酵素を高密度に吸着させることができたためだと結論した。また、MCOであるBilirubin OxidaseとFDHを用いたDET型バイオ電池はセル電圧約0.35 V、電流密度約5.5 mA cm^{-2}で約1.9 mW cm^{-2}の最大出力を示した。この性能はDET型としては世界トップであり、特に室温、静止条件、空気雰囲気下での特性であることは特筆すべきである。電流－電圧曲線から、最大出力における電位はアノードとカソードそれぞれ約0.05 V、約0.4 Vであり、どちらも立ち上がりの電位付近であった。このことから今後、酵素－電極界面の電子移動速度を向上させることにより、さらに大幅な出力向上が期待できることがわかった[1)]。

1) Y. Kamitaka, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 1793–1801, (2007).

biofuel cell, fructose dehydrogenase, direct electron transfer

講演番号:3C01p06
講演日時、会場:3月24日14:44～ C校舎01会場

深海熱水環境における電流生態系の可能性

A possible Electroecosystems in a Deep Sea Hydrothermal Environment

●中村 龍平[1]、石居 拓己[1]、山本正浩[2]、高井研[2]、橋本和仁[1,2]（[1]東大院工、[2]JST-ERATO, [3]海洋研究開発機構）

○Ryuhei Nakamura[1], Takumi Ishii[1] 、Masahiro Yamamoto[3], Ken Takai[3], Kazuhito Hashimoto[1,2]
([1]U. Tokyo, [2]JST-ERATO, [3]JASMTEC)

【目的】我々は、*Shewanella loihica* PV-4 が鉄鉱物の多い深海底に生息していることに着想を得て、電気化学系に酸化鉄（ヘマタイト：α-Fe_2O_3）のナノコロイドを添加したところ、電流密度が 50 倍から 300 倍と飛躍的に増大する現象を見出した。ここで驚いたのは、細胞がナノコロイドの半導体特性を利用することで、電気伝導性を有する細胞ネットワークを自発構築している、という点にある。これは、バクテリアと鉄鉱物の相互作用を理解する上で新しい知見であると同時に、半導体ナノ材料の高機能化に向けて研究を進めている材料化学分野にとっても新しい発想を提供するものである。本発表では、バクテリアの生合成によって形成した硫化鉄ナノ粒子（mackinawite)、ならびに深海底の熱噴出口（ブッラクチムニー）から採取した硫化鉄にも研究を展開し、「深海底において微生物がどのようにナノ鉱物と相互作用し生命活動を営んでいるのか？」またそれらに基づいた深海電流生態系の可能性について、ナノ鉱物材料の電気伝導物性をもとに議論する。

【方法】硫化鉄の生合成は、*S. loihica* を、塩化鉄(III)ならびにチオ硫酸イオンの存在下で、電子源には乳酸 10 mM を用い行なった。電気化学測定は、参照極に Ag | AgCl $KCl_{sat.}$、対極に Pt 線、作用極に ITO を用い行なった。電解質には 170 mM の NaCl を用いた。

【結果】*S. loihica*細胞を塩化鉄ならびにチオ硫酸ナトリウム存在下で培養すると、細胞懸濁液の色は1時間ほどで変わり始め、約3時間後には黒色の沈澱物が生成した。黒色沈澱物のXPSならびにXRD測定より、微生物の代謝活動によって鉄と硫黄の両方が還元され、準安定相であるmackinawite（FeS）ナノコロイドが選択的に形成することを明らかにした。得られた沈澱物を乾固した後、アルミニウム電極を蒸着させ、電極間距離1 mmの間隔で二端子法により電気伝導度測定を行った。印加電圧に対して電流値が線形に変化したことから、得られた細胞/FeS複合体は金属特性を有することがわかる。引き続きmackinawiteナノコロイドの生合成を、電気化学反応容器内で行った。微生物の代謝に由来する電流が時間の経過と共に増大し、鉄と硫黄が存在しない場合と比較して最大で100倍以上に増加した。興味深いことに化学的に合成したmackinawiteコロイドを、細胞を含む電気化学反応容器に添加した場合には、このような電流の増大は観測されなかった。ここで、細胞/FeS複合体が金属特性を示すこと、そして電流生成が微生物の代謝に由来することを考慮に入れると、電流の大幅な増大は細胞/FeS複合体内において効率的な電子伝達経路が自発構築されたことを示唆している。

Extracellular electron transfer、Black smoker chimney、 Carbon fixation

講演番号：3C01p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎01会場

化学独立細菌のCO_2固定における電子伝達機構の検討

Electron transfer of chemoautotrophic CO_2 fixation

○石居 拓己[1]、茂木 岳人[2]、中村 龍平[1,2]、橋本 和仁[1,2,3]（[1]東大院工、[2]東大工、[3]JST-ERATO）
○Takumi Ishii[1], Taketo Mogi[2], Ryuhei Nakamura[1,2], Kazuhito Hashimoto[1,2,3] ([1]Todai In, [2]Todai, [3]JST-ERATO)

【目的】化学独立細菌は光エネルギーではなく化学エネルギーを用いてCO_2固定を行う、興味深い菌体である。中でも鉄酸化化学独立細菌は、Fe^{3+}/Fe^{2+}の酸化反応により取り出される微小なエネルギーを有機物生産に利用する。菌体の生育環境では硫化鉄や酸化鉄などの導電性固体が周囲に存在しており、微生物は液中に溶存したFe^{2+}のみならず、固体も電子ドナーとして利用できる可能性がある。そこで本研究ではこの仮説の元、代表的な鉄酸化化学独立細菌である*Acidithiobacillus ferrooxidans*と固体電極間での電子伝達を調べ、その際の代謝電子伝達経路について調べた。

【方法】*A. ferrooxidans*の前培養はDSMZ培地（72mMのFe^{2+}を含む）中で行なった。FTO電極を作用極、Pt線を対極、Ag|AgCl電極を参照極として電気化学セルを組み、十分に洗浄した菌体を添加し、電気化学測定を行なった。電解液にはDSMZ培地からFe^{2+}を除いたものを用いた。還元電流生成時の菌体の代謝電子伝達を制御する為に、COガス導入および光照射による電子伝達阻害を行なった。

【結果】電極電位を+0.4 V vs SHEに固定した条件で微生物添加を行なった実験結果を図1に示す。微生物の添加によって還元電流の立ち上がりが観測された。更に系中にシトクロムcオキシダーゼの阻害剤であるシアン化カリウムを加えることで電流が抑制され、添加前のレベルにまで減少した。このことは還元電流が微生物代謝に由来するものであることを示しており、電極-微生物間での直接電子伝達による代謝が可能であることを意味する。

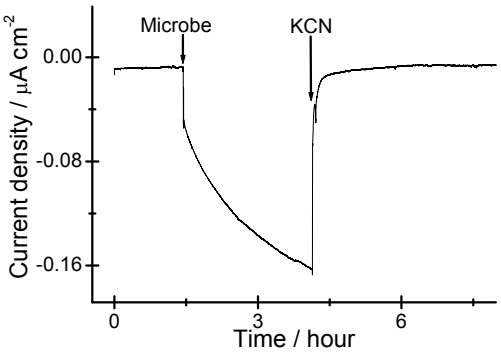


図 1:微生物添加による還元電流の経時変化

更に、微生物による電極上での還元電流生成状態で、COによる電子伝達阻害実験を行なった。CO曝露状態にある菌体に対して光照射を行うと、還元電流の上昇が見られた(図2 挿入図)。この結果は鉄酸化化学独立細菌の代謝電流を光制御することに成功した初めての報告である。更に照射光の波長を制御して光生成電流を測定し、アクションスペクトルを得た(図2)。このスペクトルは細胞中のシトクロムaに対応しており、KCN阻害実験の結果に合致した。この結果は化学独立細菌の電子伝達中の代謝活性をin vivo電気化学測定で制御した初めての報告である。

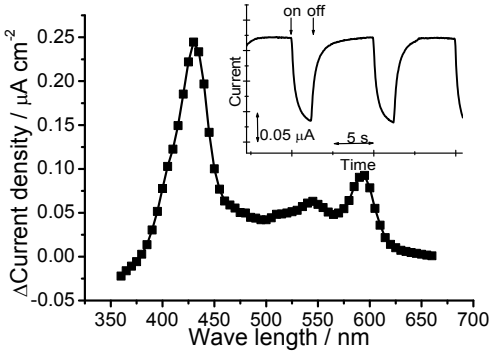


図 2:CO 雰囲気中での光還元電流応答のアクションスペクトル

extracellular electron transfer, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, CO_2 fixation

講演番号：3C01p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎01会場

ジアホラーゼと NAD 依存性脱水素酵素を用いた有機物酸化反応の生物電気化学的戦略

Bioelectrochemical strategy of oxidation of organic compounds with diaphorase and NAD-dependent dehydrogenases

○菊池　可菜子[1,2]，白井　理[1]，加納　健司[1]（[1]京大院農、[2]ユニチカ（株））
○Kanako Kikuchi[1,2], Osamu Shirai[1], Kenji Kano[1]（[1]Kyoto Univ. , [2]Unitika. Co. Ltd.）

【目的】NAD 依存性脱水素酵素は、多くの代謝系に関与し、その種類も非常に多い。NAD 依存性酵素を電極触媒として利用することにより、バイオ燃料電池、バイオセンサー、およびバイオリアクター等への広範な利用が期待できる。その場合、NADH の電極酸化触媒が必要となる。本研究では、後者の触媒としてジアホラーゼ（Di）に注目し、バイオ燃料電池やバイオセンサーへの適用を念頭に入れ、アルコールやアルデヒドの電気化学的な酸化系を構築することを目指した。

【方法】NAD 依存性酵素として、アルコール脱水素酵素（ADH）、ホルムアルデヒド脱水素酵素（FoAldDH）、およびギ酸脱水素酵素（FoDH）を用いた。Di 反応と電極反応を共役させるメディエータとしては 9,10-フェナントレンキノン(PQ)等を検討した。電極触媒能は、サイクリックボルタンメトリー（CV）を用いて評価し、反応電子数はクーロメトリーにて評価した。いずれも測定は 25 °C、pH 8.5 のトリス塩酸緩衝液中で行った。

【結果】電気化学的なNADH酸化触媒としては、DiとPQの組み合わせが、エネルギー的にも速度論的にも非常に優れていることを明らかにした。またこのNADH酸化系は、ADH、FoAldDH、FoDHとうまく共役でき、エタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸に感応するバイオセンサーが容易に構築できることを明らかにした。ただし、アルコール系酸化系は熱力学的な理由で生成物阻害を受けやすいことがわかった。一方、現在、バイオ電池では多段階酸化系による有機物の完全酸化系の構築が世界的に注目されている。そこで最も単純なアルコールとしてメタノールに注目し、ADH、FoAldDH、FoDH、Diを用いて、メタノールの電気化学的6電子酸化系の構築を試みた。ADHは、メタノールに対しても反応したが、そのkcatはエタノールの1/200以下であり、高電流密度を達成するには困難であった。しかしながら、ホルムアルデヒドでの完全酸化系は良好に機能することを明らかにした。

diaphorase, dehydrogenase, NAD

講演番号：3C01p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎01会場

嫌気条件下におけるグリセロールの大腸菌を利用した生物電気化学的酸化反応

Bioelectrochemical oxidation of glycerol using *Escherichia coli* under anaerobic conditions

○新村美智子、酒井秀樹[1]、松本隆平[1]、藤田修二[1]、後藤義夫[1]、戸木田裕一[1,2]、辻村清也、白井理、加納健司（京大院農、[1] ソニーコアデバイス開発本部 環境エネルギー事業開発部門 環境技術部 バイオ電池開発グループ、[2] ソニー先端マテリアル研究所 バイオエレクトロニクス研究グループ）

○Michiko Shinmura, Hideki Sakai, Ryuhei Matsumoto, Shuji Fujita, Yoshio Goto, Yuichi Tokita, Seiya Tsujimura, Osamu Shirai, Kenji Kano (Kyoto Univ., [1]Sony Co., Core Device Develop. Gp., Energy & Environ. Business Develop. Div., Environ. Technol. Dept., Bio Battery Develop. Gp., [2] Sony Co. Adv. Materials Lab. Bio Electronics Research Gp.)

【目的】温和な条件で、バイオマス等を燃料として、電気エネルギーに変換するデバイスとして、バイオ電池が注目されている。最近のバイオ電池の一つの重要な動向として、燃料の完全酸化系の導入が挙げられている。そこで本研究では、バイオディーゼルの副産物としてのグリセロールに焦点をあてた。還元当量の関係から嫌気条件下でのグリセロール代謝（発酵）は困難とされているが、生物電気化学的に還元当量のバランスを制御できれば、嫌気条件下での完全酸化が実現するのではないかと考えた。本研究では 2,3-dimethoxy-5-methyl-*p*-benzoquinone（Q_0）をメディエータとして、大腸菌の代謝系と電気化学的酸化系を共役させた。

【方法】嫌気条件下において、Q_0 を電子受容体とする大腸菌によるグリセロールの酸化反応を電気化学的に追跡した。Q_0 の還元速度は回転電極法を用い、反応電子数はクーロメトリーを用いて評価した。大腸菌は wild タイプの他に、Q_0 による NADH 酸化反応触媒としての diaphorase を大量発現させた変異型大腸菌も用いて、その代謝経路を検討した。

【結果】大腸菌は嫌気条件下でも Q_0 を電子受容体としてグリセロールを酸化できることを明らかにした。グリセロールが消費される間に得られた電気量は、グリセロールの CO_2 までの完全酸化(14e^-/molecule)に対する約 30%程度の電解効率に相当することがわかった。しかし、反応液中には、有機酸ならびにエタノールは検出することができなかった。一方、変異型大腸菌を用いた実験では野生型よりも電解効率が 10%程上昇することがわかった。この場合もエタノールや有機酸はほとんど検出されなかった。以上の結果から、大腸菌の解糖系と TCA 回路によるグリセロール代謝を電気化学的に駆動できることがわかった。代謝の過程で生ずる一部の還元当量は、NADH を経由して Q_0 に渡されたと結論できる。ただし、未回収の還元当量については未だ不明な点がある。現在、本反応のエネルギーおよび物質変換への応用について検討している。

Glycerol, Biofuel cells, Diaphorase

講演番号：3C01p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎01会場

変異型*dnaQ*遺伝子導入による高電流生産*Shewanella oneidensis*変異株の作製と解析

Construction and characterization of a *Shewanella oneidensis* mutant with increased ability to generate current by introducing a mutated *dnaQ* gene

○高妻 篤史[1]、釘宮 理恵[2]、渡邉 一哉[3, 1]、橋本 和仁[4, 1]（[1]JST・ERATO、[2]（株）ネオ・モルガン研究所、[3]東薬大生科、[4]東大院工科）

○Atsushi Kouzuma[1], Rie Kugimiya[2], Kazuya Watanabe[3], Kazuhito Hashimoto[4] ([1]JST/ERATO, [2]Neo-Morgan Laboratory, Inc, [3]Toyakudai, [4]Todai)

【目的】微生物燃料電池（Microbial fuel cell, MFC）は微生物が有機物を代謝する過程で生じた還元力を利用して電流を発生させる装置であり、再生可能エネルギー生産システムとしてバイオマス由来のエネルギーを直接電流という形で回収できるという利点を持つ。MFCには大規模な装置を用いた廃水処理システムや、小型・高出力リアクターを非常用・家庭用電源として利用するなどの幅広い用途が考えられる。本研究では小型・高出力MFCの可能性に着目し、その性能を向上させることを目的とした。MFCの出力を制限する要因の一つに、微生物の電極に対する電子伝達能力が十分でないことが挙げられる。そこで本研究では突然変異を高頻度で誘発する技術である不均衡変異導入法を用いて*Shewanella oneidensis* MR-1株を育種し、高電流を生産可能な菌株の単離、及びその高電流生産メカニズムに関する解析を行った。

【方法および結果】校正機能を欠損したDNAポリメラーゼをコードする遺伝子（変異型*dnaQ*）を含むプラスミドをMR-1株に導入することにより、野生株よりも著しく突然変異頻度が向上した菌株（不均衡変異株）を作製した。不均衡変異株をanthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) を電子受容体として繰り返し嫌気培養することにより集積を行った後、AQDSを含む平板培地で野生株よりも高いAQDS還元活性を有する変異株の選別を行った。その結果得られた変異株はAQDSを電子伝達メディエーターとして用いたMFC（図1）において野生株の2.4倍の電力を生産した（図2）．本変異株の遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイにより解析した結果，TCAサイクル等の基礎的なエネルギー代謝に関与する遺伝子が野生株と比較して過剰に発現していることが明らかになった。ゲノムシーケンスによる変異部位解析についても進行中である。

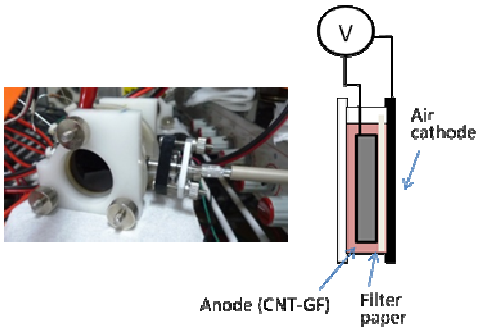


図1 本研究で使用したMFCリアクター

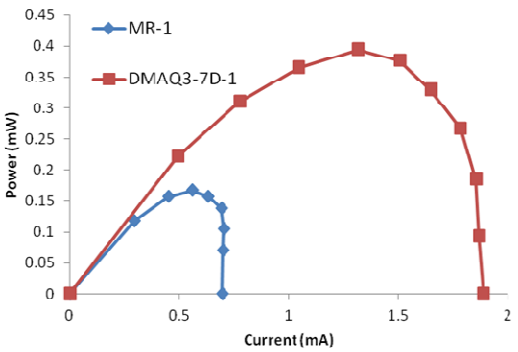


図2 野生株（MR-1）と不均衡変異株（DMAQ3-7D）の出力比較

microbial fuel cell, extracellular electron transfer, Shewanella

講演番号:3C01p11
講演日時、会場:3月24日15:49～ C校舎01会場

電気培養による*Clostridium acetobutylicum*の代謝制御

Control of butanol production by *Clostridium acetobutylicum* with electrochemical cultivation

○松谷 政導、平野 伸一[1]、松本 伯夫[1]、大村 直也[1]、安藤昭一[2]（千葉大院・融合、[1]電中研、[2]千葉大・園芸）

○Masamichi Matsuya, shin-ichi Hirano[1], Norio Matsumoto[1], Naoya Omura[1], Akikazu Ando[2] (Chiba Univ, Adv. Integ. Sci, [1]CRIEPI, [2]Chiba Univ, Horti)

【背景および目的】微生物の代謝において電子授受を伴う酸化還元反応が大きな役割を担っていることが知られている。我々のグループでは電気化学的手法により、微生物の電子授受をコントロールすることで代謝を制御する電気培養法の開発を試みている。これまでに、我々はブタノールをABE発酵により生産する*Clostridium acetobutylicum* に対して電気培養法を適用し、酸化電位の印加によって生育の促進やブタノール生産性の向上が可能であることを報告している*)。一方、*C. acetobutylicum*のABE発酵におけるブタノール生産ステップでは還元力が必要とされることが知られている。そこで、本研究では還元電位の印加により*C. acetobutylicum* の代謝への影響を評価し、投入電気量に対するブタノール生産性を向上させることを目的とした。

【方法】ブタノール生産菌として*C. acetobutylicum* NBRC 13948株を本研究の対象とした。培地としては電子メディエーターであるメチルビオロゲン（MV）2mMを含むＴＹＡ培地を使用し、アルコール生産期を模擬した静止菌状態の菌体（約10^9cells/ml）を使用し、電気培養試験を行った。電気培養試験では*C. acetobutylicum* の植菌後、+0.9V～-0.7Vの電位を作用極に対してそれぞれ印加し、グルコースを基質とした代謝産物の変化を非通電条件での試験と比較した。

【結果】*C. acetobutylicum*の糖からブタノールへの変換効率を最大化するために静止菌での電気培養試験を行った。+0.9V～-0.7Vの範囲で試験開始時より電位を印加し、電気培養試験を行ったところ-0.7Vにおいて非通電条件よりも糖消費速度の低下が見られたが、ブタノールの対糖収率は他の通電条件および非通電時よりも高い値を示した。還元型MVからの*C. acetobutylicum*へ供給された還元力がブタノール生産を向上させた一方で、還元型MVの存在もしくは過剰な還元環境が*C. acetobutylicum*の糖消費を抑制したものと推定された。そこで、糖消費の抑制を回避するために通電方式について改善を試みた。その結果、糖消費開始時より間欠的に短時間-0.7Vの電位を印加することを繰り返すことにより、糖消費の抑制を回避しつつ、ブタノール生産性を非通電条件より約2倍向上させることに成功した。また、通電方式の改善により投入電気量が低く抑えられた結果、投入電気量に対する通電によって増産したブタノールのエネルギーベースでの増産効果は約25倍に達した。

*）H21年度 農芸化学会大会要旨　松谷ら

Electrochemical cultivation, *Clostridium acetobutylicum*, Butanol

講演番号:3C01p12
講演日時、会場:3月24日16:10～ C校舎01会場

セルロース分解菌*Clostridium thermocellum* の電気培養による培養制御

Electrochemical regulation of metabolism in *Clostridium thermocellum*

○大前 良太、平野 伸一[1]、松本 伯夫[1]、大村 直也[1]、篠崎 開（東電大工・環境化、[1]電中研）
○ Ohmae Ryouta, Shin-ichi Hirano[1], Norio Matsumoto[1],Naoya Ohmura[1], Hiraku Shinozaki (Dendai, [1]CRIEPI)

【背景および目的】　微生物の代謝は多数の酸化還元反応に担われており、有機物など電子供与体に由来する電子の流れに支えられていると考えられる。そこで、この代謝の流れを電気化学的な手法により制御できるのではないかという仮説に基づき、我々のグループでは微生物の培養に電気化学的な手法を取り入れた電気培養法の開発を行っている。これまでに、種々の微生物への電気培養法の適用を行う中で、バイオ燃料の１つとして注目されているブタノールを生産する*Clostridium acetobutylicum* において通電によりその生産性を向上できることを明らかにしている。一方、バイオ燃料の原料としては食料と競合しないセルロース系バイオマスが望ましく、セルロース系バイオマスからのバイオ燃料変換の研究が広く進められている。そこで本研究ではセルロースからエタノールを生産する*Clostridium*属細菌に着目し、電気培養法を適用することによるセルロース分解、エタノール変換効率向上の可能性を評価することを目的とした。
【方法および結果】　本研究ではセルロースを分解し、エタノールを生産する *Clostridium thermocellum* ATCC27405を対象とした。*C. thermocellum* と電極間での電子授受によりセルロース代謝の制御を試みるためには電子授受に適した電子メディエーターと呼ばれる化合物の選定が必要である。電気化学的に16種類の候補物質について酸化還元プロファイルを明らかにし、その中で大きく酸化還元プロファイルが異なる9種類の候補物質を選択した。さらにこれらの物質に対して*C. thermocellum* の増殖および電子授受の可能性を検討した。ろ紙を単一炭素源として含む無機塩培地に9種の候補物質をそれぞれ最終濃度2mMとなるように添加し、*C. thermocellum* の培養を実施したところ、3種類の候補物質は*C. thermocellum* の増殖に対して阻害効果を示したのに対して、インジゴカルミンを始めとする5種類の候補物質は増殖を阻害せず、かつ添加により*C. thermocellum*のエタノール生産量を増加させる傾向を示した。5種の中で最も顕著に*C. thermocellum*と電子授受を行うインジゴカルミンを電極-細胞間の電子授受に適した電子メディエーターとして決定した。次に、インジゴカルミンの酸化還元プロファイルから印加電位を+0.7V、-0.7V (vs. Ag/AgCl)と設定し、セルロースパウダーを単一炭素源として電気培養を実施した。増殖およびセルロース分解、代謝産物を定量、非通電時と比較することにより電位印加の効果を評価したところ、インジゴカルミンの還元電位である-0.7Vを印加した際に、増殖およびエタノール生産の早期化が見られ、副産物である乳酸の生産量は50%減少した。一方、インジゴカルミンの酸化電位である+0.7Vを印加した場合では生育開始時期が遅延し、乳酸生産量は非通電時と比べわずかに増加した。以上、電気培養を適用することで、*C. thermocellum*の増殖および代謝を制御し、エタノール生産性を向上できる可能性が示唆された。

Clostridium thermocellum, cellulose, electrochemical cultivation

講演番号:3C01p13
講演日時、会場:3月24日16:21～ C校舎01会場

糸状菌*Trichoderma* sp. KFA-2株における分生子形成の通電による誘導

Induction of conidiation in *Trichoderma* sp. strain KFA-2 by electrolysis

○平野伸一、松本 伯夫、原園 顕[1]（電中研、[1]関西電力）
○Shin-ichi Hirano, NorioMatsumoto, Akira Harazono[1] (CRIEPI, [1]KEPCO)

【背景および目的】　糸状菌には産業的に有用な機能を有するグループが含まれている。糸状菌のなかでも*Trichoderma*属微生物は近年セルロース系バイオマスの糖化酵素生産菌として注目されている。我々のグループでは環境中よりセルロース分解菌として*Trichoderma* sp KFA-2株を単離し、セルロースの糖化プロセスの構築を試みている。*Trichoderma*属微生物を始めとする糸状菌の産業利用を考えた場合、その分生子形成能はプロセスの効率に関与する重要なファクターの１つである。特に*Trichoderma*の分生子表面には多くのセルラーゼが含有されていることが報告されている。しかし、KFA-2株は代表的なセルロース分解菌である*Trichoderma reesei* QM9414株と比較して固体培養時の分生子形成能が低いため、KFA-2株を用いたセルロースの糖化プロセスの効率化のためには分生子形成能の向上が必要である。一方、これまで当所では電気培養法として原核単細胞生物についてその生育および代謝を電気的に制御できることを明らかにしてきた。そこで、本研究では電気培養法の適用範囲を拡大し、真核多細胞生物である*Trichoderma* sp KFA-2株に適用することで通電の影響を明らかにすると共に、分生子形成能の向上を目的とした。
【方法および結果】　電気培養を行うにあたり、まずKFA-2株と電極間での電子授受を仲介する電子メディエーターの探索を行った。PDA培地に種々の電子メディエーターとなる候補物質を添加し、培養試験を行い、KFA-2株の生育への影響および電子メディエーター/ KFA-2株間での電子授受の有無を評価した。9種類の化合物について効果を試験したところ、これらは種類によってKFA-2株の形態変化、特に気中菌糸の形成を促進する化合物と抑制する化合物の大きく２パターンに分類された。気中菌糸の形成は分生子形成の前段階であるため、これらの化合物の添加は分生子形成能を促進できる可能性が推定される。そこで、気中菌糸の形成を促進する化合物について評価を進めたところ、候補物質の１つであるチオニンはKFA-2株によって還元され、さらにチオニンの還元と気中菌糸の形成誘導に相関があることが明らかとなった。そこで、チオニンを電気培養試験における電子メディエーターとして決定し、KFA-2株によって還元されたチオニンを電気的に酸化、再生することで、気中菌糸形成および分生子形成の更なる促進を試みた。寒天培地（PDA）に電極として2枚の炭素板を埋め込んだ固体培養型電気培養槽を作成し、植菌後、印加電位+1.0 Vにて電気培養を実施した。その効果を生育および形成される分生子数で評価した結果、陰極上においてはKFA-2株の生育が抑制されたのに対して、陽極上においては気中菌糸形成の促進が見られると共に形成される分生子数が非通電時と比較し、飛躍的に向上した。以上、電気化学的な手法によって真核多細胞生物である*Trichoderma* sp. KFA-2株の形態変化、分生子形成を誘導できることを初めて見出し、電気培養法の適用によりセルロース糖化プロセスを効率化できる可能性を示した。

Trichoderma, conidiation, electrochemical cultivation

講演番号:3C01p14
講演日時、会場:3月24日16:32～ C校舎01会場

難分解性多環芳香族炭化水素の微生物分解

Microbial degradation of hard-degradable polycyclic aromatic hydrocarbons

○馬　嵩、倉根　隆一郎（中部大・応生）
○Song　Ma, Ryuichiro　Kurane (CHUBU University)

【目的】石油成分中の難分解性多環芳香族炭化水素(PAHs)は発ガン性を有しており、主要な環境汚染対象物質である。人の健康や生態系に有害な影響を与える恐れを低減するため、その低減技術の開発が必要とされている。バイオレメディエーション技術は物理化学的な浄化技術と比較して、低コスト、環境への低負荷という大きな利点があり、期待されている。本研究はバイオレメディエーション開発に向けての第一歩として、PAHs 分解能を有する微生物を分離し、その分解能力を検討することを目的とした。
【方法・結果】モデル PAHs としてのナフタレン、フェナントレンを唯一炭素源とした液体培地を用い、沖縄県から採取した土壌サンプルから 4 週間の集積培養を行った後、sublimation 法で作製したフェナントレンプレートを利用して、PAHs 分解能を持っている 70 菌株を候補菌株として単離した。次に、フェナントレンプレート上のコロニーのクリアゾーンの大きさより PAHs 分解能をメルクマールとして、候補菌株を 12 菌株に絞り込んだ。さらに、選抜した菌株を 200ppm のフェナントレン無機培地に 1%接種して培養した後、ヘキサンを用いてフェナントレンを抽出し、ガスクロマトグラフィーで定量分析を行った。その結果、7 日間の培養で 5 菌株はフェナントレン分解度が 90%強を示した。

PAHs, degradation,

講演番号:3C01p15
講演日時、会場:3月24日16:43～ C校舎01会場

鉄還元性ヘテロ環芳香族化合物分解細菌の単離

Isolation of aromatic heterocyclic compounds-degrading iron reducer

○井上 謙吾、渡邊 史子、河野 好裕（宮崎大）
○Kengo Inoue, Fumiko Watanabe, Yoshihiro Kawano (Univ. Miyazaki)

【目的】環境汚染物質カルバゾール、ジベンゾチオフェン、ジベンゾフランは二つのベンゼン環を有する難分解性のヘテロ環芳香族化合物である。本研究では、これらの化合物を嫌気的に分解できる鉄還元菌の取得とその分解代謝経路の解明を目的とした。
【方法と結果】カルバゾール、ジベンゾチオフェン、ジベンゾフランいずれかが唯一の炭素源、エネルギー源、電子供与体、不溶性の酸化鉄が唯一の電子受容体となるよう調製した培地に自然界中から採取した河川底泥などのサンプルを植種源として添加して嫌気条件下30℃で静置培養を行った。酸化鉄の還元（磁化鉄の形成）が見られたサンプルは新鮮な培地にその一部を新しい培地に植え継ぐことで集積培養を行った。これまでに67種の異なる植種源からカルバゾール、ジベンゾチオフェン、ジベンゾフランでそれぞれ19、2、1種のサンプルにて4回以上の植え継ぎ後でも不溶性酸化鉄の還元が観察された。これら鉄還元菌を含む培養液を寒天培地に展開し、コロニーの形成が観察されたものに関してはそれぞれの株ごとで鉄還元能力を有するかどうか調べた。現在までのところ、単離されたもののうち鉄還元能力を有していた株として、カルバゾール、ジベンゾフランでそれぞれ6、1株ずつの取得に成功している。さらなる分解菌の単離を継続して行うとともに、単離が完了した鉄還元菌については、16S rDNA配列の決定による属種の同定と基質分解能力の解析を進めている。

Iron-reducing bacteria, carbazole, anaerobic degradation

講演番号：3C01p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎01会場

花香に含まれる2-エチルヘキサノールとその誘導体

Detection of 2-ethylhexanol and its derivatives in flower scents

○桑原　保正、清水 伸泰[1]（大阪府、京学園大・バイオ環境[1]）
○Yasumasa Kuwahara, Nobuhiro Shimizu[1] (Osaka-Pref., Kyotogakuendai[1])

【目的】農薬や医薬および工業資材を構成する多くの化学合成化合物は、地球環境中に蓄積せず、微生物を中心とした生物機能によって、理想的には代謝分解されているはずである。しかし、プラスチック製品の可塑剤として代表的なフタル酸ビス2-エチルヘキシルやアジピン酸ビス２－エチルヘキシルを頻繁に研究資材中に検出できることは、天然物化学研究の現場ではよく知られている。今回、花香を調べる過程で、その加水分解物である2-エチルヘキサノールを多くの花から一般的に、さらにその誘導体である成分を数種花香に検出したので報告する。
【方法】発散される花香をODS（オクタデシルシリカ）と活性炭の混合物を成型した吸着剤（MonoTrap RC C18, Rod型、ガスクロ工業KK、外径2.9 mm x 長さ5 mm）で24時間捕集し、ヘキサン50 µlで脱着・転溶後、一部（１－４µl）をそのままGC/MS分析 [HP-5MS　キャピラリーカラム（0.25mm id x 30 m, 膜圧0.25 µm）、温度条件：60°C(2min保持)-10°C/min-290°C、キャリヤーガス：He, 1 ml/min]に供した。市販品、あるいは合成物の分析結果を天然物のそれらと比較して、化学構造を決定した。
【結果】草本70種（品種を含む）木本83種（品種を含む）、合計153種（品種を含む）の花香を調べた。無香の花を中心に20種に2-エチルヘキサノールを主成分(クロマトグラムの相対強度100%)として検出した。さらに83種の花にその存在を観察できた。花香成分の多い花（香りの強い花）では2-エチルヘキサノールを直接検出できていないが、調べた花の54%に多少とも検出できたことから、普遍的に存在する成分と推察している。
植物によっては2-エチルヘキサノールをさらに代謝して、アルデヒド、有機酸および酸のエステルに、あるいは2-エチルヘキサノールを様々なエステルに誘導していた。
アルデヒドの 2-エチルヘキサナール(1)はバショウ*Musa basjoo* Siebold et Zucc.に相対強度3.7%で存在した。2-エチルヘキサン酸(2)はツクバネウツギ*Abelia spathukata* Siebold et Zucc.に相対強度2.2%で、2-エチルヘキサン酸メチル(3)はウメ*Prunus mume*とタニウツギ*Weigera hortensis* にそれぞれ 相対強度3.7%で存在した。
エステル化物としては、酢酸 2-エチルヘキシル(4)がニホンスイセン*Narcissus tazetta* var. *chinensis* とクサギ*Clerodendrum trichotomum* にそれぞれ相対強度0.7%と5.9%で、安息香酸 2-エチルヘキシル(5)がミヤマイボタ*Ligustrum tschonoskii* とトウネズミモチ*Ligustrum lucidum*にそれぞれ相対強度25.9%と3.0%で、さらにサリチル酸 2-エチルヘキシル(6)がラン ”バレーエンジェル”*Dendrobium* sp.に相対強度11.1%で存在した。

2-ethylhexanol, 2-ethylhexanol derivatives, flower scents

講演番号：3C01p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ C校舎01会場

タイトル　環境汚染物質ペルフルオロオクタン酸が3T3-L1脂肪前駆細胞に及ぼす影響
Title　Effect of perfluorooctanoic acid on the differentiation of 3T3-L1 adipocytes
○山本　純平、服部　一夫、大石　祐一（東農大応生科・栄養）
○Jyunpei Yamamoto, Kazuo Hattori, Yuichi Oishi (Tounodai)

【目的】ペルフルオロオクタン酸（PFOA）は、食物、水、大気中に存在し、自然界の生物すべてが暴露しているとされる環境汚染物質である。PFOAに対しては、血中のコレステロールレベルやトリグリセリドレベルとの相関性などが報告されているが、脂肪組織に対する影響はあまり報告されていない。そこで本研究では、PFOAが脂肪細胞に及ぼす影響について検討した。【方法】マウス由来脂肪前駆細胞3T3-L1を成熟脂肪細胞に分化させ、分化誘導時に終濃度で50, 100, 200 μmol/LとなるようにPFOAを培地に添加した。誘導後8日目に、Oil Red O染色により、細胞中の脂肪滴を観察した。また、GPDH活性及び細胞内トリグリセリド含有量は、市販のキットを用いて測定した。脂肪細胞分化関連遺伝子のmRNA発現量は、リアルタイムPCRにより測定した。【結果及び考察】GPDH活性、細胞内トリグリセリド含量及び脂肪細胞分化関連遺伝子（*PPARγ*、*RXRα*、*CEBP/α*、*aP2*、*GLUT4*、*LPL*）のmRNA量はPFOA添加後にいずれも有意に上昇した。これらの結果から、PFOAは脂肪細胞の分化を促進することが示唆された。このことは、脂肪滴をOil Red O染色した結果からも確認された。また、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであるPPARγのアンタゴニストGW9662により、PFOA添加後の*aP2* mRNA発現量は有意に減少した。以上のことから、PFOAはPPARγを介して脂肪細胞の分化を促進させることが示唆された。現在はPFOAのPPARγ転写活性を測定中である。

PFOA, 3T3-L1, adipocyte differentiation

講演番号：3C01p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ C校舎01会場

ファイトケラチン合成酵素を用いたカドミウムバイオセンサーの開発

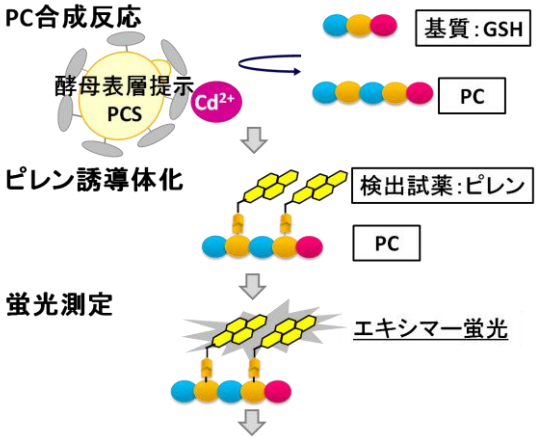
Development of cadmium biosensor using phytochelatin synthase

○山本陽介[1]、松浦秀幸[1]、村岡未彩[1]、植村佳乃子[1]、堀恭久[1]、赤石健児[1]、原田和生[1]、黒田浩一[2]、植田充美[2]、平田收正[1]（[1]阪大院薬、[2]京大院農・応用生命）

○Yousuke Yamamoto[1], Hideyuki Matsuura[1], Misa Muraoka[1], Kanoko Uemura[1], Yashuhisa Hori[1], Kenji Akaishi[1], Kazuo Harada[1], Kouichi Kuroda[2], Mitsuyoshi Ueda[2], Kazumasa Hirata[1]([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ,[2] Div. Appl. Life SCi., Grad. Sch Agric., Kyoto Univ)

【目的】カドミウムによる食品や環境の汚染は、現在も国内外において大きな問題となっているため、社会の環境や食の安全・安心に対する関心の高まりと相まって、カドミウムに対するリスク管理の必要性は依然高い。しかし、現在カドミウムのモニタリング方法として用いられている原子吸光法などの方法は、高価な分析機器や煩雑な作業を必要とするため、広範な試料の迅速な汚染調査には適していない。そのため、既存のカドミウム分析技術に代わる、迅速かつ簡便な検査技術、つまり一次スクリーニング的な自主検査に適したカドミウムモニタリング技術の開発が求められている。そこで本研究では、酵素をカドミウム分子認識素子、蛍光測定を検出方法とする新奇カドミウムバイオセンサーの開発を試みた。

【方法】本バイオセンサーの原理を右図に示す。カドミウムに応答して低分子ペプチド(ファイトケラチン; PC)を合成するPC合成酵素(PCS)を細胞表層に提示した酵母を分子認識素子として用いる。酵母細胞表層に固定化した酵素を用いることにより、PCSの安定性向上ならびに酵素調製の簡便化可能となる。PCS提示酵母により、グルタチオン(GSH)を基質として試料中のCd濃度依存的なPC合成が起こる。合成されたPCは、ピレン誘導体化することにより蛍光分光学的に検出する。ピレン誘導体化されたPCは、GSHが誘導体化された際とは異なった波長の蛍光(エキシマー蛍光)を発することから、PC特異的に濃度依存的なピレン誘導体の蛍光発光が測定できる。つまり、**ピレン誘導体の蛍光強度により試料中のCd濃度を測定する**原理となっている。



Cdバイオセンサーモデル図

【結果】本バイオセンサーシステムの検出能を調整した$CdCl_2$溶液によって評価したところ、マイクロモーラーレベルのカドミウムも検出することが可能であることを見出した。

phytochelatin, phytochelatin synthase, cadmium

講演番号:3C01p19
講演日時、会場:3月24日17:37～ C校舎01会場

メチルグリオキサール生成系および解毒系に及ぼすセレンの影響

The effects of selenium on generation and detoxification system of methylglyoxal in *Arabidopsis thaliana*.

○武田　徹、三宅　さつき、北澤　奈穂（近畿大・農・バイオ）
○Toru Takeda, Satsuki Miyake, Naho Kitazawa (Kinki Univ.)

【目的】セレン（Se）はヒトや動物にとって必須微量元素であるが、植物における生理機能の詳細は明らかになっていない。これまでに、我々はシロイヌナズナへの極微量のSe付与が、実生段階の生育を有意に増進させることを明らかにした。播種後17日目のコントロール植物とSe付与植物における解糖系酵素の活性を比較したところ、Se付与植物のトリオースリン酸イソメラーゼおよびNAD依存グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性がコントロール植物に比べて1.35 ± 0.02および1.43 ± 0.08倍増加していた。また、グリセルアルデヒド-3-リン酸およびジヒドロキシアセトンリン酸（DHA）量はSe付与植物で有意に減少していた。さらに、DHAより生成するメチルグリオキサール（MG）量もSe付与植物で有意に減少していた。MGは、植物の生育を阻害する活性カルボニルのひとつとして知られている。そこで今回は、シロイヌナズナ実生におけるMG生成系および解毒系に及ぼすSeの影響について検討した。
【方法】MG生成系および解毒系に及ぼすSeの影響は、グリセロール添加培地（～100 mM）およびMG添加培地（～1.2 mM）で生育させた植物体を用いて検討した。MG解毒に関与するアルドケトレダクターゼ（AKR)、グリオキサラーゼI（GOI）およびII（GOII）の活性は既報に従い分光学的に測定した。
【結果】シロイヌナズナ実生に含まれるMG量は、培地中のグリセロール濃度が高くなるに従い増加し、50 mM グリセロール添加培地では2.89 ± 0.04倍にまで増加していた。このグリセロールによるMG増加は、Se添加培地で生育させた植物体でも同様に認められた。また、シロイヌナズナ実生のマロンジアルデヒド量は、50 mM グリセロール添加培地ではSeの有無にかかわらず増加していなかった。これらのことから、グリセロール-3-リン酸およびDHAを介したMG生成系にSeは関与しないことが推測された。0.6 mM MG添加培地で生育させた植物体のMG量は、Seにより81.6%にまで抑えられていた。植物体のクロロフィル量は、0.6 mM MGにより70.5%まで低下していたのに対して、Se存在下では77.0%の低下であった。MGラジカルを還元するAKRと、MGを*S*-ラクトイルグルタチオンおよびグルタチオンに変換するGOIおよびGOIIの活性を比較したところ、0.6 mM MG添加培地におけるAKRおよびGOII活性はそれぞれ1.72 ± 0.22および2.80 ± 0.14倍増加していた。AKR活性のMGによる上昇は、Seにより抑えられる傾向であったが、GOII活性のMGによる上昇は、Seにより増加（3.30 ± 0.18倍）していた。以上のことから、Seは植物細胞内におけるMGラジカルによる障害に対し直接関与しないものの、GOIIを活性化することにより、蓄積する前にMGを積極的に消去していることが示唆された。

selenium, methylglyoxal, *Arabidopsis*

講演番号：3C01p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ C校舎01会場

組換え体シロイヌナズナを用いたPCB同族体と重金属の共汚染のファイトモニタリング

Phytomonitoring of PCB congeners and metals in transgenic *Arabidopsis* plants

○嶋津小百合、太田雅也[1]、大川秀郎[2]、芦田　均
（神戸大院・農、[1]福山大生命工・生物工、[2]早大・規範科学総合研）
○Sayuri Shimazu, Masaya Ohta[1], Hideo Ohkawa[2], Hitoshi Ashida
(Kobe University, [1] Fukuyama University, [2] Waseda University)

【目的】PCB同族体と共に環境を共汚染している重金属による複合汚染が問題となっている。そのため、それらの複合的な影響評価と汚染浄化が求められている。モルモットAhR (gAhR) のリガンド結合領域、LexAのDNA結合領域およびVP16の転写活性化領域からなる組換え型gAhRとβ-グルクロニダーゼ (GUS) レポーター遺伝子発現系[1, 2)]を導入した組換え体シロイヌナズナを用いたPCB同族体のファイトモニタリングにおける金属類の影響について検討した。
【方法】組換え型gAhR/GUSレポーター遺伝子系導入シロイヌナズナXgD2V11-6系統をPCB同族体 (PCB126 (TEF:0.1)、PCB169 (TEF:0.03)、PCB80 (TEF:0)) または金属類 (Fe、Cu、Zn、Cd、Pb) を添加したムラシゲ・スクーグ (MS) 培地で2週間栽培し、植物体のGUS活性を測定した。また、そこにバイオサーファクタントを添加し、その影響を検討した。
【結果】PCB126 (TEF:0.1) とPCB169 (TEF:0.03) のアッセイにおいては、PCB126が最も高いGUS誘導活性を示し、PCB169はそれよりも低かったことからPCB同族体のTEF依存的なGUS誘導活性が認められた。さらに、PCB126とPCB169の混合条件では相加的なGUS活性の上昇が認められた。それに対して、PCB126とPCB80 (TEF:0) のアッセイではPCB80によるGUS誘導活性は認められなかった。PCB126添加培地における金属類の添加効果を検討したところ、Fe、CuおよびZnの添加では変化が認められなかったのに対し、CdとPbの添加で相加的なGUS誘導活性の上昇が認められた。また、CdとPbによる相加的作用は重金属の濃度に依存的であった。これまでに、バイオサーファクタントがPCB126が誘導するGUS活性を増加させることを見出している[2)]が、Cdの添加で上昇したGUS活性に対しては影響を及ぼさなかった。
　以上の結果より、煩雑な抽出・前処理操作を必要とする機器分析や動物細胞や抗体を用いる測定方法と異なり、組換え体植物の栽培により、抽出・前処理することなく、根系を介した受動拡散による取込みにより、誘導発現したGUS活性をもとにPCB同族体をアッセイすることができた。また、重金属を含む環境共汚染物質の複合的な影響を評価できる可能性が示された。
本研究は科研費（21510095）の助成を受けたものである。

参考文献

1) S. Shimazu *et al*., *J. Environ. Sci. Health B.*, **45**, 741-749 (2010).
2) S. Shimazu *et al*., *J. Environ. Sci. Health B.*, **45**, 750-756 (2010).

phytomonitoring, PCB congeners, heavy metals

講演番号:3C02a01
講演日時、会場:3月24日09:00～ C校舎02会場

パン酵母を練り込んだレーヨン繊維による大腸菌の特異的捕捉

Trapping of E. coli with yeast-embedded rayon fibers

佐藤　佳織、佐藤　まゆみ、高岡　和千代[1]、児玉　令[2]、○古川　清（長岡技科大・生物、[1]三菱製紙・総合研、[2]ダイワボウレーヨン株）

Kaori Sato, Mayumi Sato, Kazuchiyo Takaoka[1], Rei Kodama[2], ○Kiyoshi Furukawa (Nagaoka Univ. of Technol., [1]Mitsubishi Paper Mills Ltd., [2]Daiwabo Rayon Co., Ltd.)

【目的】大震災などの一次災害の後には、感染症を主体とした二次災害の発生が危惧される。感染症の原因となる多くの病原菌は、宿主であるヒトの粘膜上皮のタンパク質や脂質に結合した糖鎖と結合する。我々は環境中の身近な感染菌として、大腸菌に着目した。大腸菌の多くはI型繊毛をもち、この繊毛にマンノースと結合する受容体が存在する。我々はこれまでの本体会でオリゴマンノースやマンナンを固定したビーズを用い、大腸菌を選択的に捕捉できることを報告した。しかしこの方法では調製に時間と経費がかかり、実用的でなかった。そこで今回はその表面がマンナンで覆われているパン酵母に着目し、この安価な食品で大腸菌を特異的に捕捉できるかどうかを検討し、さらにこの酵母をレーヨンに練り込んだ繊維を用い、大腸菌を捕集できるかどうかを検討した。

【方法】パン酵母を水で膨潤後、1N酢酸で固定した。これをPKH2試薬で蛍光標識をした大腸菌と保温し、一定時間後に酵母をリン酸緩衝液で十分洗浄し、酵母に結合している蛍光を、共焦点レーザ顕微鏡で解析した。次にレーヨン原料にパン酵母を混合し、レーヨン繊維を合成した。対照として、酵母の代わりにウシのミルクタンパク質を用いた。

【結果】酵母と大腸菌を保温すると酵母の表面を蛍光が覆い、多数の大腸菌が酵母の表面に結合した。この結合は酵母と大腸菌の混合液に0.1 Mα-メチルマンノシドを加えると蛍光強度が減少することから、大腸菌が酵母表面のマンノースと特異的に結合していることが判明した。パン酵母やミルクタンパク質を練り込んだレーヨン繊維と蛍光標識をした大腸菌を保温すると、大腸菌は酵母を練り込んだレーヨン繊維とのみ結合し、この結合もハプテン糖の添加で消失した。

以上の結果から、パン酵母を練り込んだレーヨン繊維を精水器などで利用することで、大腸菌を除去した水を得ることができると考えられる。さらに開発途上国では上下水道の整備の遅れから水道水に大腸菌が混入し、住民の健康を損ねている。こうした現状も、上記の製品を拡大利用することで改善することができると期待される。

E. coli, yeast, rayon

講演番号:3C02a02
講演日時、会場:3月24日09:11～ C校舎02会場

タイトル　固定化微生物による溶液中のリン回収法の検討

Title　Phosphorus removal by immobilized microbe

○似内 洋祐，比嘉景市[1]，鈴木義規[1]，斎木博[1]（工科大院・バイオ，[1]工科大・応生）

○Yosuke Nitanai, Keiichi Higa[1], Yoshinori Suzuki[1], Hiroshi Saiki[1] (Tokyo Univ. Technol. Grad. School, [1]Tokyo Univ. Technol.)

【目的】排水中のリンの除去には，下水処理場で広く用いられている活性汚泥法にて行われてきた．しかし，再資源化する目的で汚泥内に蓄積したリンを取り出すには手間とコストがかかる．本研究ではリンを菌体内へ高濃度に蓄積する性質を持つ微生物であるPolyphosphate Accumulating Organisms（PAOs）の中でも，リン除去に関して中心的な役割を果たしている*Microlunatus phosphovorus*（*M. phosphovorus*）を用いて，溶液中のリン除去法，再資源化の為に溶液中にリン酸イオンを放出させる条件の検討を行った．また，リンを高濃度に蓄積した菌体を効率よく取り出すために，微生物をアルギン酸カルシウムにて固定化して実験を行った．

【方法】2日間培養した*M. phosphovorus*を90 mL分注し，遠心分離機にて8000 rpm，5 minの条件で集菌を行った後に，1%アルギン酸ナトリウム溶液10 mLで回収した菌体を再懸濁させた．その後，シリンジを用いて0.05 M塩化カルシウム水溶液に滴下し，微生物が固定化されたビーズを作製した．作製したビーズを20 mg/Lリン酸イオン水溶液50 mLに入れ，好気条件下で振とう培養(25℃，130 rpm)を行った．2時間ごとにサンプルを採取し，リン酸イオン濃度をモリブデン青吸光光度法にて測定した．測定はリン酸イオン濃度がゼロになるまで(0，2，4，6，24時間目まで)続けた．その後，リンを吸収させたビーズからのリン放出実験を行った．取り出したビーズを生理食塩水で洗浄し，バイアル瓶に50 mL生理食塩水と共にビーズを入れ，窒素による気相置換を行った．サンプリングは0，2，4，8，16，24，48，72時間目に行い，同様の手順でモリブデン青吸光光度法によるリン酸イオン濃度の測定を行った．

【結果】集菌した菌体をアルギン酸カルシウムにて固定化し，20 mg/Lリン酸イオン水溶液50 mLにて培養を続けると，時間経過と共にリン酸イオン濃度が減少していき，6時間目にはゼロになった．その後，リン酸イオンが吸収されているビーズを回収し生理食塩水にて洗浄，嫌気条件下にして実験を続けたところ，2時間目からリン酸イオンの放出が始まった．培養を続け，48時間後にはリンを吸収させる以前の20 mg/Lを超える濃度となった．固定化する前に行った前培養の際に用いた培地から，リンの持ち込みがあったためと考えられる．これら2つの結果から，固定化した微生物によって溶液中のリンの吸収と，溶液中にリンを放出させることが，条件によってコントロール可能であることがわかった．同時に，溶液中のリンを微生物内に蓄積させ，アルギン酸カルシウムビーズを取り出すことで，溶液中のリン酸イオンを簡便かつ効率的に回収できる事が示唆された．

Keyword ; phosphorus removal,　phosphorus uptake, immobilize

講演番号：3C02a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎02会場

1,4-ジオキサン分解活性を有する活性汚泥および分解微生物の性質

Properties of the activated suludge and the microorganisms which degrade 1,4-dioxane.

○大本 貴士、山中 勇人、森芳 邦彦、駒 大輔、酒井 清文、高橋 真[1]（阪市工研、[1]（株）三宝化学研究所））

○Takashi Ohmoto, Hayato Yamanaka, Kunihiko Moriyoshi, Daisuke Koma, Kiyofumi Sakai, Makoto Takahashi[1] (OMTRI, [1]Sanbo Chemical Ind., Ltd.)

【目的】1,4-ジオキサン（図１）は環状エーテル化合物で、一般的な反応用の溶剤、塩素系有機溶剤の安定剤、洗浄用溶剤、医薬品合成原料等として広く用いられている。また、一部の界面活性剤中に副生成物として含まれることも指摘されている。「化審法」においては難分解性で第２種監視化学物質に分類されており、また発癌性の疑いのある化学物質であることも示され、水道水質基準、健康保護に係る水質環境基準、地下水環境基準で50μg/Lの基準値が設けられている。一方、1,4-ジオキサンは「下水処理場で高濃度流入水がほとんど分解されずに排出されている」という報告があり、河川水、地下水でしばしば検出されている。そこで、1,4-ジオキサンを含む廃水等の処理を目的として、1,4-ジオキサンを有効に分解できる活性汚泥ならびに、そこに生息する分解菌の性質を調べたので報告する。

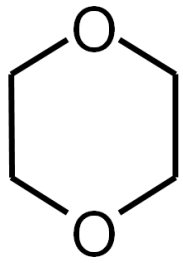


図１ 1,4-ジオキサンの構造

【方法】クーロメータを用いたBOD測定法で、活性汚泥の1,4-ジオキサン分解活性を測定した。1,4-ジオキサン分解菌の検索は、BOD測定後の微生物叢を1,4-ジオキサンを唯一炭素源とする平板培地に塗沫し、本培地に生育する微生物を得ることによって行った。休止菌体の環状エーテル化合物に対する分解活性の測定は、GC-MSによるヘッドスペース法で培養液中の残存物を測定することによって行った。

【結果】工場廃液処理用活性汚泥(IWAS)、および、都市下水処理用活性汚泥(MWAS）を用いて1,4-ジオキサンに対する分解活性を調べたところ、MWASでは分解活性が認められなかったが、IWASでは高い分解活性が認められた。1,4-ジオキサン分解菌の検索を行ったところ２種の*Mycobacterium*属細菌（SK81-1F株、SK87-1F株）を得た。16S rDNAに対する相同性検索の結果、これらは*M. parafortuitum* および*M. goodii*と高い相同性を示した。BOD法による分解活性の測定では、両株とも理論的酸素消費量に対して約67%の分解率を示し、1,4-ジオキサンを完全分解することが示唆された。SK81-1F株、SK87-1F株は、それぞれ1,4-ジオキサン濃度が5,000mg/L以下、7,000 mg/L以下の培地で生育した。休止菌体は、1,4-ジオキサン、1,3-ジオキサン、テトラヒドロフラン、2-メチルテトラヒドロピラン、2-メチルテトラヒドロフランを分解し、このとき極微量の中間物が一時的に蓄積したが、GC-MS分析では基質の親ピークと比較してm/zが2小さかった。また、SK87-1F株は、1,4-ジオキサン培地で培養した場合にフロック形成し、沈殿回収が容易であった。

1,4-dioxane, actinomycete, degradation

講演番号：3C02a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎02会場

活性汚泥代謝産物によるテトラクロロエチレンの減少に関する研究

Reduction of Tetrachloroethylene by Metabolite of Microorganisms in Activated Sluge

○奥村 健一[1]、大野 勝也[2,3]、中村 浩平[1]、高見澤 一裕[1]（[1]岐阜大学院応生・資源生命、[2]岐大連農、[3]イビデン）

○ Ken-ichi Okumura[1], Katsuya Ohno[2,3], Kouhei Nakamura[1], Kazuhiro Takamizawa[1] ([1]Grad. Sch. Appl. Biol. Gifu Univ.、[2]United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ., [3]IBIDEN)

【目的】テトラクロロエチレン（PCE）は、強い脱脂洗浄力を示すことから様々な分野で使用されてきたが、環境中に排出された塩素化エチレンは難分解性物質であるため広範な地下水汚染を引き起こしている。これまで多くの嫌気性微生物による塩素化エチレンの分解が報告されているが、そのほとんどが途中の分解反応で停止する。一方で、好気反応によるPCEの分解は、嫌気的脱塩素化反応と比べ、分解反応が速く毒性の高い分解産物が蓄積しないことが期待できる。

本研究で使用した活性汚泥は、馴養すると好気条件でPCEを減少させることが明らかにされている。本研究では、その活性汚泥を用いて、PCE減少に関与する物質の同定、減少メカニズムの解明を目的とした。

【方法及び結果】活性汚泥は、好気条件でPCEを長期間連続添加することで馴養させた。馴養後、活性汚泥をバイアル瓶に入れ密栓し、24時間120 rpmで振盪した。その結果、滅菌済みの活性汚泥と比較して31%のPCEの減少が確認された（GC-MS及びGC-FID）。活性汚泥をガラスフィルター（GS-25：孔径1.0 μm）、メンブレンフィルター（孔径0.2 μm）でろ過した上清でもPCEを減少させることが確認された。また、活性汚泥上清はオートクレーブ、あるいは活性炭で処理することによってPCEの減少が確認されなくなった。このことから、活性汚泥に含まれる細胞外物質がPCEの減少に関与していることが考えられた。

菌体外酵素による酸化分解を想定し、市販のペルオキシダーゼを用いて同様にPCEの減少反応を試みたが、現時点では減少は確認されていない。次に、汚泥上清を限外ろ過によって、分子量3、5、10 Kに分画した。3 Kより大きい分子量の画分では、最大5.4%のPCEの減少が確認されたが、3 K以下の画分では41%のPCEが減少した。したがって、分子量3 K以下の菌体の細胞外物質がPCEの減少に関与していることが示唆された。また、汚泥上清を凍結乾燥濃縮することで、最大で49%までPCEが減少した。

汚泥上清中の塩濃度によってPCEの溶解度が変化し、分析結果に影響を及ぼすと考えられた。そこで、比較対象には濃縮汚泥上清中の塩と同濃度のNaCl溶液（NaClコントロール）を用いた。濃縮汚泥上清及びNaClコントロールは、上記同様に反応させた。その結果、濃縮汚泥上清は、NaClコントロールと比較して39%のPCEが減少した。汚泥上清がどのような機構でPCEを減少するのか、現在研究を進めている。

bioremediation, tetrachloroethylene, activated sludge

講演番号:3C02a05
講演日時、会場:3月24日09:44～ C校舎02会場

消石灰散布による土壌生態系への影響

Influence on the soil ecosystem by sprinkling slaked lime

〇濱崎 洋輔、森 美穂、坂上 吉一（近畿大院・農）
〇Yosuke Hamazaki, Miho Mori, Yoshikazu Sakagami (Kinki University)

【背景・目的】　高病原性鳥インフルエンザや口蹄疫などの家畜伝染病が発生すると、家畜伝染病予防法により感染施設やその周辺域の消毒に大量の消石灰が使用される。消石灰は水に溶解すると高い pH 値を示し、殺菌作用を持つ。また、大気中の二酸化炭素と反応し無毒な炭酸カルシウムに変化することから、環境への負荷も小さいと考えられている。農林水産省は各自治体に 1 m^2 あたり 0.5～1.0 kg 散布するよう通達している。しかしながら、その散布量に設定した明確な根拠や基準が存在していないうえに、散布による生態系への影響に関する報告はほとんど認められない。そこで本研究では、消石灰を屋外の土壌に散布し、土壌微生物と土壌動物に及ぼす影響を調査した。

【方法と結果】　キャンパス内の荒地に 0, 0.3, 0.5, 1.0 kg/m^2 の濃度の消石灰を散布し、経時的に深さ 5 cm の土壌をサンプリングした。土壌 pH を測定した結果、経過時間および消石灰濃度に依存した差異は認められなかった。次に、採集した土壌試料を滅菌生理食塩水で希釈後、R2A 寒天培地に塗布し、28℃で 48 時間培養し、得られたコロニー数の計測と形態学的な分類を行なった。その結果、各土壌中に存在する微生物数に顕著な差異は認められなかった。現在、土壌動物に及ぼす消石灰の影響について検討中である。

slaked lime, soil ecosystem

講演番号:3C02a06
講演日時、会場:3月24日10:05～ C校舎02会場

土壌からのPAH分解糸状菌の単離とその基質特異性

Isolation of PAHs-degrading fungus from soil and its substrate specificity

○鈴木　健太郎、川上由紀子、後藤純雄[1)]、峯木　茂（東理大院・応生科、[1)] 麻布大・環境科）
○ Kentaro Suzuki,Yukiko kawakami,Sumio Goto[1)],Shigeru Mineki (Tokyo University of Science,[1)]Azabu University)

【目的】

多環芳香族炭化水素化合物（PAHs）類は代表的な発がん関連環境汚染物質群であり、中でも４環以上の PAHs は分解されにくく、環境中に残留しやすいという特徴がある。

環境中では様々な環境条件下で種々の微生物が PAHs の分解に関わっていると考えられている。その中でも、バクテリアや白色腐朽菌による PAH 分解の報告に比べ、糸状菌による PAH 分解に関する報告は少ない。そこで本研究では、土壌より単離した糸状菌を用いて、発生量が多い４環系 PAH であるピレンとフルオランテンの分解能を検討した。

【方法】

糸状菌の単離：静岡県浜松市など、８箇所から採取した土壌サンプルをそれぞれピレン添加Czapek-Dox培地で集積培養し、ピレンの蛍光消失を指標としてスクリーニングを行った。その結果、分解菌(A,B,C)計３株単離し、そのうち静岡県磐田市より単離したA株の18s rDNAを標的としたダイレクトシークエンスを行った。またA株のスライド培養を行い、形態を顕微鏡で観察した。

試料調製：酵母エキス添加Czapek-Dox培地中に40 mg/mlの濃度になるようにピレン又はフルオランテンを添加し、OD_{600}=0.5に調整したA株の胞子液100μlを植菌した。これを28℃／100rpmで７日間培養した後、ジクロロメタンでピレンまたはフルオランテンを抽出し、d_{10}ピレンまたは、d_{10}フルオランテンを内部標準としてGC/MS分析に供した。

【結果】

本糸状菌株の18S rDNA配列を決定した結果、*Trichoderma koningii*の18S rDNA配列と相同性が高いことが確認できた。また、顕微鏡観察を行った結果、*Trichoderma*属に特徴的な分生子形成細胞を観察することができた。本糸状菌株によるピレン分解に関しては、７日後でおよそ25%の減少が見られ、フルオランテンに関しては7日間でおよそ15%の減少が確認できた。

この結果から、*Trichoderma koningii*による初のピレン分解報告を示すことができたと共に、本糸状菌株はフルオランテンよりピレンをより分解するということが示された。

本糸状菌株についてはフェナントレンなどの他PAHsについても分解試験を行っており、他の2株の系統解析とPAHs分解能に関する結果もあわせて報告する予定である。

PAHs、 *Trichoderma*、pyrene

講演番号：3C02a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎02会場

並行複式無機化法による有機質肥料活用型養液栽培

Organic hydroponics by multiple parallel mineralization

○篠原 信、藤原 和樹、小川 順[1]、安藤晃規[2]、加藤 康夫[3]、宮本 憲二[4]、高野 雅夫[5]、青山ちひろ[5]（農研機構、[1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]富山県大工・生物工、[4]慶大・理工、[5]名大院・環境）

○ Makoto Shinohara, Fujiwara kazuki, Jun Ogawa[1], Akinori Ando[1], Yasuo Kato[2], Kenji Miyamoto[3], Masao Takano[4], Chihiro Aoyama[4] (NARO, [1]Kyoto Univ., [2]Toyama Pref. Univ., [3]Keio Univ., [4]Nagoya Univ.)

【目的】従来の養液栽培は無機化学肥料しか使えない技術的限界があったが、有機質肥料を活用できる新技術（有機質肥料活用型養液栽培）が2005年に開発され、無機養液栽培に比べ環境負荷を低減できる新栽培技術として注目を集めている[1)]。しかし栽培前の工程（並行複式無機化反応）で2週間～1ヶ月を要し、すぐに栽培を開始できない課題があった。本研究では、微生物を担体に固定化し、有機物の分解をより高速にすることを試みた。

【方法・結果】並行複式無機化反応（有機態窒素を硝酸態窒素に変換する反応）を触媒する微生物群を培養し、各種固体担体に固定化した。担体をカラム状に成形し、これに各種有機物を添加すると、速やかに硝酸態窒素として回収することができた。回収された溶液を用いて生育試験を行うと、コマツナ・チンゲンサイは順調に生育した。本分解法は曝気が不要で分解に電力エネルギーなどが必要なく、有機質資源を原料として無機肥料を製造する新技術として期待される。

organic hydroponics, multiple parallel mineralization, microbial carrier

講演番号:3C02a08
講演日時、会場:3月24日10:27～ C校舎02会場

Nitrosomonas europaea IFO14298 のアンモニア酸化活性を向上させる作用メカニズムの解析

Studies on an interaction mechanism for enhancement of ammonia-oxidizing activity in *Nitrosomonas europaea* 14298

○坂上景子、伊東義兼、生田　創[1]、三輪京子、松本光史[2]、森川正章（北大院環境・環境分子、[1]日立プラントテクノロジー・松戸研、[2]電源開発（株）・若松研）

○Keiko Sakagami, Yoshikane Itoh, Hajime Ikuta[1], Kyoko Miwa, Mitsufumi Matsumoto[2], Masaaki Morikawa (Environmental Molecular Biology, Graduate School of Environmental Science, [1]Environmental Systems Development Matsudo Lab., Hitachi Plant Technologies, Ltd., [2]Wakamatsu Research Institute, Technology Development Center, Electric Power Development Co., Ltd.)

【背景と目的】水環境汚染の主な原因物質であるアンモニアは、活性汚泥を構成する細菌群による硝化過程と脱窒過程を経て、最終的に窒素ガスへと分解される。硝化過程の最初のステップを担うアンモニア酸化細菌（AOB）は、活性汚泥中において様々な微生物と密接な関係のもとで共存しているが、その相互作用については、脱窒菌以外いまだ十分な知見がない。私たちは、AOB のアンモニア酸化活性に正の影響を与えている未知の細菌が存在すると考え、火力発電所排水処理槽の活性汚泥から単離した100種の細菌から、代表的な AOB である*Nitrosomonas europaea* IFO14298 のアンモニア酸化活性を向上させる新規従属栄養細菌 JPCCMR3 を取得している(1)。本研究では、JPCCMR3 の作用メカニズムについて検討した。

【結果と考察】これまでに、*N. europaea* と JPCCMR3 との相互作用が、脱窒作用によるNO_2^-を介した栄養共生ではないことを確認している(1)。今回、JPCCMR3 をゲル包括固定して、*N. europaea* と共培養を行っても、浮遊細胞と同様に *N. europaea* のアンモニア酸化活性を向上させることがわかった。したがって、JPCCMR3 は、*N. europaea* のアンモニア酸化活性に影響を与えるなんらかの低分子化合物を細胞外に生産していることが示唆されたので、現在、JPCCMR3 の培養上清に含まれる低分子について、HPLC分析を行っている。また、*N. europaea* が利用可能な有機物がいくつか報告されているので、それらを*N. europaea* IFO14298 の培養液に添加した際のアンモニア酸化活性に与える影響を評価した結果についても報告する。

(1) 日本農芸化学会2010年度大会要旨集

Nitrosomonas europaea IFO14298, heterotroph, ammonia-oxidizing activity

講演番号：3C02a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎02会場

バイオオーギュメンテーションによる、廃水処理場から放出される温室効果ガスN_2Oの抑止

The prevention of N_2O emissions in wastewater treatment plants by bioaugmentation

○松岡真生、宮原盛雄、金尚完、伏信進矢、渡辺昭[1]、祥雲弘文、若木高善（東大院農生科・応生工、[1]荏原製作所）

○Masaki Matsuoka, Morio Miyahara, Sang-wan Kim, Shinya Fushinobu, Akira Watanabe[1], Hirofumi Shoun, Takayoshi Wakagi (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo. [1]Ebara Engineering Service Co., Ltd.)

脱窒の中間産物であるN_2Oは、温室効果ガスとしての能力が極めて高く、オゾン層破壊の最大要因とも言われている。近年、廃水処理場における窒素除去過程から、N_2Oの発生が報告されている。その中でも、脱窒工程由来のN_2Oの発生は、亜酸化窒素還元酵素（N_2Or）が酸素によって阻害されることや、他にも、亜硝酸の蓄積、低いC/N比であることが原因であると考えられている。特に、養豚糞尿廃水処理場では、廃水が高濃度のアンモニアを含んでいるために大量のN_2Oの放出されていることが報告されており、早急な解決が迫られている。

このN_2O発生の抑止策として、廃水処理場に有用脱窒菌を添加するバイオオーギュメンテーションという手法が考えられた。我々はバイオオーギュメンテーションに利用する有用脱窒菌を探索し、廃水処理場の環境に似たPig manure（PM）培地を用いたN_2O集積培養により、活性汚泥からM-01株とM-11株を単離した。16S rRNA遺伝子による系統学的解析から、両株とも*Pseudomonas*属であることが分かった。また、M-01株は、亜硝酸からの脱窒能が非常に弱いがN_2O還元能は強いという珍しい脱窒特性を、M-11株は、亜硝酸脱窒能、N_2O還元能ともに強いという脱窒特性を、有していることも分かった。脱窒基質として亜硝酸とN_2Oが共存下にある培養では、両株とも亜硝酸よりもN_2Oを優先的に消費した。M-01株は脱窒特性からその結果が想像できるが、M-11株に関しては、亜硝酸脱窒がおきているところにN_2Oを添加すると、亜硝酸からの脱窒が阻害されN_2O還元が優先されるという、今までにない現象が観察された。この現象のメカニズムはただいま解析中であるが、この、亜硝酸よりもN_2Oを優先的に利用する脱窒特性が廃水処理場のN_2O抑止に重要な役割を示すのではないかと考えた。

実際に、試験管レベルで両株を活性汚泥とのバイオオーギュメンテーションに利用したところ、両株とも高いN_2O抑止効果が認められた。さらに、廃水処理場への添加を想定し運転を模倣したメスシリンダーでの連続運転においても、両株は高いN_2O抑止効果が実証された。特に、M-01株は、培養を通して生残性を維持していたことから、長期に渡って廃水処理場でN_2O抑止に貢献できる可能性を秘めている。

N_2O, wastewater treatment, denitrification

講演番号：3C02a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ C校舎02会場

水田土壌から分離した脱窒細菌の接種による畑土壌からの一酸化二窒素(N_2O)ガス発生低減化

Mitigation of nitrous oxide gas emission from upland soil by inoculation of denitrifying bacteria isolated from paddy soils

全 愛花[1]、西澤 智康[1]、多胡 香奈子[1,2]、石井 聡[1,3]、磯部 一夫[1]、大塚 重人[1]、○妹尾 啓史[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]現）農環研，[3]現）北大院工）

Aihua Quan[1], Tomoyasu Nishizawa[1], Kanako Tago[1,2], Satoshi Ishii[1,3], Kazuo Isobe[1], Shigeto Otsuka[1], ○Keishi Senoo[1]（[1]Grad. Sch. of Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Present）NIAES, [3]Present）Grad. Sch. of Engineer., Hokkaido Univ.）

【目的】農耕地土壌、特に畑土壌から施肥窒素に由来して温室効果ガスの一つである一酸化二窒素（亜酸化窒素、N_2O）ガスが発生して問題となっている。一方、水田ではN_2Oガス発生が少ないことから、水田土壌に生息する脱窒細菌がN_2Oを還元していると考えられる。我々は、これまでに日本各地の水田土壌からFunctional Single Cell分離法により多数の脱窒細菌株を分離した。その中から選抜したN_2O還元能力の高い菌株を畑土壌に導入することによりN_2Oガス発生低減化を目指している。本研究では、N_2Oガスを発生する室内土壌ミクロコズムを構築し、菌株の接種によるN_2Oガス発生低減効果を調べた。

【方法】畑土壌（灰色低地土）に硝酸を添加してバイアル瓶に入れ、水田土壌から分離・選抜したN_2O還元能力の高い脱窒細菌19株を各々接種して嫌気的に暗所30℃で5日間培養した後、気相のN_2O濃度をガスクロマトグラフィー（GC）で測定した。また、バイアル瓶に有機質ペレット肥料を入れて脱窒細菌21株を各々接種し、嫌気的または好気的に暗所30℃で5日間培養した後、気相のN_2O濃度をGCで測定した。一方、バイアル瓶系実験で良好なN_2O発生低減効果を示した脱窒細菌8株を有機質ペレット肥料に各々接種し、畑土壌（灰色低地土ならびに黒ボク土）に混合してジャム瓶に入れ、畑状態水分（最大容水量の60%）、暗所26℃で培養した。土壌全体に脱窒菌株を接種する系も設けた。数日毎に蓋を閉めてから1時間後の気相に含まれるN_2O濃度をGCで測定した。

【結果・考察】硝酸を添加して嫌気的に培養した土壌からは脱窒由来と考えられるN_2O発生が見られ、脱窒細菌株の接種により発生を低減化できた。有機質ペレット肥料からは嫌気的培養、好気的培養のいずれの場合にもN_2O発生が見られ、前者では脱窒に、後者では硝化または脱窒に由来すると考えられた。供試した21株の脱窒細菌のうち多くの菌株が嫌気および好気条件下でN_2O発生量を低減させた。ジャム瓶系実験では灰色低地土と黒ボク土とでN_2O発生パターンが異なり、前者では培養日数経過後の、後者では培養開始直後のN_2O発生が顕著であった。供試した8株のうち*Azoarcus* sp.と*Niastella* sp.の菌株が顕著なN_2O発生低減効果を示した。

本研究により、畑土壌から窒素肥料に由来して発生するN_2Oガスを低減化できる脱窒細菌株を取得できた。

本研究は生研センターイノベーション創出事業の支援を受けた。

upland soil, mitigation of nitrous oxide emission, denitrifying bacteria

講演番号：3C02a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ C校舎02会場

海洋性細菌 *Marinobacter* sp. E-31株によるトルエンの分解

Biodegradation of Toluene by *Marinobacter* sp. strain E-31.

○城谷 達也、岩木 宏明、長谷川 喜衛（関西大・化学生命工）
○Tatsuya Shirotani, Hiroaki Iwaki, Yoshie Hasegawa (Kansai University)

【目的】ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、キシレン(BTEX)は石油化学工業において広く使用されており、環境汚染が問題となっている。こうした環境汚染物質の微生物分解に関する研究は、主に陸生細菌を利用した研究が多くを占め、海洋性細菌による環境汚染物質の分解に関する研究はあまり行われていない。これまでに、日本列島沿岸からトルエン資化性菌6株を分離した。16S rRNA遺伝子配列に基づく系統解析の結果から、分離株は海洋性細菌に近縁であることを報告している。今回は、分離菌 *Marinobacter* sp. E-31株によるトルエン分解経路及びトルエン分解遺伝子の解析を行った。

【方法】休止菌体の調製：休止菌体は、唯一の炭素源としてトルエンを添加した人工海水培地で培養し、得られた菌体から調製した。各物質の定量はHPLC分析により検討した。

PCRによるトルエン分解遺伝子の増幅及び解析：E-31株のトルエン分解に関与するdioxygenase遺伝子の部分配列の増幅は、陸生細菌のtoluene dioxygenase large subunitの配列を基に作成したプライマーで行った。toluene dioxygenase遺伝子の全域の取得は、inverse PCRで行った。取得したPCR産物の塩基配列の解析は、BLASTを用いて行った。

【結果及び考察】E-31 株を唯一の炭素源としてトルエンを添加した人工海水培地で培養すると、培養液の色は黄色を呈した。培養液の吸収波長を測定したところ、トルエン分解中間物質として報告されている 3-メチルカテコールがメタ開裂した 2-ヒドロキシ-6-オキソヘプタ-2,4-ジエン酸の極大吸収と近似した値を示した。また、休止菌体による変換の結果、3-メチルカテコールに対してのみ分解が認められ、*o* -クレゾール, *m*-クレゾールに対しては分解を示さなかった。これらの結果から、E-31 株はトルエンを *o* -クレゾール, *m*-クレゾールを経由せず、直接 3-メチルカテコールへ変換する dioxygenase 経路で分解していると推定された。

そこで、E-31株のdioxygenase遺伝子の取得を目的としたPCRを行ったところ、510bpのPCR産物を取得した。取得したPCR産物の塩基配列を解析したところ、陸生細菌由来のtoluene dioxygenase large subunitと相同性を示したことから目的遺伝子の一部が増幅したと推定された。toluene dioxygenase遺伝子全域を取得するためinverse PCRを行い、取得したPCR産物の配列を解析した。その結果、toluene dioxygenase large subunit遺伝子全域が得られ、そのアミノ酸配列は陸生細菌由来のものに対し50-90%の相同性を示すことがわかった。さらに周辺にはトルエン分解に関与すると思われる遺伝子が存在した。現在トルエン分解系遺伝子群の全体像を明らかにするため、周辺領域の取得及び解析を行っている。

marine bacteria, Toluene, biodegradation

講演番号:3C02a12
講演日時、会場:3月24日11:21～ C校舎02会場

耐酸性油脂分解菌*Burkholderia multivorans* R128株の油脂分解特性

Isolation and characterization of *Burkholderia multivorans* R128 capable of degrading fats and oils under acidic pH condition.

○宇津江　智宏、杉森　大助（福島大院・理工）
○Tomohiro Utsue, Daisuke Sugimori (Fukushima Univ.)

【目的】油脂含有排水から油脂分を除去するために設置されているグリーストラップでは、多量の油脂が蓄積し、その除去処分や悪臭発生など多くの問題を抱えている。また、油脂分の流出によって後段の生物処理の阻害や、河川等の水質汚染を招いている。これらの問題を解決する微生物排水浄化技術の開発が望まれている。ところが、グリーストラップ内の排水pHは3.5～4.5となることが多く、既存の微生物製剤では十分な効果を発揮できない。そこで本研究では、酸性条件下で良好に油脂を分解する微生物の開発を目指し、目的微生物のスクリーニングおよび分離菌株の油脂分解特性解析を行った。

【方法と結果】油脂含有人工下水培地（pH 4）を用いて土壌等の500試料に対して集積培養を行い、油脂分解活性が高かった*Burkholderia multivorans* R128株を選抜した。R128株は、30～45℃、pH 3.5～9という広い範囲で油脂分解能を示した（図1）。R128株による油脂分解経時変化を調べた結果、培養開始後から徐々に培養液pHが上昇し、それに伴い増殖および油脂分解を開始した（図2）。R128株は、ウレアーゼ活性を有していたことから、ウレアーゼが培地中の尿素をアンモニアに分解することで、培地を中和していると考えられる。培養液中にリパーゼ活性、脂肪酸とグリセロールの生成、菌体内β酸化活性を確認できたことから、本菌株が産生したリパーゼがトリグリセリドを脂肪酸とグリセロールに分解し、資化していると考えられた。また、抽出油脂のHPLC分析の結果、β酸化活性の増加に伴い油脂分解により生じた高級脂肪酸が減少し、低級脂肪酸が増加していることがわかった。

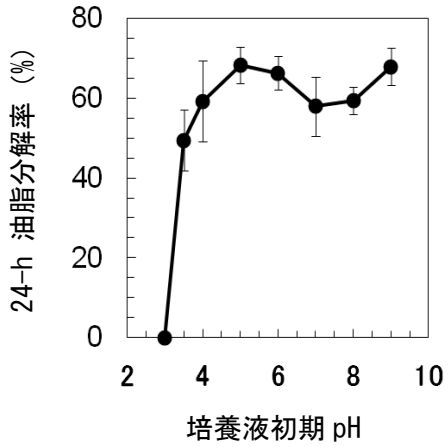


図 1. 培養液 pH の油脂分解率への影響
培養条件：30℃, 3000 ppm 混合油脂
（ラード：サラダ油：牛脂＝1：1：1, w/w/w）

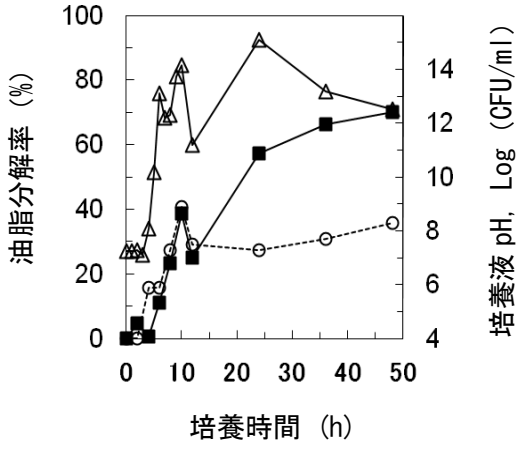


図 2. R128 株による油脂分解の経時変化
■：油脂分解率（%）、○：培養液 pH、△：Log（CFU/ml）
培養条件：30℃, 3000 ppm 混合油脂

oil degradation, wastewater treatment, *Burkholderia multivorans*

講演番号：3C02a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ C校舎02会場

石油汚染下の微生物群集中における海洋性多環芳香族炭化水素(PAHs)分解菌*Cycloclasticus*の培養制御について

Regulation of *Cycloclasticus* in marine microbial communities and application to bioremediation in marine environments for oil spills.

○山下　俊輔、竹石　英伯、荻原 淳[1]、奥田　修二郎[2]、安斎　寛[3]、岩淵 範之、砂入 道夫
(日大・生資科・応生科、[1]日大・生資科・生化科、[2]立命館大・生命・生命情報、[3]日大・短大・生資科)
○Shunsuke Yamashita, Hidetaka Takeishi, Jun Ogihara[1], Shujiro Okuda[2], Hirosi Anzai[3], Noriyuki Iwabuchi, Michio Sunairi
(Dept. Appl. Bio. Sci., Nihon Univ., [1]Dept. Chem. Life Sci., Nihon Univ., [2] Dept. Bioinfo., Ritsumeikan Univ., [3] Dept. Appl. Bioc., Nihon Univ.)

【目的】タンカー事故等による海洋への石油等の流出は、世界規模での主要な海洋汚染の原因の一つであり、中でもPAHsを中心とする画分は長期間残留するため主要な汚染物質であるとされている。*Cycloclasticus*属細菌は、実際の海洋石油汚染下でのPAHsの分解に関与する重要な微生物であり、われわれはこれまでに、*Rhodococcus rhodochrous* S-2株の生産する細胞外多糖(S-2 EPS)を無機塩類と共に投与することで同菌の培養選択的に活性化し、PHAsの分解を促進することで浄化期間を大幅に短縮できることを明らかにしている。また、同菌の(メタ)プロテオゲノミックス解析等により生理学的性質を明らかにし、PAHs汚染環境下での同菌の動態を明らかにした。S-2 EPSはGlcA を側鎖にもつMan-Glc-Galの繰り返し構造を有する含脂肪酸酸性多糖である。本研究では、S-2 EPSの投与により同菌が選択的に活性化される機構を検討するため、GlcAに含まれるカルボキシ基に注目し、GlcAを還元することによる同菌の動態に対する影響を検討した。
【方法】S-2 EPSを物理的に剥離し、遠心にて上清を回収した後、各種酵素処理をした後、凍結乾燥により回収した。これらのサンプルについて、DEAEカラム等で精製し、水酸基を保護しながら$NaBH_4$で還元し、S-2 EPSの還元物を取得した。続いて、S-2 EPSの還元物をTEMPOとNaBrにより酸化し、S-2 EPSの還元物を酸化したサンプルを取得した。各サンプルの還元率、酸化率はHPLCにより確認した。その他の実験については、基本的に定法に基づいて行った。
【結果と考察】炭素源として一定量のフェナントレン(phn)にヘキサデカン(C16)の添加量を変えて加えた培養系を構築し、微生物群集構造の変化を検討した。その結果、S-2 EPS 無添加条件では、C16の添加量に関わらず*Cycloclasticus*の優占化は抑制され、phnの分解は確認できなかったが、これにS-2 EPSを投与すると同菌の優占化は回復し、phnの分解も確認された。一方で、還元したS-2 EPSを投与すると*Cycloclasticus*の優占化は抑制され、還元物を酸化したサンプルを投与した場合には、*Cycloclasticus*の優占化が確認されたことから、S-2 EPS のGlcAのカルボキシ基が同菌の優占化に関与していることが示唆された。

bioremedation, *Cycoclasticus*, oil

講演番号:3C02a14
講演日時、会場:3月24日11:43～ C校舎02会場

低肥沃な石油汚染土壌における高効率バイオレメディエーションシステムの構築

Construction of efficient bioremediation system for low fertile hydrocarbon contaminated soils

○福原 優樹、松宮 芳樹、久保田 謙三、堀井 幸江、松野 敏英、久保 幹（立命館大・生命・生物工）

○Yuki Fukuhara, Yoshiki Matsumiya, Kenzo Kubota, Sachie Horii, Toshihide Matsuno, Motoki Kubo (Dept. Biotechnol., Ritsumeikan univ.)

【目的】石油汚染土壌の浄化方法の1つとして微生物の酵素機能を利用したバイオレメディエーションが挙げられ、これまでに様々な環境から石油系炭化水素分解菌が単離されてきた。当研究室では、長鎖シクロアルカン分解菌を中心とする石油分解菌を単離し、この分解菌を用いたバイオレメディエーションシステムを構築してきた。しかし、低肥沃土壌のバイオレメディエーションにおいては、十分な浄化効率が得られないことが認められた。これは栄養分の少なさによって、添加した微生物が保持されにくいことが可能性として考えられた。本研究では、低肥沃土壌の石油汚染に対応した高効率バイオレメディエーションシステムの構築を目指し、石油汚染土壌に添加する栄養源が与える影響として、総細菌数の変化、添加した石油分解菌数の変化等を評価した。
【方法】低肥沃土壌として、総細菌数が3×10^{7} cells/g-soil以下、全炭素が10,000 mg/kg-soil以下の土壌を用いた。この土壌に自動車用エンジンオイルのベースオイル（新日本石油）を5,000 mg/kg-soilになるように添加することで模擬石油汚染土壌を作製した。模擬汚染土壌に無機塩または有機物質、長鎖シクロアルカン分解菌である*Rhodococcus erythropolis* NDKK6株を1×10^{8} cells/g-soilになるように添加しよく撹拌し、土壌中の総細菌数、土着のアルカン分解菌数、NDKK6株数、および油分濃度を経時的に28日間測定した。土壌中の総細菌数はslow-stirring methodによって得られた環境DNA（eDNA）量から算出した。NDKK6株数は得られたeDNAを鋳型に用いたReal-time PCRにより測定した。プライマーは*Rhodococcus*属細菌のアルカンヒドロキシラーゼを特異的に増幅するalkB-F (5'-CGGTTGTGTCGCAGGAATC-3')/alkB-R (5'-AACGACTGCGCCAGAGTGAT-3')を用いた。
【結果】全炭素量をコントロールするために種々の有機物質を添加したところ、全炭素量20,000 mg/kg-soilになるように鶏糞堆肥を加えた場合で最も高い石油汚染浄化能を示した。従来の無機塩を添加したバイオレメディエーションにおいては、総細菌数および添加したNDKK6株数は21日目に検出限界以下まで減少した。油分濃度は28日間で約3,000 mg/kg-soilまで減少した。一方、鶏糞堆肥を加えた場合では総細菌数は増加し、最大で2×10^{9} cells/g-soil以上に達し、添加したNDKK6株数は28日間1×10^{8} cells/g-soil以上保持されていた。また、油分濃度は1,500 mg/kg-soil以下まで減少した。以上の結果から、バイオレメディエーションは石油分解菌を高いレベルで長期間保持させることが重要であり、20,000 mg/kg-soil程度の鶏糞堆肥は添加した分解菌の保持に寄与することが示唆された。

bioremediation, alkane hydroxylase, cycloalkane

講演番号：3C02a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ C校舎02会場

油汚染紙製ウエス溶解菌群集の取得と解析

Isolation and characterization of a microbial consortia which degrade oil-contaminated paper waste

○稲松遼、城康彰[1]、山田幸太、鈴木大典[2]、片山新太[2]、金原和秀（静岡大・工、[1]愛知電機㈱、[2]名古屋大・エコトピア）

○Ryo Inamatsu, Yasuaki Tachi[1], Kota Yamada, Daisuke Suzuki[2], Arata Katayama[2], Kazuhide Kimbara (Fac. Eng. Shizuoka Univ., [1] Aichi Electric Co., Ltd., [2]EcoTopia. Nagoya Univ.)

【目的】油が付着した紙製ウエスは焼却処理されているが、焼却により有害物質が生じる可能性がある場合、別の方法で処分する必要がある。一つの方法として、紙製ウエスに付着した油の微生物による分解処理が考えられるが、ウエスに付着している状態では微生物処理後のウエスの処分が問題となる。この解消法として、予め紙製ウエスを溶解させ、付着している油を分散させることが考えられる。本研究では、油が付着した紙製ウエス処理の前処理技術として、ウエスを溶解する微生物群集を取得し、油とウエスの同時処理の達成を目的として研究を行った。

【方法】コーンスターチと堆肥で施肥した名古屋大学の圃場の土壌を接種源とし、キムタオルを紙製ウエスとして，これを溶解する微生物群集の集積を行った。集積微生物群集の紙製ウエス溶解検定は、100mlフラスコに50mlの無機液体培地と紙製ウエスを1.25g入れ、微生物群集を接種して30℃・120rpmで振とう培養28日後に紙製ウエスの溶解を目視するとともに、紙製ウエスの乾燥重量変化を測定した。溶解菌の単離を試みるため、無機固体培地に液体培養で得た微生物群集を塗布し、培地上にろ紙(20 mm φ, Grade 1, Whatman)を置き、30℃で培養した。また、増殖液中の細胞数の測定を、蛍光染色剤と蛍光顕微鏡を用いて、直接計数で行った。また、微生物群集構造を解析するとともに、継代による群集構造に変化を確認するため、PCR-DGGE法を行った。液体培養した菌液または、ろ紙上に増殖した微生物をDNAテンプレートとし、Ampdirect® Plus（島津製作所）を用いてPCRを行った。DGGEの濃度勾配は40%~65%で、75V、15h泳動した。得られたゲルは、SYBR Green Iで染色し、蛍光イルミネーターを用いて観察した。

【結果】月1～2回の集積を12か月行うことにより、紙製ウエスを安定して溶解できる微生物群集を獲得した。溶解の過程でろ紙の乾燥重量は約50%減少した。ろ紙を無機固体培地上に置いた培養実験の結果、ろ紙上に微生物の増殖が見られ、ろ紙を分解していることを確認した。ろ紙上に増殖した微生物を再び液体培地中に投入したところ、同じように紙製ウエスを炭素源として増殖し、溶解させることができた。以上のことから、紙製ウエスの溶解能を有する微生物群集を取得できたと考えられた。また溶解活性が弱くなった微生物群集を栄養培地で増殖させ接種したところ活性が再現した。細胞数の直接計数を行った結果、増殖液中の細胞数は1.9×10^{7}cells/mlであった。PCR-DGGEを行った結果、液体培養のサンプルでは、7つのバンドが確認でき、継代による群集構造の変化はあまり認められなかった。固体培養のサンプルでは、5つのバンドが確認でき、液体のものと比べるとバンド数は少なかった。しかし両サンプルに共通するバンドがいくつか存在したため、これらが紙製ウエスを溶解するのに重要な役割を担っていることが示唆された。

Paper waste, Biodegradation, Microbial consortia

講演番号：3C02p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ C校舎02会場

生分解性プラスチック製マルチフィルムの分解を過剰に促進する畑地土壌の微生物活性
Microbial activity of the field soil that causes excessive degradation of biodegradable mulching films

○山元　季実子、渡部　貴志、平舘　俊太郎、小板橋　基夫、山口　紀子、北本　宏子（農環研）
○Kimiko Yamamoto, Takashi Watanabe, Syuntaro Hiradate, Motoo Koitabashi, Noriko Yamaguchi, Hiroko Kitamoto (National Institute for Agro-Environmental Sciences)

【目的】生分解性プラスチック製の農業用マルチフィルム（以下、生プラマルチ）は、通常、土壌中の微生物の働きによって、穏やかに分解されてゆく性質をもつ。この性質によって生プラマルチは、プラスチック廃棄物の低減と除去作業の省力化を可能にする。しかし近年、生プラマルチ資材が各地で導入されるにつれ、通常よりもフィルムの分解が速く進み、作期の早い段階でマルチングの効果が失われる事例が見つかっている。この現象（以下、過分解）を引き起こす要因を明らかにするため、過分解が報告された各地の畑地土壌、および過分解を引き起こさない畑地土壌のサンプルを採集し、土壌の生物学的性質を調べ、過分解現象との関わりを探ることにした。

【方法】（実験1）採取土壌に、生プラマルチの原料として広く用いられているポリブチレンサクシネート（PBS）またはポリブチレンサクシネートアジピン酸（PBSA）のフィルム（4 cm^2）を挟み込んで分解試験を行った。フィルムの分解度は、膜面積あたりの輝度によって0~5の間で数値化し評価した。対照区として、滅菌した各土壌における生プラマルチの分解度も調査した。（実験2）各土壌サンプルの生プラ分解菌割合を調査するため、細菌または真菌の分離と計数に適切な培地を検討した。生プラ分解菌の検出には、選択培地にPBSAエマルジョン寒天培地を重層して、土壌希釈溶液を塗布し25°Cで4日間培養した後、エマルジョン層に形成された透明のハローを計数し、全体のコロニー形成数における出現率を求めた。

【結果】（実験1）非過分解土壌では、挟み込まれたフィルムの分解開始に2週間以上を要したのに対して、過分解土壌に挟み込まれたフィルムは最も速い場合で数日内に分解をはじめた。一方、土壌を滅菌した場合にはフィルムの分解は起こらず、過分解現象が生物学的要因によって引き起こされることが明らかになった。また、同じ地域からの土壌サンプルでも、生プラマルチの分解速度が異なる場合があった。（実験2）PBSAエマルジョンを分解する微生物は、過分解土壌と非過分解土壌の両方から分離された。分離した土壌由来の生プラ分解微生物の大部分が糸状菌であり、サンプルによっては酵母も検出されたが、細菌はほとんど検出されなかった。各土壌サンプルにおけるPBSAエマルジョンを分解する真菌コロニーの出現率は、（実験1）における生プラマルチフィルムの分解度と正の相関を示し、生プラマルチ分解能力の高い土壌には生プラ分解菌が高い密度で存在する可能性を示唆した。

biodegradable polyester, mulching films, plastics

講演番号:3C02p03
講演日時、会場:3月24日14:11～ C校舎02会場

地下環境の酸化還元状態の形成に及ぼす微生物の影響（第６報）

Microbial effects on redox condition in subsurface environment 6

○安達奈穂、齋藤禎一[1]、長岡亨[1]、安藤昭一[2]（千葉大院・融合、[1]電中研、[2]千葉大院・園芸）
○Naho Adachi, Yoshimoto Saito[1] , Toru Nagaoka[1], Akikazu Ando[2] (Chiba Univ. Adv. Integ. Sci, [1]CRIEPI, [2]Chiba Univ, Horti)

【目的】深部地下環境は放射性廃棄物処分や貯蔵施設などへの利用が期待されている。地下環境の酸化還元状態は、施設の劣化や放射性核種の溶解度などに影響を及ぼすため、その長期的な変化を評価する事は重要である。一般的に地下環境は還元状態であるが、坑道採掘などに伴う大気の流入に伴い、酸化状態になると考えられる。その後、施設の閉鎖・埋め戻し後に還元状態に回復すると予想され、その還元状態への回復プロセスにおいて、地下に生息する微生物作用が期待されている。しかし、地下環境の利用では、埋設時に埋戻材として掘削に伴う廃石（ズリ）が利用される事が多く、掘削ズリにパイライト（硫化鉄鉱物）などを含む場合は、その酸化に伴い多量の硫酸塩が生成し、pHが低下する。ｐH低下は微生物活性を阻害し、地下環境の還元状態への回復を阻害する可能性がある。そこで、本研究では、掘削ズリを埋戻材として利用した場合における、地下環境の酸化還元状態形成プロセスに与える微生物影響を評価した。
【方法】酸化した掘削ズリと地下水を用いて，ジャーファーメンター（容量2L）中に掘削ズリ懸濁液を作製した．その後，密閉条件下で撹拌することで埋設に伴う地下環境の変化を模擬し、懸濁液のｐH、酸化還元電位(ORP；vs Ag/AgCl)，溶存酸素濃度(DO)を経時的に計測した。また，コントロールとして，未酸化の岩石を用いた実験も同様に実施した。なお，本実験では，反応の加速化を目的に電子供与体として酢酸ナトリウムを添加した。
【結果】実験開始直後、掘削ズリ懸濁液のORPは、コントロール（+154mV）に比べ高い値（+201mV）を示した。水質分析の結果、掘削ズリ懸濁液中には、硫酸イオン（408mg/L)、酸可溶三価鉄(0.15mM)、硝酸イオン（40mg/L）を含んでいることが明らかとなった（コントロールではいずれも検出限界以下)。そのため、掘削ズリからのこれらイオンの溶出が、両懸濁液の初期ORP値の差の要因であると考えられた。その後、溶存酸素消費に伴うパイライトの酸化溶解反応による硫酸イオンの生成およびpHの低下により、両懸濁液のORPは共に上昇し、溶存酸素が消失した時点で、掘削ズリ懸濁液では+304mVにまで到達した（コントロール；+181mV)。この時点で酢酸ナトリウムを添加し、その後のORPの変化を観察した。その結果、コントロールでは添加後5日目までに-160mVまで低下、7日後は-175mVに低下し、その後は緩やかに低下し続ける傾向にあった。一方、掘削ズリでは5日目には-98mVであったが、7日目には-234mVまで低下しコントロールを下回った。水質分析の結果、掘削ズリでは硝酸イオンの減少や、酸可溶三価鉄の減少に伴う二価鉄の増加が認められた。以上より、掘削ズリのORPの低下は、脱窒および鉄還元反応など微生物による代謝反応により促進された可能性が示された。講演では菌叢解析の結果なども報告する。

oxidation-reduction potential,　microorganism,　subsurface environments

講演番号：3C02p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎02会場

土壌微生物細胞性粘菌の化学生態学

Chemical ecology of the soil micro-organism, the cellular slime mould

○宮崎 早紀、Goto Derek[1]、齊藤 玉緒（上智大・院・理工、[1]北海道大・創成、[2]上智大・理工）
○Saki Miyazaki, Derek Goto[1]、Tamao Saito[2] (Sophia university, [1]Hokkaido university, [2]Sophia university)

【目的】細胞性粘菌は土壌中に普遍的に存在する微生物であり、そのライフサイクルに合わせて周辺生物と化学物質を介したコミュニケーションをとることが知られている。本研究では、細胞性粘菌とコミュニケーションをとる可能性の高い、同じ生息域を持つ生物の中から、線虫を選び細胞性粘菌の存在によってその挙動がどのように変化するのかを観察し、生物間コミュニケーションを調べることを目的とした。
【方法】細胞性粘菌を共培養し、粘菌の存在によって起こる線虫の挙動の変化を観察した。観察結果に基づき、発生させた子実体期の粘菌と線虫を共培養した時の、線虫の挙動の変化および移動速度を定量的に示すバイオアッセイ法の確立を試みた。
【結果】細胞性粘菌の存在によって変化する線虫の行動を写真などで観察することにより、おおよその行動傾向を見ることはできた。しかし、実験結果の定量化ができなかったため、再現性などの評価が難しいところもあった。そこで、本研究では線虫の行動を定性的に示すことができるバイオアッセイ法を確立した。このバイオアッセイ法は1996年に報告された方法を大幅に改良したもので、線虫の動きをその痕跡から調べる方法である。さらに線虫の動きを微速度撮影して粘菌の存在によって運動速度が変化するのかを分析したところ、運動速度には変化がないことが分かった。つまり粘菌の存在は線虫の運動に影響を与えない。しかし、粘菌が存在すると、線虫がこれを避けるような挙動を示すことが定量的に示された。これが細胞性粘菌のどのような影響によるものか今後さらに検討を加えたい。

Cellular slime mould, nematode, chemical ecology

講演番号:3C02p05
講演日時、会場:3月24日14:33～ C校舎02会場

ニトロゲナーゼ遺伝子を用いた土壌中の窒素固定菌の定量方法の構築

Quantification of nitrogen-fixing microorganism in soil based on the nitrogenase gene.

○鈴木 太郎、久保田 謙三、松野 敏英、堀井 幸江、福原 優樹、松宮 芳樹、久保 幹（立命館大・生命・生物工）

○Taro Suzuki, Kenzo Kubota, Toshihide Matsuno, Sachie Horii, Yuki Fukuhara, Yoshiki Matsumiya, Motoki Kubo (Dept. Biotechnology, Ritsumeikan University)

【目的】　窒素は植物の重要な栄養素であり、作物の栽培を行う上ではこれらの成分を安定して供給することが重要である。一般的に、農地の窒素成分は化学肥料や有機肥料を用いて外部から投入されるが、自然界においては根粒菌をはじめとする窒素固定菌によっても窒素は供給できることから、農業における化学肥料施肥の低減のためには、窒素固定菌を利用した窒素の供給の活性化が一つの有用な手段だと考えられる。

窒素固定菌による窒素固定のメカニズムは既に明らかとなっており、大気中の分子状窒素をアンモニアへ変換する反応はニトロゲナーゼによって触媒される。本酵素は*nif*遺伝子群により構成されており、その遺伝子の一つである*nifH*遺伝子の配列には保存性の高い領域がある。この領域を特異的に認識するプライマーを用いることで窒素固定菌を定量できると考えられる。本研究では、窒素固定菌を活用した農地への窒素供給を目指し、*nifH*遺伝子量から窒素固定菌数を定量することを目的とした。

【方法】

(1)供試試料：窒素固定菌は*Azospirillum brasilense* NBRC102289、*Bradyrhizobium japonicum* NBRC14783、*Klebsiella pneumoniae* K103を使用した。土壌は滋賀県内から採取し使用した。

(2)DNAの抽出および土壌中の総菌数の定量方法：DNAはSlow-stirring法(AMB, 71:875-80(2006))により抽出した。また、このDNAを用いて環境DNA解析法(同上)により総菌数を定量した。

(3)*nifH*遺伝子の定量方法：*nifH*遺伝子はリアルタイムPCRを用いて定量した(条件は結果参照)。

【結果】　*nifH*遺伝子を特異的に認識するプライマーはRöschらの方法(AEM, 68:3818-3829(2002))を参考にして、*nifH*遺伝子の部分配列(約450 bp)を増幅するnifH-F(5’-AAAGG YGGWA TCGGY AARTC CACCA C-3’)およびnifH-R(5’- TTGTT SGCSG CRTAC ATSGC CATCA T-3’)とした。PCRの温度条件を検討したところ、Predenature：95℃、10分 → [Denature：95℃、15秒 → Annealing：65℃、30秒 → Extension：72℃、1分] ×30サイクルが最適であった。

3菌株のDNAを鋳型として上記の条件でリアルタイムPCRを行ったところ、菌数とCt値に高い相関性が認められ、*nifH*遺伝子を指標として窒素固定菌数を定量できることが分かった。検量線を作成したところ、検出限界は約1×10^5 cells/mlであった。次に、土壌から抽出したDNAを用いてリアルタイムPCRを行ったところ、供試土壌中の窒素固定菌数は約1×10^5 cells/g-土壌以下～約1×10^8 cells/g-土壌であった。現在、全菌数に占める窒素固定菌の割合や、土壌成分（窒素量や炭素量など）と窒素固定菌数の関係についても解析を進めている。

nitrogen-fixing microorganism, nitrogenase, *nifH* gene

講演番号:3C02p06
講演日時、会場:3月24日14:44～ C校舎02会場

海洋性アルキルフェノール分解菌の分離と菌学的諸性質

Isolation and characterization of marine bacteria capable of utilizing alkylphenol

○藤岡 諒、高田 健吾、安川 直希、岩木 宏明、長谷川 喜衛(関西大・化学生命工)

○Makoto Fujioka, Kengo Takada, Naoki Yasukawa, Hiroaki Iwaki, Yoshie Hasegawa (Kansai University)

【目的】

アルキルフェノール類は、内分泌性かく乱物質の疑いが指摘されており、水質汚濁防止法の要調査項目に登録されている。環境汚染物質の微生物分解に関しては、主に土壌性細菌を用いて行われており、海洋性細菌を用いた研究はあまり報告されていない。そこで、本研究では海洋性細菌によるアルキルフェノール分解に着目し、海水からアルキルフェノール分解菌の分離・同定を行うと共に、アルキルフェノール分解菌の菌学的諸性質について検討を行った。

【方法】

アルキルフェノール分解菌の探索は、4-*n*-ノニルフェノール(4-NP)を唯一の炭素源とする人工海水培地を用いて、集積培養法により行った。海水サンプルは、石垣島および小笠原諸島周辺より採取した。16S rRNA遺伝子の増幅には、プライマー27f,1492rを使用した。塩基配列はサイクルシーケンス法を用いて決定し、BLASTNで近縁細菌の検索を行った。系統樹の作成は、ClustalWによる多重アライメントにより行った。キノンは、凍結乾燥菌体から抽出後、HPLCで解析した。脂肪酸組成はMIDI法を、ゲノムDNAのGC含量はHPLC法を用いて決定した。

【結果】

石垣島および小笠原諸島の海水より、4-NP分解菌を2株(E-41株、G-41株)分離した。16S rRNA遺伝子塩基配列解析の結果、両菌株は*Pseudoteredinibacter isoporae*に近縁な新属・新種の細菌であることが示唆された。以後の研究では、E-41株について菌学的諸性質の検討を行った。

E-41株の菌学的諸性質を調べたところ、運動性のグラム陰性湾曲桿菌であり、極単毛性べん毛をもつことが明らかになった。また、半透明のコロニーを形成し、カタラーゼ・オキシダーゼ活性は陽性であった。嫌気条件下では生育せず、生育にNaClを要求することがわかった。また、20～35℃、pH 7.0～8.0、NaCl濃度1.0～4.0%の範囲内で生育可能であった。呼吸鎖イソプレノイドキノンはQ-8、主要な菌体脂肪酸組成は$C_{15:0}$iso 2OH and/or $C_{16:1}$ ω7c(28.4%)、$C_{18:1}$ ω7c(19.8%)、$C_{16:0}$ (17.0%)、ゲノムDNAのGC含量は48.6mol%であり、これらの菌学的諸性質は*P. isoporae*とは明らかに異なっていることがわかった。これらの結果より、E-41株は新属・新種の細菌であると考えられる。

alkylphenol, marine bacteria, biodegradation

講演番号：3C02p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎02会場

強酸性茶園土壌におけるアンモニア酸化活性とアンモニア酸化微生物の群集構造解析

Ammonia-oxidizing activity and microbial community structure in acid tea orchard soil

○高梨 藍生[1]，岡村 恵子[2]，山田 剛史[1,2]，平石 明[1,2]（[1]豊橋技科大・環境生命工、[2]豊橋技科大・先端農業バイオ）

○Aoi Takanashi[1], Keiko Okamura[2], Takeshi Yamada[1,2], Akira Hiraishi[1,2] ([1]Dept. Environ. Life Sci., Toyohashi Univ. of Technol., [2]Research Center for Agrotechnol. and Biotechnol., Toyohashi Univ. of Technol.)

【目的】窒素循環の一部を担う硝化は、農耕地土壌における施肥窒素の損失、窒素酸化物（NO_X）による大気汚染および硝酸塩による地下水汚染の原因となっている。特に茶園ではアンモニア態窒素の多量施肥が慣行されており、硝化による土壌の強酸性化および硝酸塩による地下水汚染が深刻である。硝化の律速であるアンモニア酸化は、アンモニア酸化アーキア (AOA) とアンモニア酸化バクテリア (AOB) が行っている。これらは様々な土壌に分布しており、近年生態学的知見が蓄積されつつある。しかし、酸性土壌においては未だ不明な点が多い。そこで本研究では、土壌 pH の異なる強酸性茶園土壌において、アンモニア酸化活性の定量、AOA および AOB の群集構造を調べることを目的とした。

【方法】2011 年 8 月と 11 月に、愛知県田原市および豊橋市の各 2 カ所の茶園から、土壌を採取した。また近傍の未耕地、未定植畑地の土壌を、比較対象として採取した。これらの土壌試料の pH と、塩素酸塩阻害法を用いた亜硝酸塩の比色定量によりアンモニア酸化活性の測定を行った。さらに、採取した茶園土壌試料を炭酸カルシウムで中和し、Power Soil DNA Isolation Kit を用いて DNA を抽出し、AOB および AOA の各アンモニアモノオキシダーゼαサブユニット（*amoA*）遺伝子を標的としたプライマーセットを用い、PCR-DGGE 解析を行った。さらに、茶園土壌に共通したバンドパターンを得た土壌試料から、AOB および AOA の *amoA* 遺伝子を標的としたクローンライブラリー解析を行った。

【結果】茶園土壌のpHは2.8から4.8であり、未耕地および未定植畑地の土壌pHより著しく低く、採取地点に応じて違いがあった。また、アンモニア酸化活性は0.03–0.22 μg NO_2^--N wet soil g^{-1} h^{-1}であり、同様に採取地点による違いがあった。土壌pHとアンモニア酸化活性に相関はなかった。PCR-DGGE解析の結果、AOA *amoA*のDGGEプロファイルは、未耕地、未定植畑地においてほぼ一致したが、茶園土壌では大きく3つのパターンに分かれた。一方、AOB *amoA*では、茶園、未耕地、未定植畑地の全てにおいて、ほぼ同様なDGGEプロファイルが得られた。クローンライブラリー解析では、AOA *amoA*クローンの約85%が、赤黄色土壌や茶園土壌由来のクローンおよび好酸性アンモニア酸化アーキアである*Nitrosotalea devanaterra*によって構成される“Acidic soil group”に含まれた。一方、AOB *amoA*クローンの約85%が*Nitrospira*属細菌によって構成されるクラスターに含まれた。これらの結果より、茶園土壌には、酸性環境に適応したAOAおよびAOBが優占する可能性が示された。

Acid tea soil, Ammonia oxidizing bacteria, Ammonia oxidizing archea

講演番号：3C02p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎02会場

タイトル　オイルサンド生産における高アルカリ性プロセス水環境に内在する微生物群の有機化合物分解特性と菌叢解析

Title　Microbial community structure and function of sediments in alkaline settling pond at an in-situ oil sands plant for process water treatment

○川口 秀夫、小林 肇、李 征国、増田 昌敬、佐藤 光三、中川 裕幸[1]
（東大院・工、[1]石油資源開発）
○Hideo Kawaguchi, Zhengguo Li, Hajime Kobayashi, Yoshihiro Masuda, Kozo Sato, Hiroyuki Nakagawa[1] (Toudai, [1]JAPEX)

【目的】オイルサンドの油層内回収法であるsteam assisted gravity drainage (SAGD) 法では、高アルカリ性（>pH9.5）プロセス水のリサイクルを行っているが、長期繰り返し利用による水溶性有機物（DOC）濃度の増加が問題となっている。そこで、SAGDプロセス水の環境調和型浄化法の開発を目的に、高アルカリ性環境より分離した微生物群の機能および構造解析を行った。
【方法】カナダで操業するSAGDプラントにおいて、アルカリ性プロセス水を貯留する沈殿池から表層部と底部の堆積物をそれぞれ採取し、アルカリ性プロセス水に含まれるDOCの分解性試験および菌叢解析の微生物源として使用した。DOC分解性試験では、SAGDプロセス水のろ過滅菌液に堆積物を接種した培地を調製し、好気または嫌気条件で培養を行った。DOC濃度をTOC計により測定するとともに、主成分である有機酸およびフェノール類の濃度をGC-MSにより測定した。菌叢解析では、沈殿池の堆積物から抽出したDNAを鋳型として、バクテリアおよびアーキア特異的なプライマーを用いて、内在微生物の16S rDNAクローンライブラリーをそれぞれ構築した。
【結果】プロセス水の微生物分解性試験の結果、アルカリ性リサイクル水に沈殿池表層部より採取した堆積物を接種した嫌気または好気的培養条件および、底部の堆積物を接種した嫌気的培養条件のいずれにおいても、生物的DOCの分解活性を確認した。GC-MSによる成分分析の結果、フェノール類、非環状有機酸、環状有機酸の除去率は、好気条件でそれぞれ78%、82%、23%であったのに対し、嫌気条件ではそれぞれ39%、42%、61%であり、異なる分解特性を示した。菌叢解析の結果、バクテリアの16S rDNAクローンライブラリーでは、表層部の堆積物において好塩性好アルカリ性菌である*Halomonas* 属の近縁種が優占化していたのに対し、底部の堆積物は他の高アルカリ性菌を含む多様な細菌叢で構成されていた。一方、アーキアの16S rDNAクローンライブラリーでは、これまでにアルカリ環境で報告されているCrenarchaeota門の近縁種が、いずれの堆積物においても優占化していた。このように、高アルカリ性プロセス水沈殿池より採取した微生物群は多様なアルカリ耐性菌で構成されており、好気条件と嫌気条件で異なる分解機構の関与が示唆されると共に、強アルカリ性リサイクル水浄化技術としての有効性が示された。

Water treatment, Oil sands, Microbial community

講演番号：3C02p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎02会場

環境試料からのanammox 菌の馴養と集積フローラの菌叢解析

Analysis of anammox microflora enriched from environmental samples

○石川 秀、多田羅 昌浩、北島 洋二、上野 嘉之（鹿島技研）
○Shu Ishikawa, Masahiro Tatara, Yohji Kitajima, Yoshiyuki Ueno (Kajima Tech. Res. Inst.)

【目的】嫌気性アンモニア酸化、いわゆるanammoxは、自然界の窒素サイクルで重要な役割を担っていることが知られている。このanammoxを利用した窒素除去は、省エネ・低環境負荷型の廃水処理技術として注目されているが、従来の硝化・脱窒プロセスに比べ、その普及例は少ない。この理由として、anammox菌が容易に集積しないことや培養が困難なことが挙げられている。また、現在、5属10種のanammox菌が暫定的に提唱されているが、分類学的あるいは表現型の多様性については知見が不足しており、廃水処理リアクタから検出されるanammox菌の多様性は極めて低い。本研究では、複数の環境試料からanammox菌の集積を試み、菌叢を解析した。
【方法】環境試料として高温嫌気性消化汚泥、中温嫌気性消化汚泥、活性汚泥、下水汚泥、し尿汚泥、菜園土壌、および淡水魚水槽底泥を集積培養のシードに用いた。これらをそれぞれ炭素繊維、およびポリエチレンテレフタレート繊維の不織布を微生物付着担体にした固定床式バイオリアクタに接種し、アンモニアと亜硝酸を含む人工培地を連続的に供給し、35℃で集積を行った。anammox反応が観察されたリアクタでは、水理学的滞留時間を低下させることにより、逐次的に窒素負荷を上昇させた。anammox菌の存否は、既報のanammox、および*Planctomycetes*の16S rRNA遺伝子をターゲットとしたプライマーを用いて PCR で確認、追跡した。
【結果】約9か月にわたる集積培養の結果、下水汚泥、および活性汚泥をシードにしたリアクタでanammoxと推定される窒素濃度低下が観察された。窒素負荷 3g/L/dayで運転中のリアクタの汚泥からDNAを抽出し、PCRを行った結果、いずれもanammox菌の陽性シグナルが得られた。そこで対象を *Planctomycetes* に絞ってクローン解析を行った結果、それぞれ異なったanammox菌が、ほぼ単独で優占化していることが確認された。活性汚泥から集積されたクローンは、*Candidatus* Brocadia anammoxidans と 98% の相同性が認められたが、下水汚泥から集積されたクローンは、これまで報告されているanammox菌との相同性は低いものであった。現在これらの系統解析を行っている。

wastewater treatment、 anammox、 nitrogen removal

講演番号:3C02p10
講演日時、会場:3月24日15:38～ C校舎02会場

ウキクサ-微生物共培養法を利用した非イオン系界面活性剤分解菌の検索

Screening of non-ionic surfactant-degrading microbes by using the duckweed-microbes co-culturing method

○光田大悟、田中靖浩、河本麻奈、遠山忠、森一博（山梨大工・土木環境）
○Daigo Mitsuda, Yasuhiro Tanaka, Mana Koumoto, Tadashi Toyama, Kazuhiro Mori (Univ. Yamanashi)

【目的】

これまでに我々は、無菌化したウキクサ（*Sprirodela polyrrhiza*）の根圏に環境試料中の微生物群集を接種し共培養することで、一般的な微生物分離培養法よりも多様な微生物種を取得でき、さらに、一部の難培養性微生物も比較的容易に分離培養できることを報告してきた（特願2008-38090号）。本研究では、この手法（ウキクサ-微生物共培養法）を用いた有用微生物資源開拓の一環として、環境水試料からの非イオン系界面活性剤分解菌の検索を試みた。

【方法】

本研究では非イオン系界面活性剤として、ポリオキシエチレン(7)ラウリルエーテル(POE(7)LE)を用いた。また、微生物の分離源としては山梨県内の河川、池、用水路から採取した計3種の環境水を用いた。

＜ウキクサ-微生物共培養法によるPOE(7)LE分解菌の検索＞

各環境水試料に無菌ウキクサを投入し、1日間栽培することで、試料中の微生物群集をウキクサの根圏に接種した。その後、このウキクサを25 mg/LのPOE(7)LE を含む無機培地に移し、接種した微生物との共培養（20日間；5日間×4）を行った。共培養後のウキクサ根から平板培養法にて微生物を分離培養し、取得した菌株をPOE(7)LE分解菌のスクリーニングに供した。

＜一般的な集積培養法によるPOE(7)LE分解菌の検索＞

比較実験として、POE(7)LEを単一炭素源として含む無機培地に各環境水試料を添加し、21日間の集積培養を行った（7日間×3；POE(7)LE濃度はバッチごとに異なる（30→50→70 mg/L））。集積培養後の培養液から平板培養法にて微生物を分離し、取得した菌株をPOE(7)LE分解菌のスクリーニングに供した。

【結果】

集積培養法では2種の環境水試料から9株、ウキクサ-微生物共培養法では3種の環境水試料から7株のPOE(7)LE分解菌が分離された。これらの菌株の16S rRNA遺伝子を解析した結果、集積培養法で得られたPOE(7)LE分解菌は*Sphingomonas*属、*Xanthobacter*属、*Acinetobacter*属に近縁であった。一方、ウキクサ-微生物共培養法で得られた分解菌は*Pelomonas*属、*Rhizobium*属、*Caulobacter*属、*Phenylobacterium*属、*Pseudomonas*属に近縁であり、集積培養法で得られた菌株とは系統的に異なっていた。

duckweed, non-ionic surfactant, degradation

講演番号:3C02p11
講演日時、会場:3月24日15:49～ C校舎02会場

湧水から単離した微生物の水に対する酸化還元電位の低下作用

Reduction effect of oxidation-reduction potential against a water by microbes isolated from spring water

○下田　直、及川栄作[1]、及川胤昭[2]（呉高専・専攻科、同・環境都市工[1]、創造的生物工学研[2]）
○Nao Shimoda, Eisaku Oikawa[1], Taneaki Oikawa(Kure NCT[1]., ICB Inc.[2])

【目的】名水と呼ばれる天然水は酸化還元電位(ORP)が低い値を示したり、通常の水では検出されない溶存水素（DH）が検出される場合もある。これらの水の性質と微生物の関係についてはあまり知られていない。そこで、本研究では天然の湧水から微生物を単離し、培養液や蒸留水または水道水に対する還元作用を分析した。ここで、還元作用とは一定の量の蒸留水や水道水あるいは培養液の酸化還元電位を低下させる作用とした。

【方法】天然の湧水としては、周辺地域の住民に飲料水として親しまれている山形蔵王山の中腹の湧水を用いた。湧水をオートクレーブ滅菌した寒天培地に滅菌していない湧水を塗抹して、2週間から1カ月程度、光照射下の30℃で静置培養した。出現したコロニーをさらに、従属栄養菌用のポリペプトンと硫酸アンモニウムを含む寒天培地(702培地)または藍藻類用のCT寒天培地に塗抹し、光照射下の30℃で静置培養した。単一のコロニーをそれぞれ、CT液体培地および702液体培地で培養し、この一部を-85℃で凍結保存した。それぞれの株の分類は16SrRNA遺伝子により行った。酸化還元電位の測定は以下の手順で行った。-85℃で保存した株を702寒天培地に植え、2日～7日程度静置培養した。単一のコロニーを20mL～100mLの702液体培地に植え2日～10日間振とう培養した。この1/100量を702液体培地200mL～1Lに植え継ぎ振とう培養した。その後、培養時間ごとに、培養液の増殖度、pH、DO（溶存酸素）、 ORP（酸化還元電位）の測定を行った。

【結果】29株の微生物を単離し、この内の20株の16SrRNA遺伝子による分類を行った。次に分類できた10株を用いて予備実験で培養液の蒸留水に対する還元作用を調べたところ、根粒菌に近縁である数株に約+200mV→-100mV程度の高い還元作用が検出された。さらに、この内の*Mesorhizobium* sp. GN1株の培養経時ごとのORPを測定したところ、対数増殖期に培養初期の酸化還元電位約+200mVを約-140mVまで還元させる作用が示され、その後の定常期後にも一定の還元作用が示された。また、GN1株の振とう培養速度はやや低い回転数の方が低いORP値が示された。次にこのGN1株の還元作用が本株に特有の性質であるか調べる目的で、近縁の根粒菌*Mesorhizobium loti*NBRC-14779株、および*Bradyrhizobium japonicam* NBRC-14792株の還元作用を測定して比較した。この結果、*B. japonicam*には還元作用はほとんど検出されず、*M. loti*に検出されたがGN1株ほど低いORP低下作用は検出されなかった。これより、GN1株の還元作用は本株に特有の性質である可能性が示された。これらの結果より、酸化還元電位が低い天然湧水の原因の一旦が微生物による作用である可能性が示された。今後は未分析の微生物の還元作用を分析すると伴に、ORPを減少させる作用を持つ酵素の同定や溶存水素と微生物の関係を調べる研究を行う予定である。

Spring water, Oxidation-reduction potential, Rhizobia

講演番号:3C02p12
講演日時、会場:3月24日16:10～ C校舎02会場

海洋性細菌におけるフタル酸分解系遺伝子の解析

Analysis of phthalate-degrading genes from marine bacteria

○西村 彩香、岩木 宏明、長谷川 喜衛(関西大・化学生命工)
○Ayaka Nishimura, Hiroaki Iwaki, Yoshie Hasegawa(Kansai University)

【目的】

土壌細菌におけるフタル酸分解系については活発に研究が行われており、フタル酸中間代謝物の中には機能性高分子のモノマーや医薬品の原料となる有用物質も存在する。しかしながら、海洋性細菌によるフタル酸分解系については十分な知見が得られていない。我々はこれまでに、14株のフタル酸分解海洋性細菌を分離・同定し、すべての菌株がフタル酸を4,5-ジヒドロキシフタル酸(DHP)経路で分解することを明らかにした。本研究では、越前沖の海水サンプルから単離したF-24-1株(*Alteromonas* sp.)と、F-27-3株(*Rhodovulum* sp.)についてフタル酸分解系遺伝子の解析を行った。

【方法】

フタル酸分解系遺伝子の検索の為、4,5- DHP経路に関与するフタル酸分解系遺伝子が解明されている*Pseudomonas putida*(γ-proteobacteria)と*Burkholderia cepacia*(β-proteobacteria)における4,5-DHPデカルボキシラーゼのアミノ酸配列領域をもとにプライマーを設計した。PCR法で周辺領域を増幅し、シークエンスを行い、Blast Xを用いて相同性解析を行った。

【結果】

4,5-DHPデカルボキシラーゼのアミノ酸配列領域をもとに作成したプライマーを用いてPCRを行った結果、F-24-1株とF-27-3株の両株から約250bpのPCR産物が得られた。これらの塩基配列を決定し、相同性解析を行ったところ、これらの断片は4,5-DHPデカルボキシラーゼ遺伝子の一部であることが示唆された。そこで、得られたPCR産物の周辺領域のクローニングを行い、4,5-DHPデカルボキシラーゼ様遺伝子全域およびその周辺の*orf*を取得した。その結果、両株の4,5-DHPデカルボキシラーゼ様遺伝子の推定アミノ酸配列は、*Burkholderia cepacia*のものと、それぞれ59%、60%の相同性があることがわかった。更に、F-24-1株では、取得した領域にフタル酸ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼと相同性を示すORFが、F-27-3株では、それぞれ、フタル酸ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼおよびferredoxin-NADPH reductaseと相同性を示すORFの存在が明らかとなった。現在、これらのORFの機能解析を試みるとともに、更に周辺領域を検索することにより、海洋性細菌のフタル酸分解系遺伝子の全容解明を試みている。

phthalate degradation, marine bacteria, genes

講演番号：3C02p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎02会場

Pentachlorophenol分解菌群の単離と解析

Isolation and characterization of pentachlorophenol-degrading consortia

○堀崎 允文、沼田 充、下村 有美[1]、早津 雅仁[1]、八田 貴[2]、山根 久和、野尻 秀昭
（東大・生物工学セ、[1]農環研、[2]岡山理大・工）
○Tadafumi Horisaki, Mitsuru Numata, Yumi Shimomura[1], Masahito Hayatsu[1], Takashi Hatta[2], Hisakazu Yamane, Hideaki Nojiri
(Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [1]National Institute for Agro-Environmental Sciences, [2]Department of Biomedical Engineering, Okayama University of Science)

【背景と目的】有機塩素化合物は、農薬や医薬品等様々な場面で利用されてきたが難分解性や毒性を示し、場合も多く高い環境残留性を有する化合物も多く報告されている。そのため、微生物を利用して低コストで効率よく分解する手法が注目されており、分解菌や脱塩素化酵素の探索が求められている。本研究では、過去に有機塩素系の農薬として利用されたpentachlorophenol (PCP)の分解菌（群）の探索を行い、環境中でPCPの分解に関わる微生物の解析を行うと共に、芳香環脱塩素化酵素の新たな知見を得ることを目的としている。

【方法と結果】PCPを唯一の炭素源とする培地に、486サンプルの土壌を単離源としてそれぞれ加え、培養液の1/5量を新たな培地に植菌することで集積培養を行った結果、約14日で終濃度100 ppmのPCPをGC-MSにて検出限界以下まで分解するPCP分解菌群を10サンプル取得した。また、PCP分解菌群10サンプルの培養液中における塩化物イオン濃度は、PCPの減少に伴い増加し、理論上全ての塩素を脱塩素化していることが確認された（図1）。

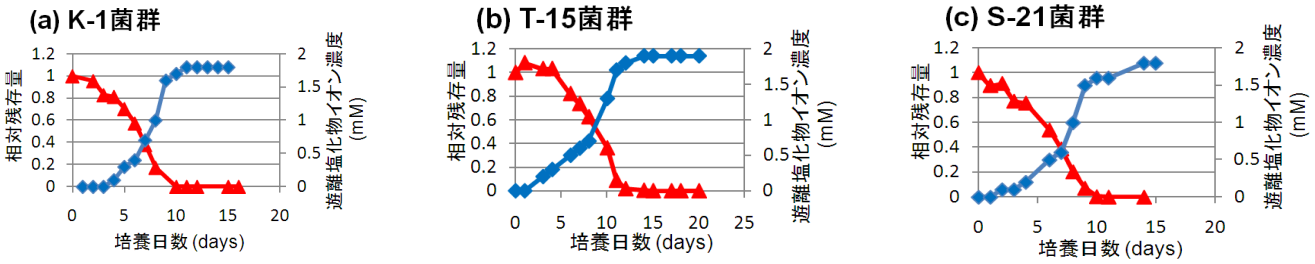


図1. PCP分解プロファイル
:PCP残存量
:遊離塩化物イオン濃度
相対残存量は、培養開始時のPCP量を1として算出した

様々な寒天培地を用いてPCP分解菌の単離を試みた結果、PCP懸濁R2A寒天培地（終濃度1000 ppm）上でクリアゾーンを形成する*Pseudomonas*や*Burkholderia*に属する菌株を14種取得した。しかし、全ての菌株でPCP資化能が認められなかった。現在、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）によりPCP分解過程における菌相変化の解析を行っており、その結果もあわせて報告する。

なお、本研究は農林水産省新農業展開ゲノムプロジェクト（GMB0003）として行われた。

pentachlorophenol, biodegradation, DGGE

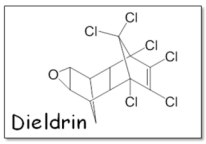
講演番号：3C02p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎02会場

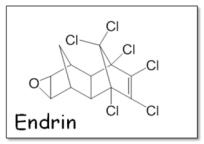
ドリン系農薬分解菌の環境汚染物質分解能の解析と分解関連遺伝子の探索

Characterization of dieldrin-degrading *Geobacillus* sp. DIL-1.

○Yee Lii Mien[1]、堀嵜 允文[1]、土金 恵子[2]、細山 哲[2]、藤田 信之[2]、松本 貴嗣[3]、吉川 博文[3,4]、春田 伸[5]、朝井 計[6]、五十嵐 泰夫[7]、山根 久和[1]、野尻 秀昭[1]([1]東大・生物工学セ、[2]NITE、[3]東農大・ゲノム解析セ、[4]東農大応生科・バイオ、[5]首都大・生命、[6]埼玉大院理工・分子生物、[7]東大・応生工)

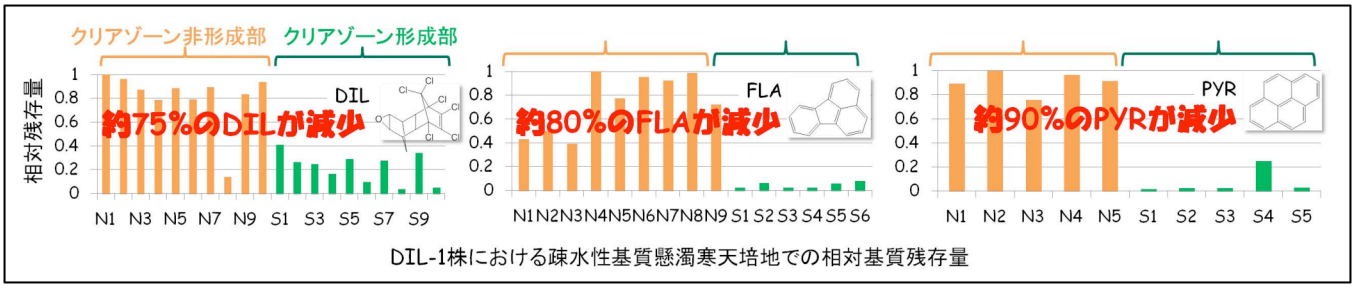
○Lii Mien Yee[1], Tadafumi Horisaki[1], Keiko Tsuchikane[2], Akira Hosoyama[2], Nobuyuki Fujita[2], Takashi Matsumoto[3], Hirofumi Yoshikawa[3], Shin Haruta[4], Kei Asai[5], Yasuo Igarashi[1], Hisakazu Yamane[1], Hideaki Nojiri[1] ([1]The University of Tokyo, [2]NITE, [3]Tokyo University of Agriculture, [4]Tokyo Metropolitan University, [5]Saitama University)





【目的】Dieldrin (DIL)、endrin (END)などのドリン系農薬は環境中での長期残留性や生物への強い毒性から、persistent organic pollutants (POPs)に指定されている。我々は、DIL 汚染化模擬堆肥から、DIL 懸濁 3×LB 寒天培地上で明瞭なクリアゾーンを形成する *Geobacillus* sp. DIL-1 株を単離した。以前に、GC-MS による寒天培地中の残存基質量を測定した結果、クリアゾーン形成領域では約 75%の DIL が減少していることを明らかにしてきた（下図参照）。本年は、DIL-1 株の DIL 以外の疎水性化合物分解能を解析すると共に、DIL 分解に関与する遺伝子の同定を目的とした。

【方法と結果】DIL-1 株の DIL 以外の疎水性化合物分解能の解析において、疎水性化合物 fluoranthene (FLA)、pyrene (PYR)をそれぞれ 3 倍希釈 LB 培地に懸濁させた寒天培地を作製し、DIL-1 株及びその近縁種である *G. thermoglucosidasius* DSM2542 株を生育させた。その結果、両株共にクリアゾーンを形成した。FLA 及び PYR 懸濁寒天培地上のクリアゾーン形成領域をコロニーごとくり抜き、GC-MS にて残存基質量を測定した結果、DIL-1 株においては約 80%の FLA 及び約 90%の PYR が減少しているが、DSM2542 株では基質の減少が見られなかった。



DIL-1株における疎水性基質懸濁寒天培地での相対基質残存量

また、DIL-1株のゲノムを次世代シーケンサーで解析し、得られた配列を類縁細菌のゲノムにマッピングしたところ、*Geobacillus* sp. WCH70株と最も高い相同性を示した。DIL分解に関与する遺伝子を同定するため、DIL-1株をNTGで変異処理し、DIL懸濁1/3 LB寒天培地上でクリアゾーン非形成変異株のスクリーニングを行っており、その結果も合わせて報告する。

なお、本研究は農林水産省新農業展開ゲノムプロジェクト（GMB0003）として行われた。

biodegradation, dieldrin, persistent organic pollutants

講演番号：3C02p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎02会場

Activation of indole degradation by *Burkholderia unamae* strain CK43B under exposure to plant polyphenols

○Dongyeop Kim, Irnayuli R. Sitepu[1], Yasuyuki Hashidoko (Graduate School of Agriculture・Hokkaido Univ., [1]FNRDC・Indonesia)

【Objective】 *N*-Heterocyclic aromatic compounds (NHACs) are known as mutagenic substance that impact on not only environment, but also human health having been long discussed from wider environmental and physiological point of view. However, degradation and metabolism of NHACs including indole under nitrogen-starvation and phenolics-rich conditions have not been extensively investigated in acidic soil-adapting microbiota. As indole and its derivatives are widely distributed throughout natural products as relatively stable NHACs, our research purpose is to fully understand their bacterial degradation process activated by some other polyphenols.

【Methods】 Indole-degrading ability of *B. unamae* CK43B under the presence or absence of polyphenols was investigated as follows: in 200 mL of modified Winogradsky's liquid medium (containing 5 g L^{-1} sucrose and 50 mg L^{-1} yeast extract) supplemented with indole (200 mg L^{-1}) and phenolics to be 1 mM of final concentration, *B. unamae* CK43B was shaking-cultured at 120 rpm, at 28°C in the dark for 48 h. The chemical structure of indole metabolites obtained was elucidated using ^{1}H and ^{13}C NMR and mass spectroscopic analyses. Also indole metabolites in *B. unamae* CK43B culture under exposure to different concentrations of tannic acid and gallic acid were quantitatively analyzed by HPLC. Cell growth at each concentration of gallic acid was also evaluated.

【Results】 *B. unamae* CK43B that was exposed to not only gallic acid but also tannic acid, and (-)-epigallocatechin, all of which possessed pyrogallol moiety, accelerated its indole degradation and ring cleavage. The HPLC analysis showed that indole was degraded to catechol in a dose dependent manner when *B. unamae* CK43B was exposed to gallic acid of 0.5 to 3.0 mM concentration. The presence of gallic acid attributed to production of the extracellular polymeric substances whereas viable cell number was almost the same level with the control. The indole degradation and supplemented gallic acid concentration were positively correlated (r^2 = 0.95) in a range from 0.5 to 2.0 mM, and the viable cell number (r^2 = 0.61) and catechol accumulation (r^2 = 0.82) were also correlated with pyrogallol content. Therefore, the findings in this investigation will support that the plant phenolics give an impact to not only environmental adaption of host plant but also NHACs degradation of some bacteria.

indole degradation, phenolics, catechol

講演番号：3C02p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎02会場

大腸菌を添加した塩素化エチレン汚染地下水の修復過程における微生物動態

Microbial dynamics in the process of restoration of groundwater contaminated by chlorinated ethene with addition of *Escherichia coli*

○石郁 浩二[1]、中村 浩平[1]、高見澤 一裕[1]（[1]岐阜大院・応生）
○Koji Ishimura[1], Kohei Nakamura[1], Kazuhiro Takamizawa[1]（[1]Grad. Sch. Appl. Biol. Gifu Univ）

【目的】バイオレメディエーションによる修復過程において衛生細菌の影響を把握するため、テトラクロロエチレン（PCE）などの揮発性有機塩素化合物で汚染された土壌・地下水を用いて*E. coli*を地下水サンプルに植菌し、PCE分解への影響と分解前後の細菌相の構造変化を解析した。
【方法】20 mlバイアルビンに汚染地下水サンプル10 mlを移してPCE（5 mg/l）、*E. coli*（10^3、10^4、10^5、10^6 cells/ml）を添加した。培養はnatural attenuationと乳酸塩（10000 mg/l）を添加したサンプルに分けて、30℃で25日間静置培養した。塩素化エチレンはGC-FIDを用いて分析した。PCE分解中の*E. coli*生育確認はデソキシコレート培地を用いてコロニー数を測定することで行った。また、乳酸塩添加サンプルではPCE分解前後でHPLCを用いて乳酸塩濃度を測定した。
汚染地下水サンプルのPCE分解前後での細菌相の構造解析は、120 mlバイアルビン6本に汚染地下水サンプルを60 mlずつ移してそれぞれPCE（5 mg/l）、*E. coli*（10^7 cells/ml）を添加した。30℃で14日間静置培養し、その後6本の培養液を混合した。300 mlの培養液を遠心（8000 rpm、15 min、4℃）して得られた土壌0.5 gからDNAを抽出した。そして、DNA抽出物を用いてPCR-DGGE法とクローンライブラリー法で細菌相を解析した。
【結果】PCE分解活性試験についてnatural attenuationでは、10^6 cells/ml植菌したサンプルで*cis*-1,2-ジクロロエチレン（*cis*-DCE）までの分解を確認した。しかし、*E. coli*を植菌していない地下水のみのサンプルやその他の植菌量のサンプルではPCEの分解を確認することができなかった。また、デソキシコレート法による*E. coli*の検出確認はPCE分解後の28日目で検出されなくなった。乳酸塩を添加したサンプルでは、分解活性に*E. coli*の植菌量は関係なく、未植菌のサンプルでも*cis*-DCEまでの分解が確認できた。乳酸塩を添加することで地下水中の微生物のPCE分解活性が高くなっていた。しかし、VCやエチレンまでの分解は確認できなかった。また、デソキシコレート法による*E. coli*はPCE分解後の28日目では検出されたが、58日後には検出されなかった。これらの結果から、汚染地下水中に*E. coli*などの衛生細菌が存在していても分解活性は阻害されないことが示唆された。しかし、分解後に*E. coli*が生存していたため、その他の人体に有害な細菌も生存する可能性が示唆された。乳酸塩濃度はPCE分解前の10000 mg/lから分解後には2000～5000 mg/lまで減少し、地下水中の微生物が資化してPCE分解活性を促進したことを示した。
また、脱塩素化前後で微生物生態系が大きく変化しないか明らかにするため、現在活性試験前のサンプルと*cis*-DCEまで分解したサンプルを用いて菌相解析している。

contaminated groundwater, bioremediation, microbial dynamics

講演番号:3C02p17
講演日時、会場:3月24日17:15～ C校舎02会場

3-クロロフェノール脱塩素活性に対する硫酸還元細菌、硫黄還元細菌およびメタン生成古細菌の影響

Influence of sulfate-reducing bacteria, sulfur-reducing bacteria and methanogenic archaea on 3-chlorophenol-dechlorinating activity

○鈴木　大典、片山　新太（名古屋大・エコトピア）
○Daisuke Suzuki, Arata Katayama (EcoTopia Science Institute, Nagoya Univ.)

【背景と目的】既知の嫌気性脱塩素細菌の大部分は塩素が一つだけ置換した芳香族塩素化合物を脱塩素できず、芳香族塩素化合物に対する嫌気性細菌群を利用した分解技術の開発の課題となっている。3-クロロフェノール(3-CP)をフェノールへ脱塩素する嫌気性脱塩素細菌はまだ分離されていない。本研究グループでは、3-CP脱塩素活性を示す嫌気性培養物(A3MCP)の集積に成功した。A3MCP培養物中には3-CPを利用する未知の嫌気性脱塩素細菌が存在すると考えられた。そこで、どのような種類の微生物が3-CPの脱塩素に関与するかを明らかにすることを目的として、様々な培養条件におけるA3MCP培養物の3-CP脱塩素活性への影響について検討した。
【方法】培地には、水素(1%)と3-MCP (50 μM)を含み、還元剤として硫化ナトリウム (硫化物) (1 mM)を添加して還元した炭酸塩緩衝化嫌気性培地を使用した。この培地で培養したA3MCP培養物を各培養実験での接種源(接種量10%, v/v)として使用した。硫酸塩(5 mM)、亜硫酸塩(2 mM)、チオ硫酸塩(5 mM)またはメタン生成阻害剤2-ブロモエタンスルホン酸塩(BES)(5 mM)を培地へそれぞれ添加した。還元剤をニトリロトリ酢酸チタン(III) (2.5 mM)に替えた培地を、硫化物の酸化で培地中に生成すると予想される硫黄の影響を除去した培地(硫黄無添加培地)として使用した。各培養物は30℃で嫌気的に培養した。
【結果と考察】亜硫酸塩またはチオ硫酸塩の添加は3-CP脱塩素活性を低下させたが、硫酸塩の添加は3-CP脱塩素活性に影響しなかった。これまでの本研究の結果から、硫酸還元細菌 *Desulfomicrobium* sp.や硫黄還元細菌*Sulfurospirillum* sp.と関係づけられる細菌種がA3MCP培養物に存在することが分かっている。多くの硫酸還元細菌は、硫酸塩の他に亜硫酸塩やチオ硫酸塩もまた電子受容体として利用するため、亜硫酸塩やチオ硫酸塩存在下において硫酸還元細菌は3-CP脱塩素細菌に対して競合的に働くことが示唆された。硫黄無添加培地での培養では3-CPの脱塩素が起こった。この培養では3-CPが電子受容体となり得る唯一の基質だった。多くの硫酸還元細菌や硫黄還元細菌は水素を電子供与体として利用するため、これらの細菌種が培地の水素を酸化して3-CPを脱塩素したかもしれなかった。また、メタン生成古細菌がA3MCP培養物に存在することが分かっている。BES添加により3-CP脱塩素活性とメタン生成活性は完全に阻害されたため、メタン生成古細菌の3-CP脱塩素活性に対する影響を判断できなかった。一方、亜硫酸塩存在下では3-CP脱塩素は起きたものの、メタン生成は起こらなかった。この結果から、メタン生成古細菌は3-CP脱塩素活性に影響しないことが示された。以上の結果より、メタン生成古細菌は3-CP脱塩素に関与しないが、硫酸還元細菌と硫黄還元細菌は3-CP脱塩素に関与することが示唆された。

bioremediation, dechlorination, monochlorophenols

講演番号：3C02p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ C校舎02会場

biochar混合による堆肥化過程のCH_4排出抑制効果とCH_4代謝関連酵素遺伝子解析

Evaluation of CH_4 emission rate and gene levels related with CH_4 metabolism during composting of cattle manure and local organic wastes with biochar

○古川 徹[1]、神藤 恵史[2]、青山 正和[1]、Sánchez-Monedero Miguel Á.[2]、園木 和典[1]
([1]弘前大農生、[2]スペイン科学研究高等会議 (CSIC-CEBAS))
○Toru Furukawa[1], Keiji Jindo[2], Masakazu Aoyama[1], Miguel Á. Sánchez-Monedero[2], Tomonori Sonoki[1] ([1]Hirosaki Univ., [2]Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC-CEBAS))

【目的】堆肥化は農業活動によって大量に排出される有機性廃棄物の再資源化手段の一つであるものの、その過程では有機物の微生物分解によりCO_2、CH_4、N_2Oといった温室効果ガス(GHG)が排出される。堆肥製造過程のGHG排出は近年問題となっている地球温暖化を助長してしまうため、その排出を極力抑制した技術の導入が望ましい。本研究は特に堆肥製造過程で排出されるCH_4の抑制に焦点をあてた。堆肥化初期の高温期(thermophilic phase)では易分解性の有機物が酸素を消費しながら急速に分解されるため、堆肥化中の堆積物内部に嫌気スポットが形成され、嫌気的な有機物の分解反応によりCH_4が排出されることが報告されている。そこで堆積物内部へ酸素を供給して好気的分解反応を促すために、多孔質構造を有するbiochar(生物資源を材料とした炭化物)に着目した。biocharはその多孔質中に空気を保持するため、堆肥原料と混合することで堆積物内部への酸素供給が期待できる。本研究では堆肥化過程におけるbiocharの混合がCH_4の排出にどのような効果をもたらすのか評価した。
【方法および結果】牛糞(100.9 kg)、リンゴ絞り粕(76.8 kg)、米糠(12.7 kg)、稲わら(9.7 kg)にbiochar(20.0 kg)を混合して堆肥製造を実施し、堆積物表面からのCH_4発生速度の変化はstatic chamber法により測定した。その結果、biochar混合区ではthermophilic phaseにおいてCH_4の排出が顕著に抑制された。このCH_4排出抑制の要因の一つとして、biocharを混合したことで堆積物の内部が好気的な環境となり、CH_4生成細菌数が減少　し、さらにCH_4酸化細菌数が増加したことが考えられる。そこでCH_4生成に関わるmethyl coenzyme M reductase alpha subunitをコードする*mcrA*遺伝子と、CH_4酸化に関わるparticulate methane monooxygenase alpha subunitをコードする*pmoA*遺伝子についてqPCR解析を実施した。*mcrA*遺伝子の増幅には5’-GGTGGTGTMGGDTTCACMCARTA-3’と5’-CGTTCATBGCGTAGTTVGGRTAGT-3’から成るプライマーセット(Ranjana et al., J. Environ. Qual. 40, 199-205, 2011)、*pmoA*遺伝子の増幅には5’-GGNGACTGGGACTTCTGG-3’と5’-CCGGMGCAACGTCYTTACC-3’からなるプライマーセット(Kenneth et al., FEMS Microbiol. Ecol. 68, 142-151, 2009)を使用した。qPCR解析の結果、biocharを混合した堆肥製造ではthermophilic phaseにおいて*mcrA*数が減少し、*pmoA*数が増加するという傾向が確認された。このことからbiochar混合によるCH_4排出抑制は、CH_4生成細菌数の減少とCH_4酸化細菌数の増加の相互作用によって引き起こされることが示唆された。

本研究は、日本学術振興会二国間交流事業の支援を受けて実施した。

Keyword：biochar, *mcrA*, *pmoA*

講演番号：3C02p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ C校舎02会場

有機性廃棄物を用いた通電型固定床メタン発酵槽の性能評価

Analysis of bioelectrochemical packed-bed methanogenic reactor degrading organic solid wastes

佐々木 大介, ○佐々木 建吾[1], 渡邉 淳, 森田 仁彦, 平野 伸一, 松本 伯夫, 植本 弘明, 大村 直也, 五十嵐 泰夫[1]（電中研、[1]東大院農生科・応生工）

Daisuke Sasaki, Kengo Sasaki[1], Atsushi Watanabe, Masahiko Morita, Shin-ichi Hirano, Norio Matsumoto, Hiroaki Uemoto, Naoya Ohmura, Yasuo Igarashi[1]（CRIEPI, [1]GSALS, The univ. of Tokyo）

【目的】H型の通電型メタン発酵槽（250 mL）を用い、3電極方式によって担体へ通電する運転が高負荷時のメタン発酵の安定性を高めることを報告した[1)、2)]。それらの知見から、発酵容積を4.0 Lにスケールアップした通電型固定床メタン発酵槽を試作し、有機性廃棄物を対象として定電位制御したときの性能を評価した。

【方法】陽イオン交換膜で隔てたアノード槽を槽内に配置した通電型固定床メタン発酵槽とポテンシオスタットを用いてカソード側（発酵槽側）の電極（炭素板+炭素繊維）を-0.8 Vに制御し、発酵温度 55 ℃、10 %ドッグフードスラリー（134 gCODcr/L）を模擬生ごみ廃棄物として連続運転を行った。水理学的滞留時間（HRT）を調節することで徐々に有機物負荷量（OLR）を上げていき、物理化学的性状と微生物群集構造を解析した。

【結果】小型のメタン発酵と比べると、スケールアップした通電型固定床メタン発酵は高い負荷量でも安定していた。最終的にHRT 1.5日、OLR 89.3 gCODcr/L/日での安定運転が可能であり、現在、各負荷量における微生物叢解析を進めている。

本研究はNEDOプロジェクト（P07024）の一環として実施した。

[1)、2)] 2009、2010年度 日本生物工学会大会要旨集 p.114、p.114

bioelectrochemical culture, methanogenic reactor, microbial community structure

講演番号:3B03a01
講演日時、会場:3月24日09:00～ B校舎03会場

稲わらの並行復発酵ための高活性セルラーゼ生産

Microbial Production of High Activity Cellulase for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Rice Straw

○Kahar Prihardi、大久保 成章、多久 和夫、田中 修三（明星大・理工）
○Prihardi Kahar, Shigeaki Ohkubo, Kazuo Taku, Shuzo Tanaka (Meisei Univ.)

【目的】セルロース系バイオマスからエタノールを生産するために、セルロースをエタノール発酵糖に変換する糖化工程が必要である。糖化方法の中では酵素糖化法は最も注目されている。しかし、酵素糖化に用いられるセルラーゼは高価であり、糖化とエタノール発酵の適度温度は異なるため、効率的並行復発酵（SSF）が困難である。効率的並行復発酵が可能にするために、我々は*Trichoderma reesei*から低温（エタノール発酵適度温度30℃）高活性変異型セルラーゼの獲得を試みた。
【方法】野生カビ*Trichoderma reesei* C35を亜硝酸・UVにより変異処理し、PDA培地でコロニーを形成し、CMCを含んだミネラル培地にコピーした後、30℃でセルラーゼ産生を行い、最も高いCMCase活性を示す変異カビを選択した。この操作を3回繰り返し、コロニー選定を行った後、目的である優良変異カビを獲得した。酵素糖化活性を評価するために、Novozyme社Celluclast 1.5L、Novozym 188の混合酵素による糖化、また前処理した稲わらを用いてSSF法によるエタノール発酵も行った。
【結果】我々は*T. reseei* C35からM957変異株を獲得し、M957変異株産生セルラーゼはNovozyme社製品に比べて最も高い比活性（酵素タンパク当の30℃糖化活性）を示すことがわかった。M957変異株産生セルラーゼはβ-グルコシダーゼ（BGL)、エンドグルカンナーゼ（EG)、セロビオハイドロラーゼ（CBH）を多く含んでおり、それぞれの酵素活性はBGL、CBH、BGLの順に高くなっている。また、前処理した稲わらを用いてSSF法によるエタノール発酵を行い、充分な糖化活性があることを確認した。

Cellulase, Cellulose, Enzymatic Degradation

講演番号:3B03a02
講演日時、会場:3月24日09:11～ B校舎03会場

バイオマス工学利用への糸状菌由来セルラーゼ関連遺伝子の整備

A collection of cellulase related genes from *Trichoderma* for biomass engineering

○岸川 昭太郎、山崎 孝仁、村田 武英、大熊 盛也、小幡 裕一、(理研バイオリソースセンター)
○Shotaro Kishikawa, Takahito Yamasaki, Moriya Ohkuma, Takehide Murata, Yuichi Obata (RIKEN BioResource Center)

世界的な環境、エネルギー問題の解決策としてバイオマスの有効利用が必須であり、食料と競合しないセルラーゼ系バイオマスの高度利用が急務である。理研バイオリソースセンター (BRC) ではライフサイエンス研究の発展や喫緊の課題解決に資する有用で即利用可能な遺伝子材料の開発と整備を進めており、セルラーゼ系バイオマスの糖化に必要なセルラーゼ関連遺伝子の収集と提供も行っている。さらに研究者や研究コミュニティにバイオマス工学への有効利用してもらうため、付加情報としてそれら遺伝子を異種発現させ、至適pHや至適温度などの酵素の特性を調べ、公開を進めている。

DOE JGIの*Trichoderma reesei*のゲノムデータより、アノテーションが終了しているセルラーゼおよびヘミセルラーゼ関連遺伝子20種類を選択し、個々のタンパク質コード配列をゲノムDNAよりPCR法で収集した。それら遺伝子のうちエンドグルカナーゼ7種を大腸菌タンパク質発現用プラスミドにサブクローニングし、N末端にT7タグ、C末端にHisタグが付加される組換えタンパク質として大腸菌で発現させた。全細胞溶解液のSDS-PAGEの結果、検討したすべての遺伝子で目的の位置に組換えタンパク質を認めたものの、可溶性画分では認めることができず、発現した組換えタンパク質が封入体を形成して不溶性画分に存在していることが考えられた。また、カルボキシメチルセルロース(CMC)を基質としたハロアッセイでは、7種中EG2、EG3とcel74aの3種でエンドグルカナーゼ活性があり、少量ながらも可溶性画分に酵素活性をもつ組換えタンパク質が存在することが示された。酵素活性を認めたEG2とEG3について組換えタンパク質の精製行い、それらの酵素的特性を検討した。その結果、EG3に比べEG2が高い酵素活性を持つことがわかった。また、両酵素共に55℃に至適温度をもつが、EG2の至適pH はpH 3付近であり、さらに酸性側では急速に酵素活性を失うことが示された。EG3はpHによって酵素活性の劇的な変動は認められないものの、pH 6で最大活性を認めた。今回の報告で使用したセルラーゼ関連遺伝子のプラスミドは、理研バイオリソースセンター 遺伝子材料開発室より提供している。

- 理研バイオリソースセンター (BRC): http://www.brc.riken.go.jp/
- 理研BRC 遺伝子材料開発室: http://dna.brc.riken.jp/ja/

biomass, cellulase, *Trichoderma reesei*

講演番号：3B03a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ B校舎03会場

*Trichoderma reesei*由来糖化酵素のバイオマス分解における役割

Role of saccharifying enzymes from *Trichoderma reesei* in cellulosic biomass degradation

○小松 光子、長野 まどか、吉村 聖也、齋藤 勇司、中澤 光、二階堂 満[1]、戸谷 一英[1]、小笠原 渉、森川 康、岡田 宏文（長岡技科大・生物、[1]一関高専・物質工）

○Mitsuko Komatsu, Madoka Nagano, Seiya Yoshimura, Yuji Saito, Hikaru Nakazawa, Mitsuru Nikaido[1], Kazuhide Totani[1], Wataru Ogasawara, Yasushi Morikawa, Hirofumi Okada (Nagaoka Univ Technol, [1]Ichinoseki Natl College Technol)

【目的】現在、地球環境にやさしい新エネルギーの開発が急務となっており、セルロース系バイオマスは、新エネルギー源のひとつとして有望視されている。糸状菌*Trichoderma reesei*は、強力なセルロース系バイオマス分解菌として知られており、セルロース系基質を用いて培養した時に少なくとも以下の酵素を分泌生産する。セルラーゼとしてはセロビオハイドロラーゼ(CBH)が2種、エンドグルカナーゼ(EG)が8種、β-グルコシダーゼ(BGL)が1種であり、また、ヘミセルラーゼとしてはキシラナーゼ(XYN)が4種、β-キシロシダーゼ(BXL)が1種、α-L-アラビノフラノシダーゼ(ABF) が2種、α-グルクロニダーゼ(GLR)が1種である。*T. reesei*をセルロース系バイオマスの糖化に利用するためには、現状よりも分解効率を高める必要があり、そのためには*T. reesei*の生産するセルラーゼ・ヘミセルラーゼの中から糖化に有用な酵素を選抜することが必要であると考えられる。そこで、本研究では*T. reesei*の各酵素遺伝子破壊株を構築し、それら破壊株培養上清の基質に対する活性および糖化での影響を調べた。

【方法】目的遺伝子の ORF に *Aspergillus nidulans* 由来のアセトアミダーゼ遺伝子 *amdS* を挿入することで破壊用の DNA 断片を構築し、*T. reesei* PC-3-7 株をプロトプラスト-PEG 法により形質転換し、アセトアミド資化能による選択をかけ形質転換候補株を得た。得られた候補株は FTA カードを用いた PCR およびサザンブロットにより破壊株であることを確認した。現在までに構築した破壊株は *Δcbh1*、*Δcbh2*、*Δegl1*、*Δegl2*、*Δegl3*、*Δegl4*、*Δegl5*、*Δegl6*、*Δegl7*、*Δxyn1*、*Δxyn2*、*Δxyn3*、*Δxyn4*、*Δbxl1*、*Δabf2*、*Δglr1* である。これら破壊株を 1% Avicel を炭素源とした培地で生育させ、培養上清を取得し、様々な β-glycan 系基質に対して反応させて分解活性を測定した。また、スギ、ナラ、イナワラ、タケの 4 種のバイオマスに対して 50ºC、24 時間反応させて生じた還元糖量とグルコース量を測定し、野生株との比較を行った。

【結果】破壊株の β-glycan 系基質に対する分解活性は、破壊した各酵素の性質を反映するものであった。しかし、バイオマスに対する分解量は異なり、各酵素の性質からは予想できない結果を示した。*Δcbh1*、*Δcbh2* ではどのバイオマスに対しても分解量の減少が見られたが、バイオマスによって減少の傾向が異なった。*Δegl1*、*Δegl2*、*Δegl4*、*Δegl7*、*Δxyn1*、*Δxyn3* でも影響が見られたが、*Δegl3*、*Δegl5*、*Δegl6*、*Δxyn2* ではどのバイオマスに対しても影響は見られなかった。

Trichoderma reesei, cellulase, hemicellulase

講演番号：3B03a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ B校舎03会場

Trichoderma reesei エンドグルカナーゼIおよびIIのバイオマス分解における役割

Role of Endoglucanase I and II from *Trichoderma reesei* in biomass degradation

○齋藤勇司、吉村聖也、長野まどか、小松光子、中澤　光、二階堂　満[1]、戸谷一英[1]、小笠原　渉、森川　康、岡田宏文（長岡技科大・生物、[1]一関高専・物質工）

○Yuji Saito, Seiya Yoshimura, Madoka Nagano, Mitsuko Komatsu, Hikaru Nakazawa, Mitsuru Nikaido[1], Kazuhide Totani[1], Wataru Ogasawara, Yasushi Morikawa, Hirofumi Okada (Nagaoka Univ Technol, [1]Ichinoseki Natl College Technol)

【背景】セルラーゼ高生産菌として知られている糸状菌*Trichoderma reesei* は、菌体外に少なくとも2種のセロビオハイドロラーゼ(CBH)、8種のエンドグルカナーゼ(EG)および1種のβ-グルコシダーゼ(BGL)を分泌生産することが明らかとなっており、それらを協調的に作用させることよってセルロース系バイオマスを効率的に分解していると考えられているが、個々の酵素の役割や相乗効果の詳細は明らかになっていない。この中でも特にEGは8種［EG I (Cel7B)、EG II (Cel5A)、EG III (Cel12A)、EG IV (Cel61A)、EG V (Cel45A)、EG VI (Cel74A)、EG VII (Cel61B)およびEG VIII(Cel5B)］生産され、GHファミリーや酵素学的性質が異なることから、セルロース系バイオマス分解における個々の役割に興味が持たれる。これまでに我々は、これらEG遺伝子を異種宿主に導入・発現させることにより単一酵素を取得し性質解明を行ってきた。その結果、EG IおよびEG IIが高いCMCase活性を示すことを明らかにした(EG I：100U/mg、EG II：56U/mg)。そこで本研究では*T. reesei* EGのバイオマス分解における役割を明らかにすることを目的とし、CMCase活性が高いEG IおよびEG IIを対象として実験を行った。

【方法・結果】*T. reesei* ゲノム上のEG遺伝子座に、*amdS* 遺伝子(選択マーカー遺伝子)またはGUS遺伝子を挿入することによって、EG遺伝子破壊株を構築し、そのセルロース培養上清を単一EG欠損セルラーゼとして調製した。それら酵素を用いコンバージミル粉砕処理したスギ、ナラ、タケおよびイナワラを基質として、酵素量を変化させBGLを添加または添加しない条件で糖化試験を行った。生成還元糖量をDNS法、生成グルコース量をグルコースキットによって評価した。その結果、BGLを添加しない条件では、どのバイオマスにおいても、EG I欠損セルラーゼはWTセルラーゼと比較してセロビオース量が上昇していた。また、EG II欠損セルラーゼはWTセルラーゼと比較して生成糖が一様に減少していた。BGL添加条件では、スギおよびタケにおける生成糖量はEG II欠損セルラーゼの方がEG I欠損セルラーゼより減少していた。また、ナラにおける生成糖量はEG II欠損セルラーゼのみ減少した。イナワラにおける生成糖量はEG IおよびEG II欠損セルラーゼ共にWTセルラーゼと同様であった。以上の結果からEG IおよびEG IIのバイオマス分解における役割について考察した。

Trichoderma reesei, endoglucanase, biomass

講演番号：3B03a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ B校舎03会場

セルロース系バイオマスの酵素糖化に関する基盤研究（1）*T. reesei* PC-3-7 BGL組換え酵素の構築及び評価

Basic Research on Enzymatic Saccharification of Cellulosic Biomass (1) Construction and evaluation of β-glucosidase enhanced cellulase from *T. reesei* PC-3-7

○河合 哲志、中澤 光[1]、谷 修治[2]、炭谷 順一[2]、川口 剛司[2]、岡田 宏文[1]、小笠原 渉[1]、小林 良則、森川 康（JBA・つくば研、[1]長岡技科大・生物、[2]阪府大院・生命環）

○Tetsushi Kawai, Hikaru Nakazawa[1], Shuji Tani[2] , Junichi Sumitani[2], Takashi Kawaguchi[2], Hirohumi Okada[1], Wataru Ogasawara[1], Yoshinori Kobayashi, Yasushi Morikawa (JBA, [1]Nagaoka Univ, [2]Osaka Pref Univ)

【目的】

我々はセルロース系バイオマスからのエタノール生産に用いる高機能糖化酵素の創製を目指し基盤研究を行っている。バイオマスを糖化するための糖化酵素のコストが課題になっている。近年、海外酵素メーカーはバイオマス糖化のための強力なセルラーゼを開発しているが、我々も昨年度の大会において、*Trichoderma reesei* PC-3-7をベースにしたBGL組換えセルラーゼJN11に関する評価結果を報告した。JN11はその時点での市販セルラーゼに対してより優れた糖化性能を発揮した。本研究は、さらに強化したセルラーゼJN13の構築、及び最新市販セルラーゼとの比較を通じた活性測定・バイオマス糖化能に関する評価結果を報告する。

【方法と結果】

JN11は*xyn3*プロモーターを利用して*Aspergillus aculeatus*のBGL1と*Xyn3*を相同組換えしているためXYN Ⅲが欠損している。そこで、キシラナーゼの影響を検討するために各種キシラナーゼを添加したJN11を用いてヘミセルロースを含むNaOH処理稲わらの糖化反応を行った。キシラナーゼの添加条件はキシラナーゼ活性で揃えた。その結果、XYN IIIを含むGH Family 10のキシラナーゼのみが添加効果を示した。XYNⅢを生かしたままBGL1を発現させる必要があろうと判断し、新たなプロモーターとして*egl 1*を選択した。これは過去に報告したように、種々のバイオマスの糖化においてEG Iの影響が少ないこと、および*egl 1*プロモーターの発現能力が比較的高いことにより。*egl 1*プロモーターを利用してBGL Iを非相同組換え菌株の作るセルラーゼをJN13とした。JN13の活性測定を行ったところ、BGL活性が1.5倍に増強された。しかし、キシラナーゼ活性に変化はなかった。バイオマス糖化能を評価するためNaOH処理稲わらを用いた糖化反応を行った結果、糖化率80%となる酵素量の値がJN11と比べて約40%減少した。さらに培養時にキシランを添加したJN13Hでは約50%と半減した。さらに、JN13Hは最新市販酵素に対して60～65%の減少を示した。ほぼセルロースとリグニンだけの水熱処理ユーカリの糖化を行った結果、JN11とJN13はほぼ同等の糖化能力を示した。最新市販酵素に対しては必要酵素量が25%減少した。つまり、JN13はセルロース分解能力を保持したままヘミセルロース分解能力を高めることに成功した。以上より、JN13は最新市販セルラーゼを上回る強力なセルラーゼであると結論づけた。

Cellulase, Biomass, Saccharification

講演番号:3B03a06
講演日時、会場:3月24日10:05～ B校舎03会場

セルロース系バイオマスの酵素糖化に関する基盤研究（２）酵素糖化反応の網羅的解析

Basic Research on Enzymatic Saccharification of Cellulosic Biomass (2) Comprehensive Analysis of Enzymatic Saccharification

○井田 紀子、小林 良則、森川 康（JBA・つくば研）
○Noriko Ida, Yoshinori Kobayashi, Yasushi Morikawa (JBA)

【目的】

我々はセルロース系バイオマスからのエタノール生産に用いる高機能糖化酵素の創成と高効率糖化方法の開発を目指し基盤研究を行っている。本研究ではセルラーゼの使用量低減を目指したバイオマスの酵素糖化反応の解析を行ったので報告する。

【方法・結果】

セルラーゼを用いた各種前処理バイオマスの糖化反応において、一定基質量に対しセルラーゼの使用量を低下させていくと、糖化率が頭打ちする（反応速度が急激に低下・停止する）現象が確認されており、このことがセルラーゼ使用量低減の大きな障壁になっている。この現象はほとんどのバイオマス前処理物のみならず、セルロースでも観察されたため、基質とセルラーゼのインターラクションに原因があるといえる。特にセルロースに対するセルラーゼ非生産的吸着と、生成物による糖化反応阻害は重要な要因であると考えている。

本発表では、糖化反応中に起こっている現象を網羅的に解析し、セルラーゼ中の特定成分の非生産的吸着による反応停止現象を検証したので報告する。市販酵素Accellerase1500（Genencor社）を用い、様々なバイオマスの前処理物（アルカリ処理稲わらおよび水熱処理エリアンサス）や市販セルロース基質（いずれも基質濃度5%(w/v)）を糖化し、反応中の生成物の分析をイオンクロマトグラフィーにて、全体のタンパク質の上清中と糖化残渣中の存在量をニンヒドリン法にて、個々の成分酵素の上清中と糖化残渣中の分布を二次元電気泳動にて解析した。また、糖化反応液上清の酵素活性を測定した。

ニンヒドリン法によるタンパク質量の測定からは、エリアンサス各種前処理物をAccellerase1500 5 mg/g-biomassにて糖化した際、水熱処理、希硫酸処理、NaOH処理物のいずれにおいても糖化反応開始後2～4時間でタンパク質が基質に最も多く吸着し、その後除々に糖化液上清に遊離してくることが明らかになったが、全体の半分程度は基質に吸着したままであった。二次元電気泳動で確認すると、CBH Iは反応初期に基質に強く吸着し、除々に上清に遊離するが、CBH II、EGは基質に強く吸着たままであった。さらにCBH IIの特定のスポットは消失していった。

基質への強い吸着がみられるCBH I、CBH II、EGが反応停止現象に大きく関与していることが示唆された。

Cellulose, biomass, saccharification

講演番号：3B03a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ B校舎03会場

セルロース系バイオマスの酵素糖化に関する基盤研究（３）エリアンサスの酵素糖化

Basic Research on Enzymatic Saccharification of Cellulosic biomass (3) Saccharification of Erianthus

○小林 良則、井田 紀子、高部 圭司[1]、河合 哲志、森川 康（JBA・つくば研、[1]京大院・農）
○Yoshinori Kobayashi, Noriko Ida, Keiji Takabe[1], Tetsushi Kawai, Yasushi Morikawa (JBA, [1]Kyoto.univ.)

【目的】　我々はセルロース系バイオマスからのエタノール生産に用いる高機能糖化酵素の創製および高効率糖化法の開発を目指し基盤研究を行っている。この研究において草本系バイオマスの代表例としてエリアンサスを選択し、稲わらを比較対象としながら前処理物の特性解析等、種々検討してきたのでその結果について報告する。

【方法・結果】　エリアンサス微粉砕物を種々の条件で水酸化ナトリウム、希硫酸、水熱前処理した場合、原料中のホロセルロース成分が固形物と可溶画分にどのように回収され、それら前処理物の特性（組成、糖化率）はどのようなものであるかを評価した。この結果、水酸化ナトリウム処理の場合、水酸化ナトリウム濃度1%、120℃、15分という条件でホロセルロースのうち85%が固形物側に残り、このときの利用率（回収率×糖化率）は76%であった。一方、希硫酸処理の場合、硫酸濃度1%、170℃、15分という条件ではセルロースの約80%が固形物側に残存するが、ヘミセルロースの約70%（大部分はキシロース）は可溶画分に回収された。このときの固形物側の糖化率は約90%であり、固形物および可溶画分を合わせた利用率は83%となった。また、水熱処理の場合、210℃、15分という条件ではセルロースの約90%が固形物側に残存し、ヘミセルロースは可溶画分に約30%（大部分はオリゴ糖）回収された。この場合の固形物と可溶画分を合わせた利用率は72%となった。このような結果を稲わらの場合と比較すると、エリアンサスは稲わらに比べ、一般的に前処理に対する抵抗性が高く、糖化されやすい前処理物を得るにはより過酷な条件が必要であった。

上記処理で得られた各前処理固形物に代表的市販酵素Accellerase1500、Cellic CTec、Cellic CTec 2を作用させ、基質と酵素の組み合わせによる糖化パターンを比較した。この結果、ヘミセルロース含量の高い水酸化ナトリウム処理物はキシラナーゼ活性の高いCellic CTec 2によってよく糖化された。稲わらの前処理物と比較すると、エリアンサスはすべての場合において稲わらより糖化されにくいことが判明した。この原因を解明する目的で、エリアンサスを葉部、茎外表皮部、茎髄部の3つの部位に分け、微粉砕後に水酸化ナトリウム前処理を行い、Accellerase1500による糖化パターンを比較した。この結果、茎髄部は極めて糖化を受けやすいが、茎外表皮部は極めて糖化を受けにくいことが判明した。また、SEM観察より、茎外表皮部は細胞壁が木化しているが、茎髄部の基本組織柔細胞は木化しておらず、これが糖化の受けやすさの差となって表れたものと考えられる。エリアンサスが稲わらに比べ糖化を受けにくい原因の一つは、この茎表皮部が稲わらよりも高度に木化しており、より糖化を受けにくいことにあると考えられる。

Cellulose, biomass, saccharification

講演番号：3B03a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ B校舎03会場

セルロース系バイオマス糖化における*Trichoderma reesei* EG IV および EG VIIの役割

Role of EG IV and EG VII from *Trichoderma reesei* in biomass degradation

○ 長野 まどか、三井 勇輔、吉村 聖也、齋藤 勇司、小松 光子、中澤 光、岡田 宏文、戸谷 一英[1]、二階堂 満[1]（長岡技大・生物、[1]一関高専・物質工）

○ Madoka Nagano , Yusuke Mitsui , Seiya Yoshimura , Yuji Saito , Mitsuko Komatsu , Hikaru Nakazawa , Hirofumi Okada , Kazuhide Totani [1] , Mitsuru Nikaido [1]（Nagaoka Univ Technol、[1] Ichinoseki Natl College Technol）

［目的］糸状菌 *Trichoderma reesei* は高いセルラーゼ生産能を持つことが知られており、CBH I、II、EG I～VIIIおよびBGL Iを分泌している。それらが相乗的に作用することで効率的にバイオマスを分解していると考えられる。

EG IVおよびVIIはCAZy(Carbohydrate-Active enZYmes)によるGlycoside Hydrolase FamilyでGH61に分類されている。GH61に属する酵素は現在までに真菌のEGでしか確認されていない。2つの酵素の違いは、EG IVはCBMを持つのに対し、EG VIIは持たないことである。これらEGは、これまで、単独ではCMCに対する活性がほとんどないが、バイオマス糖化時において他のセルラーゼの作用を高めることが報告されてきた。最近、Quinlan RJ らにより、GH61に属する*Thermoascus aurantiacus*（TaGH61）が、セルロースを切断する酸化還元酵素であることが示された。そこで本研究は、4種のセルロース系バイオマス(スギ、ナラ、タケおよびイナワラ)を基質として*egl4*および*egl7*遺伝子破壊株培養上清を用いて糖化を行い、セルロース系バイオマス分解におけるEG IVおよびEG VIIの役割を解明することを目的とした。

［方法］各遺伝子破壊株は、*T. reesei* PC-3-7株のそれぞれの遺伝子と*amdS*遺伝子を相同的に組み換えることにより作成した。

T. reesei PC-3-7(WT)と*egl4*および*egl7*遺伝子破壊株の各Avicel培養上清を用いて微粉砕処理バイオマス（スギ、ナラ、タケおよびイナワラ）の糖化を行い、生成糖（還元糖およびグルコース）の定量を行うことで、各遺伝子欠損株培養上清が糖化に与える影響を解析した。これまでに、*T. reesei* 培養上清に含まれる酵素のみではBGL活性が足りず、セロビオースが大量に残存し、グルコースにまで分解されないことが分かっている。我々は、10倍量のセロビアーゼ活性に相当するBGLを添加することで（BGL十分条件）、残存セロビオースが無くなる事を明らかにしている。そこで、BGL十分条件でも同様に糖化を行い生成糖を定量した。

［結果］BGLを添加しない条件では、いずれのバイオマスにおいてもWTと比較して、Δ*egl4*は生成糖量が減少したのに対し、Δ*egl7*では変わらなかった。ナラにおいては、Δ*egl4*とWTの差が顕著で、酵素濃度を上げるにつれ、差が大きくなった。一方、BGL十分条件下では、ナラにおいてのみΔ*egl7*でグルコースの減少が見られたが、他はBGLを添加しない条件と同様であった。さらに、各培養上清にアスコルビン酸および銅イオンを添加することで、糖化に与える影響を解析した。

Trichoderma reesei, cellulase, endoglucanase

講演番号：3B03a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ B校舎03会場

Trichoderma reesei 由来のセルラーゼによるセロビオースの加水分解特性

Hydrolytic characteristics of *Trichoderma reesei* cellulases toward cellobiose.

○宮永 明、齋藤 勇司[1]、岡田 宏文[1]、尾形 慎[2]、服部 武史[2]、碓氷 泰市[2]、戸谷 一英（一関高専・物化工、[1]長岡技科大・生物、[2]静岡大農・応生化）

○Akira Miyanaga, Yuji Saito[1], Hirofumi Okada[1], Takeshi Hattori[2], Makoto Ogata[2], Taichi Usui[2], Kazuhide Totani (Chem. Eng., Ichinoseki Natl. Coll. Tech., [1]BioEng., Nagaoka Univ. Tech.. [2]Appl. Biol. Chem., Agric., Shizuoka Univ.)

【目的】*Trichoderma reesei* が発現するセルラーゼは、cellobiohydrolase (CBH)、endoglucanase (EG)、β-glucosidase (BGL) に大別され、これらが協奏的にセルロースを分解するとされている。なかでも発現量の多い EG I や CBH I、II は中心的な役割を果たすと考えられる。少ない酵素量で効率よくセルロースを分解するために、セルラーゼ組成の最適化、生産性の向上が求められている。演者らは、EG I が 2 糖単位の加水分解や転移・縮合反応を触媒し、セロオリゴ糖を基質とした糖転移反応により糖鎖伸長を引き起こすことを見出してきた。一方、EG I ノックアウト *T. reesei* による杉粉の分解でセロビオースが蓄積されグルコース生成量が低くなる不可解な現象を観察している。これまで、*T. reesei* の CBH や EG I はセロビオースで生成物阻害を受けることが報告されているが「セロビオースを分解する」とは考えられていない。これらを踏まえ、異宿主で発現させた EG I や BGL I 等についてセロオリゴ糖等に対する反応特性を検討した。

【方法】*T. reesei* 由来の EG I CD、EG II CD、EG III、BGL I の各遺伝子を pET22b (+) プラスミドに組み込み、それぞれ大腸菌 Rosetta-gami に形質転換をした（CD：触媒ドメイン）。形質転換体を界面活性剤で処理し、酸沈殿後、上清を濃縮し精製酵素を得た。各酵素は SDS-PAGE により均一であることを確認した。EG I および CBH I は、*Aspergillus oryzae* で発現したものを使用した。精製酵素についてセロビオースに対する加水分解反応、糖転移反応、縮合反応を検討した。また、各種オリゴ糖や配糖体に対する基質特異性を検討した。反応生成物は、グルコース測定キット、ELSD (蒸発光散乱)-HPLC、ABEE 標識後の逆相 HPLC、NMR により分析した。

【結果】「EG I は基質濃度依存的にセロビオースからグルコースを生成する」ことを見出した。これまで、EG I はセロビオースをほとんど分解しないとされてきた（セロトリオースを基質とした場合の 1/1000 程度の触媒効率）。我々の結果では、EG I のセロビオース分解速度は高基質濃度下で BGL I の数分の 1 に達した。これは、EG I ノックアウト菌株で観察された現象をよく説明する。*T. reesei* においてセロビオースの分解を担う BGL の発現量は EG I に比べ低く、高濃度の木質バイオマス分解において EG I がセロビオース分解に一役買っている可能性を示した。

一方で、*T. reesei* はセルラーゼ誘導条件下で菌体外にBGL I、菌体内にBGL II、その他Cel3Cの3種を生産する。我々は大腸菌で発現したBGL I に高濃度のセロビオースを反応させた場合、反応初期数時間以内に「2糖の上昇」や「顕著な3糖合成」が起こることを観察した。BGL I の酵素反応生成物の分析結果を報告する。

cellobiose, endoglucanase, β-gulucosidase

講演番号：3B03a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ B校舎03会場

不均衡変異導入法によるグルコースリプレッションを解除した*Trichoderma reesei* ATCC66589株の作出とその特性

Breeding and characteristics of the glucose repression released strain from *Trichoderma reesei* (ATCC66589) using the disparity mutagenesis.

○宮地　綾子[1]、小山　善幸[2]、岩井 泉樹[3]、矢野　駿太郎[4]、荻原　淳[1]、加藤　順[2]、春見　隆文[1]（[1]日大院生資研究科・生資利用、[2]日大生資科・生命化、[3]日大生資科・農化、[4]ネオ・モルガン研究所）

○Ayako Miyachi [1], Yoshiyuki Koyama [2], Mizuki Iwai [3], Shuntaro Yano [4] , Jun Ogihara [1], Jun Kato[2], Takafumi Kasumi[1]([1]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ.,[2]Dept.Chem.Life.Sci.,Nihon Univ.,[3]Dept.Agric.Biol.Chem.,Nihon Univ.,[4]Neo-Morgan Laboratory Inc.)

【目的】*T. reesei* ATCC66589株はセルラーゼ生産性が非常に高いことが知られているが、本株はセルラーゼ分解物であるグルコースによってセルラーゼ生産が抑制される。そこで本研究では不均衡変異導入法を用いて、グルコース存在下でも酵素生産を抑制されないグルコースリプレッション解除株の取得を試みた。

【方法】*T. reesei* で発現し、校正修復機能を欠損させた変異型DNA polymerase delta (*mut*DPD)及びハイグロマイシン耐性遺伝子、糸状菌自立複製を行うAMA Iを含むプラスミドを構築した。構築したプラスミドを親株に導入し、これを1% 2-デオキシ-グルコース(2-D-Glc) を含むCMC培地に約1x10[4]胞子植菌し、生育してくる株の選抜を行った。得られた株をグルコース存在下の培地で培養した。次に、得られた変異株のcre1の完全長cDNAを取得、親株との塩基配列の比較を行った。

【結果】2-D-Glcを含む培地条件で良好な生育を示す6株の変異株を得た。これらを、C源としてグルコースを含む培地で8日間培養し、その培養上清に含まれるセルラーゼ及びキシラナーゼ活性の測定を行った。その結果、6株全てにおいて、親株で検出されなかったpNP-Lactopyranoside分解活性が認められた。このことから6株はセロビオハイドロラーゼIを発現していることが示唆された。またpNP-Xyloside分解活性は親株に比べて、約2-3倍高い結果が得られた。これらの株は*T. reesei* が胞子を形成する培地においても胞子形成は認められないことからCre1遺伝子の変異の可能性が示された。しかしながら、Cre1のORF領域に変異はなく、現在、Cre1の発現量の解析を行っているところである。

Trichoderma reesei ATCC66589, glucose repression, disparity mutagenesis

講演番号：3B03a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ B校舎03会場

イナワラ分解酵素高生産*Trichoderma reesei*変異株の作出

Breeding of *Trichoderma reesei* that produces high active rice straw degrading enzymes.

○名須川 将史[1]、小山 善幸[2]、岩井 泉樹[1]、矢野 駿太郎[4]、荻原 淳[3]、加藤 順[2]、春見 隆文[3]（[1]日大・生資科・農化、[2]日大生資科・生命化、[3]日大院生資研究科・生資利用、[4]ネオ・モルガン研究所）

○Masashi Nasukawa[1], Yoshiyuki Koyama[2], Mizuki Iwai[1], Syuntaro Yano[4], Jun Ogihara[3], Jun Kato[2], Takafumi Kasumi[3]([1]Dept. Agric. Biol. Chem., Nihon Univ., [2]Dept. Chem. Life. Sci., Nihon Univ., [3]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sci. Biores. Sci., Nihon Univ., [4]Neo-Morgan Laboratory Inc.)

【目的】*T.reesei*ATCC66589株はセルラーゼ生産性が非常に高いことが知られているが、本菌株はC源のタンパク質への変換率が50%程度でタンパク質生産量はほぼ最大に達しているため、これ以上のセルラーゼ高生産を求めることは困難であると考えられる。そこで、本研究では本菌体の生産する酵素組成比をイナワラ糖化に最適化させることで、イナワラの効率的な分解を行うことを目的とした。

【方法】DNAの校正修復機能を欠損させた変異型DNA polymerase delta(*mut*DPD)を含むハイグロマイシン耐性/自律複製型プラスミドを親株に導入した。得られた*mut*DPD導入株を、まずイナワラに多く含まれるキシラン(Sigma oat spelt)を唯一のC源とする最小培地に10^3胞子植菌し、良好な生育を示した4菌株を選抜した。それらの菌株をAvicel(不溶性結晶性セルロース)を唯一のC源とした培地で8日間培養し、その培養上清に含まれる酵素活性の測定を行った。

【結果】親株と比較して4菌株全てにおいて、pNP-xylopyranoside分解活性の数倍程度の上昇が認められ、一方、pNP-lactopyranoside、水溶性セルロース、不溶性結晶性セルロース分解活性の減少が認められた。キシラン分解活性は1株において若干の上昇が認められたが、全体的に大きな変化は認められなかった。これは、親株と比較してβ-xylosidaseやxylanaseの発現量が上昇し、CBHⅠ、EG等の発現量が減少したことを示唆
している。すなわち、キシランをC源に選抜を行ったことで、キシランを優位に分解できるように酵素組成比が変化した変異株が得られたと考えられる。さらに、このなかで活性の上昇度合いの高かった2菌株について、イナワラを唯一のC源にジャーファメンターによるスケールアップ試験を行ったところ、2株ともに親株と比較してほとんどの酵素活性で上昇が確認された。また、1菌株については、pNP-xylopyranosideの分解活性がほとんど確認できなかった。この理由についてはC源の違いに起因するものと考えられるが、詳細は不明であり、現在検討中である。

Trichoderms reesei, Rice straw, cellulase

講演番号:3B03a12
講演日時、会場:3月24日11:21～ B校舎03会場

原料バイオマスに最適なCBMを持つセルラーゼカクテルのスクリーニング系の構築

Construction of screening system for cellulase-cocktail with CBM optimized for biomass utilization

○Bae Jungu[1]、中西 昭仁[1]、黒田 浩一[1]、植田 充美[1]（[1]京大院農・応用生命）
○Jungu Bae[1], Akihito Nakanishi[1], Kouichi Kuroda[1], Mitsuyoshi Ueda[1] ([1]Kyoto Univ., Div. Appl. Life Sci.)

【目的】バイオマスを用いた燃料の生産において、セルロースの分解反応が律速段階となっており、低コストでより効率よく分解できる反応系が求められている。その例の一つとして、これまで細胞表層工学を用いて3種類のセルラーゼ、Endoglucanase (EG)、Cellobiohydrolase (CBH)、β-Glucosidase (BG)を酵母の表層に提示した共役セルラーゼ提示酵母を作成しており、結晶性セルロースを糖化しダイレクトにエタノール発酵できることを実証してきている[1)]。セルラーゼ提示酵母の更なる高効率化を図るために、EGのCBM (carbohydrate-binding module)に注目した。自然界には様々な種類のバイオマスが存在しており、それらに合わせてCBMも最適化されたEGが選抜されていることが考えられる。本研究では、新聞紙を基質にして最適なCBMを持つセルラーゼカクテルのスクリーニング系の構築を試みた。
【方法と結果】EGのCBMが属しているCBM1ファミリーの各CBM間でアミノ酸配列を比較した結果、活性部位などの高度に保存している領域とは逆に、全く保存されていない領域を発見した。その中でも特にフレキシブルである四つのアミノ酸を網羅的に変異させ、変異導入したCBMを持つEGを、CBHやBGとともに共提示したランダム酵母ライブラリーを作成した。これらライブラリーをラッカーゼ処理した新聞紙を唯一の炭素源とする液体培地や寒天培地で生育させ、スクリーニングすることにより、新聞紙の分解に最適なセルラーゼ提示酵母カクテルを選別することに成功した。この手法を用いることで、今後バイオマスごとに最適なセルラーゼカクテルの取得や更なるセルロース分解の高効率化が迅速になることが期待できる[2)]。

1) Fujita Y, *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1207-1212 (2004)
2) Nikanishi *et al.*, submitted

carbohydrate binding module (CBM), yeast cell surface engineering, cellulase cocktail

講演番号:3B03a13
講演日時、会場:3月24日11:32～ B校舎03会場

稲わら酵素糖化前処理に適するハタケチャダイゴケ菌株の遺伝子導入系構築

Transformation by complementation of a uracil auxotroph of the rice straw degrading basidiomycete *Cyathus stercoreus*

○山岸　賢治、木村　俊之、渡辺　隆司[1]（東北農研、[1]京大生存圏）
○Kenji Yamagishi, Toshiyuki Kimura, Takashi Watanabe[1] (NARO, [1]RISH(Kyoto Univ.))

【目的】白色腐朽菌は植物性バイオマス中の高分子リグニンを分解することによりセルロースの酵素糖化性を高めることが以前より知られているが、その程度は菌種と、対象になる植物性バイオマスの組み合わせによって大きく異なる。我々は昨年度大会において、稲わらに対してはどの白色腐朽菌が好適か広汎なスクリーニングを行った結果、ハタケチャダイゴケ（鳥の巣キノコ）が最も有望であり、60℃15分滅菌した稲わらの酵素糖化性を25日間固体培養の間に5.2倍上昇させることを報告した[1)]。また日本各地から分離したハタケチャダイゴケ菌株間においても糖化率上昇作用は大きく異なり、各菌株が稲わら腐朽中に生産するセルラーゼ、キシラナーゼ量と、稲わら糖化率の間に明確な負の相関があることが判明した。このことから、遺伝子破壊、又はRNAi法によってセルラーゼ、キシラナーゼの酵素活性を抑えることが可能になれば稲わら糖化率の更なる引き上げを図れると予想したが、現在のところハタケチャダイゴケの遺伝子導入系は報告されていない。そこでまずハタケチャダイゴケの遺伝子導入系構築を行った。。

【方法及び結果】稲わらのセルラーゼ糖化率を大きく向上させるハタケチャダイゴケATCC36910株をプロトプラスト化し、UV照射後5-FOA含有培地において再生操作を行い、5-FOA耐性株を複数得た。また、ATCC36910株からウラシル合成経路上の酵素である*CsURA5*(オロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ)、*CsURA3*(オロチジン一リン酸デカルボキシラーゼ) をクローニングした。各耐性株のウラシル要求性を調べた結果、*CsURA5*に欠失変異、及びノンセンス変異を持つウラシル要求性変異株Cs#180、Cs#26をそれぞれ得た。形質転換マーカー遺伝子として*CsURA5*を用い，Cs#180由来プロトプラストをPEG法で形質転換したところ，複数のウラシル非要求性クローンが得られた。更に、ハタケチャダイゴケGPD遺伝子(*CsGPD*)をクローニングし、そのプロモーター領域を利用してEGFP発現プラスミドを構築し、更に同じプラスミド上に*CsURA5*を挿入した遺伝子導入プラスミドpGPD-EGFP-CsURA5(pGEU5)を作成した。pGEU5をCs#180に遺伝子導入したところ，複数の再生クローンにおいて強い緑色蛍光が確認された。白色腐朽菌においてはその菌自体のイントロンの有無によって、導入遺伝子の発現効率が変化する事例が報告されている。そこで、EGFPの発現強度に対するイントロンの有無の効果を調べたところ、GPDのcoding sequence全長とin frameでEGFPを発現させた場合にはEGFP発現量は非常に強いが、GPDプロモーターに直接EGFPを結合した場合には蛍光強度は非常に弱いことが明らかとなった。

※本研究の一部は農林水産省委託プロジェクト「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発(モデル化)」によって行われたものである

1) Yamagishi, K., Kimura, T., Watanabe, T. (2011) *Biores. Technol.*, 102, 6937-6943

Cyathus stercoreus, uracil auxotroph, transformation

講演番号：3B03a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ B校舎03会場

*Clostridium cellulovorans*による種々の実バイオマスの分解とその評価

Degradation of various biomass by *Clostridium cellulovorans*

○川出 雄二郎[1]、三宅 英雄[1]、田丸 浩[1]（[1]三重大院・生資）

○Kawade Yujirou, Miyake Hideo, Tamaru Yutaka (Mie Univ., Grad. Sch. Biores.,)

【目的】近年、石油枯渇等の問題により、再生可能エネルギーの1つとして、セルロース系バイオマスの利用が求められている。セルロース系バイオマス利用は前処理、糖化および発酵の工程からなっているが、セルロース系バイオマスはセルロース、ヘミセルロース、リグニン等が複雑に絡み合い強固な構造をとっており、糖化が極めて困難である。その前処理・糖化工程技術として、より低コスト化が可能である微生物処理が注目されており、その手段として高効率なバイオマス分解能を有するセルロソーム生産菌クロストリジウム属が注目されている。*Clostridium cellulovorans*は絶対嫌気性で中温菌のセルロソーム生産菌であり、高いセルロース、ヘミセルロース分解能を持つことが知られており、また特に幅広い基質特異性を有する分泌型フリー酵素であるノンセルロソーム酵素との相乗効果によって非常に高い分解活性を示す。本研究では、*C. cellulovorans*による種々の実バイオマスの分解およびその評価を試みた。

【方法および結果】CO_2を充てんした50 mlの培地に対して、種々の基質（グルコース、セロビオース、リン酸膨潤セルロース（ASC）、カルボキシメチルセルロース（CMC）、稲わら、バガス、ジャーム粕、ジャイアントキンググラス）をそれぞれ0.50 g加えた。さらに、それぞれ炭素源が含まれる培地に0.3%セロビオース培地で培養した*C. cellulovorans*を植菌し、37℃で静置培養を行った。それらの培養液から遠心分離で培養上清を回収し、培養上清中の乳酸濃度を乳酸測定キットおよびマルチプルバイオセンサを用いて測定した。その結果、すべての基質において乳酸が検出された。また、乳酸は嫌気性呼吸の最終生成物であるため、*C. cellulovorans*は本実験で用いた種々のバイオマスを炭素源として利用できることが確認できた。さらに、グルコース、セロビオース、ASCおよびCMCを炭素源とした培養上清中のタンパク質を硫安沈殿法で回収し、稲わら、バガス、ジャーム粕およびジャイアントキンググラスを炭素源とした培養上清中のタンパク質をアセトン沈殿で回収し、SDS-PAGEに供して解析した。その結果、各種の炭素源においてタンパク質バンドのパターンがそれぞれ異なることが判明した。

C. cellulovorans, saccharification, cellulosome

講演番号：3B03a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ B校舎03会場

リグノセルロース系バイオマスからのキシロオリゴ糖生産に向けた*Aspergillus niger*由来キシラナーゼの固定化

Immobilization of *Aspergillus niger* xylanase for production of xylo-oligosaccharide from lignocellulosic biomass

○江頭　翔、熊谷　聡[1]、藤田　修二、林　信行（佐大・農、[1]九大・炭素資源）
○Sho Egashira, Satoshi Kumagai, Shuji Fujita, Nobuyuki Hayashi (Saga Univ., Kyushu Univ.)

【目的】加圧熱水処理と固定化酵素を併用した効率的なキシロオリゴ糖生産を志向し、キシラナーゼの固定化担体の選定と、ヘミセルロースの糖化挙動について検討を行った。

【方法】酵素にはキシロビオースやキシロトリオース産生能に優れたアマノ90(*Aspergillus niger*由来、至適温度50℃、至適pH4.5、天野エンザイム)を用い、DEAE-Sephadex、キチン、ダイヤイオン、アンバーライト、ゼラチンの各担体への酵素固定化率を調べた。この時、DEAE-Sephadexを除く担体では、グルタルアルデヒドを架橋剤とした。固定化率は酵素タンパク質量またはキシラナーゼ活性を基準として算出し、タンパク質はLowry-Folin法によって、キシラナーゼ活性はブナ由来キシランを基質とした活性反応とキシロースを標準糖とするDNS法によって決定した。固定化に適する担体の選定後は、遊離酵素と比較した固定化酵素の至適pH、至適温度、熱安定性等の変化を調べた。また、固定化酵素を繰り返し活性反応に供し、1回目を100%として残存活性の推移を試験した。キシロオリゴ糖(キシロビオースおよびキシロトリオース)産生能に関しては、24時間単位で基質を交換する回分反応を基に評価した。この時、基質にはブナ由来キシラン、あるいは孟宗竹の加圧熱水処理によって分離・可溶化したヘミセルロースを使用し、HPAEC-PADクロマトグラフィーを用いて生成したキシロース、キシロビオース、キシロトリオースを定量した。

【結果】キシラナーゼ・アマノ90の固定化率が最も高い担体は、グルタルアルデヒドで架橋したゼラチンであり、その固定化率はタンパク質基準で96.3%、活性基準で59.8%であった。ゼラチン固定化キシラナーゼは遊離状態と比較して、至適pHは4.5と変化せず、pH3.5～8.0における相対活性にも顕著な変化は観察されなかった。一方、至適温度は遊離状態の50℃から45℃へと変化がみられた。また、至適温度(50℃)より高い温度に長時間さらした場合、固定化酵素の方が残存活性は低下しにくく、熱安定性の向上が認められた。活性反応の繰り返し試験では、固定化酵素は6回目まで100%に近い値を示し、7回目で93%、8回目でも79%の残存活性を示した。24時間単位で基質を交換する回分反応試験においては、1回目(24時間後)のキシロオリゴ糖生産量と比べ、2回目(48時間後)では98%、3回目(72時間後)では90%相当の生産量を示した。現在、この結果を踏まえ、充填層型試作リアクターによる連続反応試験を行っている。

Xylo-oligosaccharide, Enzyme Immobilization, Lignocellulosic biomass

講演番号：3B03p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ B校舎03会場

タケのアルコール発酵(第 4 報)

A Study of Alcohol fermentation using Bamboo（Ⅳ）

〇伊波宏樹[1]、松井勝[2]、坂井美穂[1]([1]文理大院・工・環境情報学、[2]藤沢環境（株））
〇Hiroki Iha[1], Masaru Matsui[2], Miho Sakai[1] ([1]Dept.Env.Eng.App.Info.Sci.NBU,[2]Fujisawa-eco.co.)

【目的】これまで原材料にタケを使い、発酵後の廃液および、発酵残渣を再利用する完全な資源循環を目的の第一段階として、麹菌と酵母を用いたアルコール飲料をスモールスケールで醸造する方法の検討を行ってきた。その結果、アルコール濃度は低いものの、タケからのアルコール醸造が可能であることを見出した。本報では、これまで行ってきた実験の 10 倍スケールでアルコール発酵を行わせ、スモールスケールとの比較を行い、スケールアップした際の問題点について知見を得ることを目的とした。

【方法】スチール缶 6 個にタケ粉末をそれぞれ 300g(計 1.8kg)計り取り、そこにミネラルウォーター 300g(計 1.8kg)ずつ加え、よく攪拌混合後、121℃、15 分間、オートクレーブで加熱処理を行った。加熱処理済みの試料 1.8kg を 30L容発酵槽に移し、米糀(甘酒麹)200g を加え、24 時間ごとに混合撹拌を行い、25℃、7 日間生育させ、これを一次発酵とした。一次発酵後、滅菌水(ミネラルウォーター)18.2kg とドライイースト 9g を加えよく撹拌後、15℃で 5 日間アルコール発酵を行い、これを二次発酵とした。二次発酵中のアルコール濃度ならびにグルコース濃度を 1 日おきに測定した。



Fig.1 30L 容発酵槽の写真

【結果】アルコール濃度は毎回の測定ごとに上昇しており、二次発酵終了 5 日目では 0.02%となっていた。また、グルコース濃度では測定するごとに減少しており、二次発酵終了 5 日目では 0.0%となっていた。

以上の結果から、スケールアップ場合でもグルコースを消費し、アルコール発酵を行なっていることが確認できた。しかし、アルコール濃度が想定より上がらず、二次発酵の際にわずかに異臭がしたことから、二次発酵時に雑菌が繁殖したのではないかと考えられる。

今後は乳酸を添加するなどして雑菌の繁殖を抑える必要があるのではないかと結論づけた。

alcohol fermentation, Bamboo, biomass

講演番号：3B03p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ B校舎03会場

爆砕処理もみ殻からの糖化後発酵および同時糖化発酵によるバイオエタノール生産

Bioethanol production from steam-exploded rice husk

○吉羽 悠介[1]、田端 高光[2]、稗田 一男[3]、清水 範夫[1,2]（[1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・生命科学、[3]フロンティアフーズ（株））

○Yusuke Yoshiba[1], Takamitsu Tabata[2], Kazuo Hieda[3], Norio Shimizu[1,2]（[1]Grad. Sch. of Life Sci., [2]Fac. of Life Sci., Toyo Univ., [3]Frontier Foods Co., Ltd.）

【目的】もみ殻は、最も多く発生しているリグノセルロース系バイオマスの１つである。本研究は高温・高圧の蒸気で短時間蒸煮し、一気に圧力を解放することで粉砕する爆砕処理をもみ殻に行った後、糖化後発酵または同時糖化発酵を行うことで、もみ殻由来の糖質からの効率的なバイオエタノール生産法の確立を目的とする。爆砕処理は、従来の硫酸などによる前処理と比較して環境負荷が少ないと考えられる。

【方法】爆砕もみ殻を温水抽出した上清液をヘミセルロース画分とした。温水抽出後の沈殿物に1% NaOH水溶液を加えて抽出した上清液をリグニン画分とし、その残渣を1N HClで中和したものをセルロース画分とした。セルロース画分および爆砕試料そのものをCellulase “ONOZUKA” R-10（ヤクルト薬品工業）で酵素糖化し、グルコース濃度を測定することで酵素糖化率を検討した。糖化後発酵として、これらの酵素糖化液を*Saccharomyces cerevisiae* NBRC0224や組換え大腸菌*Escherichia coli* ATCC55124を用いてエタノール発酵させた。さらに、*S. cerevisiae* NBRC0224および*Pichia stipitis* NBRC10063による同時糖化発酵を検討した。グルコース濃度をGlucose CⅡ Test Wako (Wako)、還元糖濃度をDNS法、エタノール濃度をガスクロマトグラフによって定量した。

【結果】最も高い酵素糖化率が得られたのは、3.0MPa、236℃、5分間の条件で爆砕処理したもみ殻であった。糖化後発酵として、爆砕もみ殻およびそのセルロース画分の酵素糖化液を組換え大腸菌*E. coli* ATCC55124で発酵させたところ、それぞれ0.029mg-EtOH/mg-rice huskおよび0.317mg-EtOH/mg-cellulose fractionとなった。また、*S. cerevisiae* NBRC0224で爆砕処理もみ殻およびそのセルロース画分の酵素糖化液を発酵させたところ、それぞれ0.199mg-EtOH/mg-rice huskおよび0.230mg-EtOH/mg-cellulose fractionとなった。このことから、*E. coli* ATCC55124ではセルロース画分の酵素糖化液で*S. cerevisiae* NBRC0224よりも高いエタノール収率を得ることができたが、爆砕処理もみ殻の酵素糖化液では生育阻害および発酵阻害が起こることが分かった。また、*S. cerevisiae* NBRC0224はセルロース画分、爆砕処理もみ殻の両方の糖化液を発酵できた。同時糖化発酵では、*S. cerevisiae* NBRC0224を用いた場合で0.136mg-EtOH/mg-rice husk、*S. cerevisiae* NBRC0224と*P. stipitis* NBRC10063を用いた場合で0.130mg-EtOH/mg-rice huskのエタノールが生産された。

以上の結果、爆砕もみ殻を酵素糖化後エタノール発酵する方法が、効率よくエタノールを生産できることが分かった。

Bioethanol, Rice husk, Steam-explosion pretreatment

講演番号：3B03p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ B校舎03会場

エタノール発酵糸状菌を用いた稲わらの糖化発酵同時進行

Consolidated bioprocessing of rice straw by using ethanol-fermenting fungi

○星野 一宏、高野 真希、加藤 康夫[1]、 荻田 信二郎[1]、 野村 泰治[1]（富山大院・理工、[1]富山県立・工）

○ Kazuhiro Hoshino, Maki Takano, Yasuo Kato[1], Shinjiro Ogita[1], Taiji Momura[1] (Univ.Toyama, [1]Toyama Pref.Univ.)

【目的】

稲わらなどのソフトバイオマスからエタノールを低コストで生産させる技術として、糖化酵素の分泌と発酵を一つの微生物で行わせることが可能な糖化発酵同時進行プロセス(CBP)の開発が急務となってきた。この目的のため、接合菌から 5・6 炭糖の発酵が可能で、さらにセルロースおよびヘミセルロース分解酵素を分泌する高性能なエタノール発酵糸状菌を見出した。本糸状菌の発酵能および酵素分泌能の向上を図るためにカーボンイオンビーム変異を行い高キシロース発酵およびセルラーゼ・ヘミセルラーゼ高発現株を取得した。さらに本変異株を用いて各種前処理稲わらから CBP を行った結果を報告する。

【方法・結果】

150 株の *Mucor* 属およびその近縁種から xylose を高収率で発酵可能な *M.javanicus* に属する菌株を見出した。さらに、本菌株の Xylose の発酵能の向上を目指してカーボンイオンビーム(若狭湾エネルギー研究センター, 照射強度 3,000Gy)を行い変異株 *M. javanicus* J 株を得た。本菌株は、好気条件下で Glucose の発酵収率 91%,また、Xylose の発酵収率は 76%であり、さらに、稲わらの加水分解に必要な *endo*-β-glucanase (EBG), cellobiohydrolase (CBH), β-glucosidase(BGL), xylanase などを分泌生産することを確認した。また、これら加水分解酵素の約 50%は細胞膜に結合していることもわかった。しかし、稲わらの CBP を達成させるためには EBG および BGL の生産量(分泌+細胞膜の合計)が少なく、これら酵素の分泌向上が必要であることがわかった。そこで、再度、イオンビーム変異を行い、EBG に関しては 5.4 倍、また、BGL に関しては 13.4 倍高発現する新規変異株(J-7 株)を得た。本菌株の性能を評価するために、比較的分解性の高いアルカリ処理稲わらを用いて直接エタノールを生産させた CBP を行った結果、100 g/l の稲わらから培養 36h 目に 3.2 g/L のエタノールを得ることに成功した。本培養における含有糖質に対するエタノール収率は 12.1%であった。現在、EBG および BGL の特性解明とそれら酵素の高発現培養法を検討し、CBP によるエタノール生産性の向上を検討中である。

Mucor, CBP, bioethanol

講演番号：3B03p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ B校舎03会場

エタノール発酵糸状菌*Mucor javanicus*由来の新規β-glucosidase

Two novel β-glucosidases from ethanol-fermenting fungus *Mucor javanicus*

○ 加藤 康夫、荻田 信二郎、野村 泰治、星野 一宏[1]、高野 真希[1]
（富山県大工・生物工、[1]富山大院・理工）
○ Yasuo KATO, Shinjiro OGITA, Taiji NOMURA, Kazuhiro HOSHINO[1], Maki TAKANO[1]
(Dept. Biotech., Toyama Pref. Univ., [1]Dept. Mat. Sys. Eng. Life, Toyama Univ.)

【目的】

エタノール発酵糸状菌*Mucor javanicus*は、6炭糖のみならず5炭糖も発酵原料として利用可能なことに加え、セルロース分解酵素群も生産する特徴を有しており、稲わらからの糖化発酵同時進行プロセス(CBP)によるエタノール製造への利用が期待されている。本菌におけるセルロース分解酵素群の高生産条件の確立は、プロセスの実用化に向けて必須のものである。演者らはこれまでセルロース分解酵素群の一つであるβ-glucosidase (BGL)の高生産条件について検討し、本菌を酸・アルカリ未処理の稲わらを炭素源兼担体とし、培地の水分量を低めにして静置培養することによりBGLの生産量が大幅に向上することを見出し、報告してきた。今回は、同条件下での培養により菌体外に生産されるBGLの精製と遺伝子単離を試みた。

【方法・結果】

数cmの長さに切断した稲わらに乾重量の5倍量の培地を加えて一週間静置培養した本菌の培養物から、5 mMの2-mercaptoethanolを含む10 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)にて菌体外に生産されたBGLを抽出した。得られた粗酵素液中より、*p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranosideの加水分解活性を指標に、イオン交換、疎水の各種クロマトグラフィー操作にて電気泳動的に単一なBGLを2種類（BGL-1、2）単離した。SDS-PAGEおよびSuperdex-200を用いたゲル濾過クロマトグラフィー分析により、両酵素とも分子質量約92 kDaのモノマー酵素であり、糖鎖染色により糖蛋白質であることが分かった。Peptide-N-Glycanase（PNGase）による脱糖鎖を試みたところ、BGL-1は容易に脱糖鎖したが、BGL-2は還元剤の存在下加熱変性後初めて脱糖鎖された。脱糖鎖後の両酵素の分子質量は、約78 kDaへと減少した。両酵素のN-末端アミノ酸配列を解析したところ、BGL-1はKVNVL、2はKVKVLであり、異なったBGL蛋白質が存在、発現していることが分かった。別途行っている本菌のゲノム配列解析の結果と照らし合わせたところ、BGL-1、2のN-末端アミノ酸配列を含むBGLホモログが各々一個ずつ見出された。その情報をもとにして、BGL高生産条件下で培養した菌体から抽出したRNAを用いて、両酵素のcDNAをクローニングした。一次構造解析の結果、BGL-1、2遺伝子(*bgl1, 2*)がコードする成熟BGLは糖質加水分解酵素ファミリー3に属し、N-末端の上流部分には分泌シグナルと推定される配列が存在していた。N-末端部分からの分子質量は75,920、76,031 Daとなり、脱糖鎖後のSDS-PAGE解析により求められた両酵素のそれと良く一致した。両酵素のアミノ酸配列間の相同性は81%であり、かつ既存のファミリー3のBGLとの相同性は50%程度であるため、BGL-1と2は構造的に新規なBGLと推定される。

ethanol-fermenting, β-glucosidase, fungus

講演番号：3B03p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ B校舎03会場

飼料イネロールベールを用いたエタノール固体発酵およびエタノール回収法の検討

Solid state bioethanol fermentation of forage rice round bale and practical method of recovery for ethanol from the fermented products

○堀田 光生、北本 宏子、川出 哲生[1]、橘 保宏[1]（農環研、[1]生研センター）
○Mitsuo Horita, Hiroko Kitamoto, Tetsuo Kawaide[1], Yasuhiro Tachibana[1] (NIAES, [1]BRAIN)

【目的】我々はイネ植物体等のセルロース系バイオマスから家畜飼料のサイレージ（乳酸発酵産物）を作る過程で、バイオマス分解酵素（セルラーゼ等）と酵母を同時に添加して、エタノール発酵も同時に行う固体発酵法について検討した結果、実験室レベルの試験でイネ植物体中に最大21.3%（vol%、乾物比）のエタノールが蓄積したことを報告した（北本ら、2009、2011）。今回、飼料イネロールベールを用いて圃場レベルでの固体発酵試験を行うとともに、発酵済みのロールベールを用いて実証規模のエタノール回収試験を行い、その回収効率を調べた。

【方法】

1. 飼料イネロールベール固体発酵

生研センター圃場（埼玉県鴻巣市）内で2009、2010年に慣行栽培された飼料イネ（品種リーフスター、たちすがた）を10～11月中に刈り取り、酵母、酵素（セルラーゼ、アミラーゼ）、サイレージ用乳酸菌をそれぞれ加えてロールベール（>300kg/個）を作成し、屋外に置いた状態で固体発酵試験を行った。ロール作成後、1～15ヶ月目まで経時的にサンプリングを行い、ロール中のエタノール濃度を測定した。

2. 発酵済みロールベールからのエタノール回収

上記の様に固体発酵させたロールベールを用いてエタノール回収試験を行った。マイクロ波を用いた減圧真空蒸留装置内に固体発酵産物を投入してエタノールを回収し、その回収量、回収率、および回収に用いたエネルギー量（電気代、重油量）を基にエネルギー収支（回収量/投入量）を算出した。

【結果】

1. 飼料イネロールベール固体発酵

供試した飼料イネ2品種では、ロールベール作成直後より外気温に関係なくエタノール発酵が進み、リーフスターでは発酵3ヶ月目に16.8%（vol%、乾物比）のエタノールが蓄積した。その後も同程度のエタノール濃度が発酵15ヶ月目まで安定に維持されていた。また、エタノール発酵と同時に乳酸発酵も進み、家畜飼料としてのサイレージも安定して作られることを確認した。

2. 発酵済みロールベールからのエタノール回収

発酵済みロールベール2個を用いて、それぞれ条件を変えてエタノール回収試験を行った結果、発酵産物244kg（生重量、総エタノール量15.8L）より13.5Lのエタノールが回収され、回収率は85%であった。エネルギー収支は0.61と算出され、今後、回収条件について更に検討する必要があると考えられた。

bioethanol, solid state fermentation, silage

講演番号：3B03p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ B校舎03会場

タイトル：電子線照射によるリグノセルロースのセルラーゼ糖化向上効果3

Title: Effects of electron beam irradiation to lignocellulose for enhancing saccharification by cellulose 3rd

○太田万理，増田早苗，藤田勝吉[1]，柳沢雄太郎[1]，本澤洋江[1]，鈴木英夫，鈴木鐵也
（光産創大，[1]浜松ホトニクス・中研）
○Mari Ota, Sanae Masuda, Katsuyoshi Fujita[1], Yutaro Yanagisawa[1], Yoshie Honzawa[1], Hideo Suzuki, Tetsuya Suzuki
(GPI, [1] HPK)

【目的】

バイオエタノール等，未利用資源である木質バイオマスの有効利用研究において，木質からのリグニン，ヘミセルロース，セルロースの高効率分離技術は特に重要な開発課題である．発表者らはこれまで，タケ，スギリグノセルロースの糖化に及ぼすパルスレーザー・電子線照射処理の効果について報告している．本研究では，過酸化水素存在下での電子線照射が未利用バイオマスであるタケ・スギリグノセルロースの糖化に及ぼす効果について検討した結果を報告する．

【方法および結果】

粉末化したタケ，スギ試料に過酸化水素添加後，超低エネルギー電子線照射源を用いて電子線の照射処理を行なった．その後トリコデルマ由来のセルラーゼを添加し，37℃，3時間反応させ，遠心分離により上清と残渣に分離した．上清中の還元糖量をPark-Johnson法により測定し，過酸化水素存在下での電子線照射処理によりセルラーゼによる糖化量が高まる結果を得た．

electron beam, lignocellulose, saccharification

講演番号：3B03p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ B校舎03会場

セルロース系バイオエタノール製造廃液の廃水処理特性

Treatment of distillation wastewater discharged from cellulosic bioethanol production process.

○多田羅　昌浩，石川　秀（鹿島技研）
○Masahiro Tatara, Shu Ishikawa (Kajima Tech. Res. Inst.)

【目的】化石燃料の枯渇，地球温暖化防止，循環型社会形成の推進などの観点から，非可食系の未利用バイオマスから液体燃料（バイオ燃料）を製造する技術の開発が，世界各国で行われている。バイオ燃料製造プロセスから排出される廃液の性状は，原料，製造技術によりさまざまであるため，個々のバイオ燃料製造プロセス毎に廃水処理工程を構築する必要がある。また，バイオ燃料製造システム全体の収支を考慮した，コスト，環境面の最適化を行うことが望まれる。本研究では，セルロース系バイオマスを原料とするバイオエタノール製造廃液を嫌気-好気処理法で処理した場合の、処理特性の解析とシステムの最適化解析を行った。

【方法】廃液処理には，嫌気処理，好気処理の二段処理を行った。処理槽は，オーバル状のディッチタイプで，水流により槽内の攪拌を行った。嫌気槽は，ディッチ上部を密閉し，55℃となるように温度制御を行った。嫌気槽，好気槽ともにポリエステル製の不織布を微生物担体として設置した。原料は，稲わらを水熱処理し，糖化，アルコール発酵後，蒸留した廃液を使用した。嫌気槽の種汚泥は，焼酎粕の嫌気処理槽から採取したものを使用した。好気槽の種汚泥は，嫌気処理液の好気処理を行っている活性汚泥から採取したものを使用した。また，嫌気槽の菌叢解析を行い、微生物担体の機能について考察した。

【結果】原料供給量を徐々に増加させることで，T-CODcr負荷を増加させ，各負荷での処理特性の確認を行った。嫌気槽，好気槽ともに，T-CODcr負荷上昇に伴う処理水質の急激な悪化は確認されず，それぞれ水理学的滞留時間（HRT）1日での処理が可能であることが確認された。HRT1日でのT-BOD除去率は，嫌気処理のみで90%以上，後段の好気処理と合わせると98%以上であり，高速処理が行えることが確認できた。T-CODcr除去率は，システム全体で81%程度であり，処理水のT-BOD/T-CODcr比が0.06と非常に低いこと，黒色の色を呈していることから，難生分解性の色素が主体であると考えられる。また，廃液1トン当たり，メタン濃度60%のバイオガスを 20 m^3 程度回収可能であることが確認できた。

菌叢解析の結果，嫌気槽の微生物担体に形成されたバイオフィルムからはメタン生成菌，メタン生成菌と共生して働く低級脂肪酸分解菌などが優先的に検出され、微生物担体が増殖速度が遅いメタン菌とその共生細菌の依代として機能していることが分かった。

なお，本研究は，（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構からの受託研究「バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発」の一環として実施したものである。

Bioethanol, Anaerobic digestion, Methane fermentation

講演番号:3B03p09
講演日時、会場:3月24日15:27～ B校舎03会場

コウライシバの減圧同時糖化発酵によるアルコール生産

Bioethanol from Korean lawn grass under a decompression condition by the simultaneous saccharification and fermentation

○西岡　希帆、中村　浩平 、高見澤　一裕（岐阜大院・応生・資源生命）
○Kiho Nishioka, Kouhei Nakamura ,Kazuhiro Takamizawa (Grad. Sch. Appl. Biol. Gifu Univ.)

【目的】ゴルフ場での植物系廃棄物である刈り芝コウライシバ(KL)を基質とし、アクレモニウムセルラーゼ(ACE、 Meiji Seika ファルマ株式会社提供)を用いた酵素糖化と*Saccharomyces cerevisiae*と*Pichia stipitis*を用いたアルコール発酵を減圧条件下にて行い、糖化発酵条件について検討した。また、同酵素と基質を用いた同時糖化発酵を併せて検討したので報告する。
【方法】100 ml容三角フラスコに、緩衝液、ACE溶液及びKLを添加した。ACE添加後、反応系内を0.1気圧に減圧し、50℃、静置にて72時間酵素糖化を行なった。糖化後、菌体懸濁液を1 ml加え、30 ℃で48時間静置培養を行った。また、KL、ACE、菌体懸濁液を同時に加え反応を開始する同時糖化発酵法によるエタノール生産も行った。それぞれKLの粒径、酵素濃度、反応pH、及び反応温度等、反応条件について検討した。酵素糖化・エタノール発酵ともにHPLCにて単糖およびエタノールを定量した。
【結果】粒径500-710 μmのKLを用いて72時間の酵素糖化を行ったとき、減圧条件下、大気圧条件下ともにそれぞれ最も高いD-グルコース濃度17.5 g/L、17.7 g/Lを回収したが、減圧による酵素糖化率の向上は確認されなかった。このとき、アルコール発酵後のエタノール濃度は、7.83 g/L、8.00 g/Lであり、エタノール収率は、理論収率に対し86.6%、87.1%であった。減圧下においても酵母は生育し、また基質の粒径に関わらず、得られたエタノール収率は大気圧下のものより高くなった。さらにアルコール発酵開始から12時間までのエタノール生産速度を求めたところ、粒径が小さくなるに従い、減圧下のとき、大気圧下に対し生産速度の上昇が確認された。また、糖化率が最も高かった粒径500-710 μmのKLを用いて30℃にて120時間酵素反応を行ったところ、ACE至適温度である50℃にて72時間酵素反応を行った際と同等のD-グルコース濃度が得られた。同時糖化発酵を行った際には、40℃、pH4.5のとき5.97 g/Lのエタノールが生成された。これらの結果をもとに、現在、減圧同時糖化発酵によるさらに効率的なエタノール生産について検討を行っており、その結果を併せて報告する。

bioethanol, Korean lawn, decompression

講演番号：3B03p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ B校舎03会場

一般廃棄物中の紙を原料としたエタノール生産における雑菌汚染対策

Removal of microbial contamination during ethanol production from separated paper from municipal waste

○増成 伸介、林 俊介、吉良 典子、冨山 茂男、木田 建次[1)]（日立造船（株）、[1)] 熊大院・自然科学）

○Shinsuke Masunari、Shunsuke Hayashi、Noriko Kira、Shigeo Tomiyama、Kenji Kida[1)]（Hitachizosen Co.、[1)]Grad. Sci. Tech.,Kumamoto Univ.）

【目的】国内の焼却施設で処理されている一般廃棄物の組成は、紙・布類48.9%、厨芥類15.2%、草木類8.9%、プラ類20.1%、その他6.8%であり（環境省HP H22年度データ）、紙類は湿重量で1,500万t/年以上と推定され、有望な廃棄物系バイオマス資源といえる。これを原料としてバイオエタノールを製造する際、多くの雑菌が存在するため、雑菌抑制対策を講じる必要がある。

【方法および結果】一般廃棄物から紙類を選別・回収し、加水後離解（パルピング）処理を行い、得られた紙繊維を紙ごみパルプ原料とした。低温熱処理による原料の前処理と、同時糖化発酵（SSF）を抗生剤存在下で行うことにより雑菌の抑制を試みた。紙ごみパルプを60－90℃で熱処理後SSFを行ったところ、オートクレーブ処理を施した原料と同等程度のエタノールが得られた。次に、オートクレーブ処理を施した原料に雑菌を多く含むパルピング水を加え、熱処理および抗生剤存在下でSSF反応を行ったところ、60℃ 4時間以上の熱処理と抗生剤の併用により、滅菌処理時と同等のエタノール生成を確認した。本手法により、エタノール製造時においてオートクレーブ処理と同等の雑菌抑制効果が可能な、低エネルギー低環境負荷処理を提案することができた。

waste paper, SSF, contamination

講演番号：3B03p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ B校舎03会場

バイオエタノール製造の新規発酵阻害物質、グリコールアルデヒドの *ADH1* による毒性解除

Detoxification of glycolaldehyde, a novel bioethanol fermentation inhibitor, by conversion to ethylene glycol with yeast Adh1

Lahiru N. Jayakody[1], Kenta Horie[1], Nobuyuki Hayashi[1], Hiroshi Kitagaki[1*] (Faculty fllof Agriculture, Saga University)

[Purpose] Pre-treatment of cellulose with hot compressed water yields glycolaldehyde through retro-aldol condensation. We have for the first time reported that glycolaldehyde notably inhibits yeast growth and ethanol fermentation[1]. Our recent study elucidated that its inhibitory effect is greater than those of HMF and furfural.

[Result] Based on the hypothesis that reduction of glycolaldehyde to less toxic ethylene glycol will attenuate the toxicity of glycolaldehyde, *we* engineered an *ADH1*-overexpressing strain. The strain showed remarkable resistance to glycolaldehyde and subsequently improved ethanol production in a glycolaldehyde-containing medium. Furthermore, The conversion of glycolaldehyde to ethylene glycol was 30 ± 1.9 % in the medium fermented with the control strain but increased to 77 ± 3.6 % in the medium fermented with the *ADH1*-overexpressing strain. This was also the case in hot compressed water-treated cellulose. The results indicate that reducing glycolaldehyde to ethylene glycol is a promising strategy to attenuate the toxicity of hot compressed water-treated cellulose.

Ref; Jayakody et al., Biotechnol. Let., 33, 285-289 (2011)

Key words: *glycolaldehyde, ethylene glycol, ADH1*

講演番号：3B03p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ B校舎03会場

高効率バイオエタノール製造技術開発－SSCF のための糖化発酵技術－

Development of efficient production technology for bioethanol -Saccharification and fermentation technology for SSCF-

○保谷典子、菊田弘和、富永詠美子、大西徹（トヨタ自動車）
○Noriko Yasutani, Hirokazu Kikuta,Emiko Tominaga, Toru Onishi (TOYOTA MOTOR CORP.)

【目的】第２世代のバイオエタノールであるセルロースエタノール製造プロセスの開発を行っており、発酵菌体の育種、バイオマスの前処理条件の開発、同時糖化並行複発酵(SSCF)プロセスの開発を行っている。本研究では、製造プロセスの低コスト化を図るため、糖化プロセスと発酵プロセスを合体した同時糖化並行複発酵(SSCF)プロセス開発について検討している。

同時糖化並行複発酵（Simultaneous Saccharification and co-fermentation；SSCF）は、糖化酵素による酵素反応と発酵菌によるエタノール発酵を同時に進行させ、更に、1 ポットでヘミセルロース由来のキシロースとセルロース由来のグルコースを同時に発酵するプロセスである。

酵素糖化プロセスでは、セルロース、ヘミセルロースと糖化酵素が反応し糖が生成される。発酵プロセスでは、生成した糖から発酵菌によりエタノールが生成される。糖化酵素の至適温度域は 40℃～50℃であり、発酵菌の至適温度域は 25℃～35℃である。酵素糖化・発酵の両プロセスを同時に行う SSCF では、糖化酵素、発酵菌ともに生き物であるため、反応可能温度領域以外では、失活したり、死滅する。異なる環境条件を最適とする酵素糖化と発酵の反応を同時並行で行うため、2 つのプロセスに最適な条件を見出すことが重要である。

本研究では、バイオマス原料としてネピアグラスを使用し、発酵菌として酵母を使用してエタノール製造技術開発を行っている。発酵阻害に対する回避方法、SSCFプロセスにおけるエタノール収率向上について検討し、さらに90L発酵装置でのスケールアップを検討した。

【方法と結果】第2世代のバイオエタノールでは、非食物系の木質・草本系バイオマスを前処理し、糖化酵素、発酵菌を用いた糖化発酵によりエタノールを生成する。バイオマスから高効率にエタノールを生産するためには、キシロースのエタノール変換が重要であるが、酵母野生株はキシロースをエタノールへ変換することが出来ない。そこで、酵母にキシロース資化遺伝子を導入し、グルコースとキシロースを同時にエタノールへ変換可能な遺伝子組換え酵母を育種した。変換プロセスは、糖化酵素による酵素反応と発酵菌によるエタノール発酵を同時に進行させ、グルコースとキシロースを同時に発酵する同時糖化並行複発酵（SSCF）を選択した。

ネピアグラスに対して酸を添加した蒸煮処理を行い、バイオマス濃度15%のSSCFプロセスにより遺伝子組換え酵母がグルコースとキシロースを同時にエタノールへ変換し、理論収率に対し87%以上のエタノール生産に成功した。さらに小スケール（1L、5L培養装置）での発酵結果を90L発酵装置で達成し、理論収率に対し88%以上のエタノール生産に成功したので報告する。

Bioethanol, SSCF, scale-up

講演番号：3B03p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ B校舎03会場

キシロース並行発酵細菌によるマイクロ波照射前処理木材のＳＳＣＦ（同時糖化並行発酵）

SSCF(Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation) of woody biomass pretreated with microwave irradiation by xylose co-fermenting ethanologenic bacteria.

○簗瀬英司、小島基、高橋貴之、黒崎陽介[1]、大代正和[1]、桂陽子[2]、瀬郷久幸[2]、松下響[3]、保谷典子[3]、渡辺隆司[1]（鳥取大院・工、[1]京大・生存研、[2]日本化学機械製造、[3]トヨタ自動車）

○Hideshi Yanase, Motoki Kojima, Yoshiyuki Takahashi, Yosuke Kurosaki, Masakazu Daidai, Yoko Katsura, Hisayuki Sego, Hibiki Matsushita, Noriko Yasutani, Takashi Watanabe[1] (Grad. Sch. Eng., Tottori Univ., [1]RISH, Kyoto Univ., [2]Japan Chem. Eng. & Machinery Co. Ltd., [3]TOYOTA MOTOR CORP.)

【目的】本研究は、木質バイオマスからセルロース系バイオエタノールを高効率で生産するために、マイクロ波誘電加熱による前処理工程に酵素糖化と並行発酵が同時進行する同時糖化並行発酵（ＳＳＣＦ）工程を組み合わせた高効率バイオエタノール製造技術の開発をＮＥＤＯ事業として行っている。これまでに、3次元電界シミュレーターと実測データに基づきエネルギー損失を最小限に抑えた連続式マイクロ波照射装置を開発してユーカリ材を処理することにより前処理固形物（パルプ）を調製し、得られた前処理物の構造特性に合うセルラーゼ複合酵素系と組換え発酵細菌を組み合わせた糖化発酵（ＳＳＦ）プロセスを開発した。さらに、愛知県のトヨタ自動車内にエタノール製造プラントを建設して、本ＳＳＦプロセスのスケールアップに成功している。今回は、ユーカリ材をマイクロ波照射処理して得られるヘミセルロース可溶化液とパルプの懸濁液をワンポットでエタノールに変換するＳＳＣＦ条件を検討した。

【方法と結果】ユーカリ材のマイクロ波照射前処理により調製される可溶化液にはヘミセルロース成分に由来するキシロースが含まれていることから、大腸菌由来キシロース代謝酵素系遺伝子（*xylA*、*xylB*、*tal*、*tktA*）を導入したキシロース並行発酵細菌を育種した。育種したキシロース並行発酵細菌はキシロースを唯一の炭素源として生育して発酵し、理論収率に近いエタノールを生産するとともに、ユーカリ材前処理可溶化液からエタノールを理論収率の87%で生産した。また、前処理固形分であるパルプを原料としたＳＳＦにおいても、セルラーゼ複合酵素系とキシロース並行発酵細菌の組み合わせにより理論収率に近いエタノールを生産した。そこで、ユーカリ材マイクロ波照射前処理懸濁液にセルラーゼ複合酵素系とキシロース並行発酵細菌体を添加して培養を行ったところ、キシロース並行発酵とパルプ糖化発酵が同時に進行してエタノールを生産した。

bioethanol, SSCF, xylose

講演番号：3B03p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ B校舎03会場

高濃度キシロースを資化・発酵可能な*Saccharomyces cerevisiae*実用酵母の創製

Isolation and characterization of a mutant of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* leading to fermenting high concentration of xylose

○冨高正貴、田口久貴、木田建次[1]、赤松　隆（崇城大・生物生命、[1]熊大院・理）
○Masataka Tomitaka, Hisataka Taguchi, Kenji Kida[1], Takashi Akamatsu (Sojo Univ., [1]Kumamoto Univ.)

【目的】グルコースとキシロースを資化し、エタノール連続発酵できる*Saccharomyces cerevisiae*実用酵母創製には、少なくともキシロースをキシルロース-5-リン酸に代謝できるキシロース代謝遺伝子（XM: *Xyl1 Xyl2 XKS1*）とともに、キシロース代謝向上突然変異が必要である。この代謝向上変異を特定するために、実用酵母NAM34-4Cの同質系統株SCA3およびキシロース代謝遺伝子XMを組み換えたSCB7株を構築している。また、キシロース代謝向上突然変異のひとつのクラスHEXを有する突然変異体SCB13~SCB16株を分離している。本研究は、もうひとつのクラスのキシロース代謝向上突然変異SXMを分離し、遺伝解析するとともに発酵試験評価を目的とした。
【方法】次世代シーケンサーでのSXM変異遺伝子特定を容易にするために、突然変異体分離には自然突然変異法を用いた。キシロースを50g/L濃度で含むYPXU培地を発酵試験に用いた。ガスクロマトグラフィーでエタノール濃度を測定し、液体クロマトグラフィーでキシロース濃度を測定した。子嚢胞子の遺伝解析は、ミクロマニプレーターで4胞子解剖を行った4分子で行った。
【結果】50g/L濃度のキシロース炭素源培地(pH5.5)にHEX株 (SCB14株)を植菌し、35°Cで振とう培養した。静止期まで増殖させ新しい培地に植え継いだ。この培養を繰り返し行い、世代時間が改善されたSXM突然変異体を分離した。親株は55時間で細胞濃度が100倍増えるが、変異体は24時間以内で同程度の細胞濃度となり、良好な細胞増殖を示した。50g/L濃度のキシロースを含むYPX培地(pH4.0)で、初発濁度ABS660nm=1.0、温度35°Cで発酵試験を行った。親株は10時間から50時間まで一定速度(0.88g/L)でキシロースを消費するのに対し、突然変異体は10時間から70時間まで一定速度(0.33g/L)でキシロースを消費し、むしろ親株よりも消費速度の減少がみられた。また、全糖当たりのエタノール収率も親株が約60%であるのに対し、突然変異体は10%弱と減少した。キシロース代謝で増殖すると考えられる突然変異体取得方法に変え、新たに2個のSXM変異体を分離した(SCB26~27)。発酵試験評価を行ったところ、親株より増殖の立ち上がりが早く、また、エタノール収率の改善を認めた。

recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, bioethanol, xylose

講演番号：3B03p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ B校舎03会場

耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* を用いたセルロース系バイオマスからの効率的エタノール生産にむけた基盤研究

Kluyveromyces marxianus-based platform for direct ethanol fermentation and recovery from cellulosic materials under air-ventilated conditions

○松崎　千秋、中川　明、小柳　喬、田中　孝二郎、南　博道、玉置　尚徳[1]、片山　高嶺、山本　憲二、熊谷　英彦（石川県大・資源研、[1]鹿児島大農・生資化）

○Chiaki Matsuzaki, Akira Nakagawa, Takashi Koyanagi, Kojiro Tanaka, Hiromichi Minami, Hisanori Tamaki[1], Takane Katayama, Kenji Yamamoto, and Hidehiko Kumagai (Ishikawa Pref. Univ., [1]Kagoshima Univ.)

セルロースからの効率的エタノール生産の実現には、糖化酵素セルラーゼの量および活性の向上が経済的に克服すべき課題となっている。近年その障害を打破すべく、エタノール産生微生物に異種セルラーゼを発現させた形質転換体を用いて、セルロースの糖化からエタノール生産までを１段階で行う consolidated bioprocessing (CBP) system が提唱され、その実現が期待されている。しかし酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした CBP system では、その適応温度の低さと発現セルラーゼ活性の低さより、多量の静止菌体と嫌気条件下での長時間の発酵培養を要することが問題となっており実用化には至っていない。そこで我々は耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* を宿主とし、常温または高温の簡便な通気条件下で、生育菌体を用い、セルロース系炭素源から1段階でエタノール生産・回収可能なシステム開発を試みた。

まずジャーファーメンターを用い、200 g グルコースを含む発酵槽にOD_{600}=0.01量の*K. marxianus* 野生株を植菌し、撹拌(400 rpm)、通気(3 L/min)し、菌を生育させると同時にその排気中エタノールを冷却槽でトラップすることによって、30℃の発酵においては49.4 g、45℃の発酵においては66.4ｇ のエタノールの回収に成功した。また冷却槽から取り出したサンプルをHPLCにて分析したところエタノールのピークのみが検出されたことから、エタノールはほぼ精製された状態で回収されていることが分かった。それに対し、このエタノール生産・回収システムを用い *S. cerevisiae* 野生株のエタノール生産力を測定したところ、30℃の発酵においては42.4ｇ のエタノールを回収できたが、45℃で菌は生育せず、エタノールも生成しなかった。このことから *K. marxianus* は、高温でエタノール産生能力があるのみならず、この簡便な、エタノール生産・回収システムにおいても、強壮な生育力、発酵力を備えていることが示された。

さらに、CBP宿主としての可能性評価のため、耐熱性糸状菌由来β-グルコシダーゼ遺伝子導入 *K. marxianus* 形質転換株を作製し、セロビオースからの直接発酵、エタノール回収を試みたところ、野生株ではエタノール生成が見られないのに対し、形質転換株では100 g のセロビオースから30℃、45℃の発酵においてそれぞれ22.1 g、27.5 g のエタノール回収に成功した。以上の結果、我々の *K. marxianus* を宿主としたエタノール生産・回収システムは、菌体の生育、糖化・発酵・エタノール回収を同時に行う事ができ、新たなる CBP system の礎となりうることが示された。

Kluyveromyces marxianus, bioethanol, air ventilation

講演番号：3B03p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ B校舎03会場

タイトル 内在性遺伝子を活用したキシロース資化性サッカロマイセス酵母の開発

Title Development of xylose-fermenting Saccharomyces yeast utilizing its endogenous genes

○福田 明、小西 仁、牟田口 梢栄、上村 毅（JX日鉱日石エネルギー（株）中央技術研）

○Akira Fukuda, Jin Konishi, Kozue Mutaguchi, Takeshi Uemura (JX Nippon Oil & Energy Corp. Central Technical Research Laboratory)

【目的】リグノセルロース系バイオマスからの効率的なエタノール生産には、バイオマスの主成分の１つであるキシロース利用が必須である。酵母*Saccharomyces cerevisiae* はエタノール生産に広く用いられるが、キシロースを資化出来ない。我々は*S. cerevisiae* 協会7号株を宿主として、自身が持つキシロース資化に関わる酵素（XR,XDH）の遺伝子導入によるキシロースからのエタノール生産能の付与を一昨年度報告した。XRやXDHを利用した*S. cerevisiae*でのキシロースからのエタノール生産では、キシロース取り込み速度の遅さ、補酵素のアンバランス、キシリトールの蓄積、キシルロース以降の代謝フラックスの弱さなどの解消がエタノール収率向上に必要と言われている。そこで、本発表ではキシルロース以降の代謝フラックス増強を目的に、キシルロースリン酸化酵素（XK）をコードする遺伝子である*XKS1*を増強しキシロースからのエタノール収率へ与える影響を調べた。

【方法・結果】キシロース資化遺伝子群の発現カセット（*GRE3, SOR1, XKS1*を*PGK1*プロモーター支配下に連結）を含む協会7号株に、*XKS1*を*PGK1*プロモーター支配下に連結させ１コピー追加することで*XKS1*増強株を作製した。作製した*XKS1*増強株をキシロース50g/Lを含む合成培地にて培養し、培養液中の代謝物をHPLC（示唆屈折率検出器、電気伝導度検出器）にて分析してエタノール生産能を評価した。培養評価の結果、*XKS1*発現増強によりエタノール収率の向上した株と、逆にエタノール収率の低下した株が得られた。両者の遺伝子発現量をリアルタイムPCRにより測定したところ、エタノール収率の向上した株では*XKS1*発現量は元株に比べておよそ3倍増加し、エタノール収率の低下した株では*XKS1*発現量は元株のおよそ半分に低下していた。また、副産物の生成を調べたところ、エタノール収率の向上した株ではキシリトールだけでなくグリセロールの生成も抑制されており、これらのことがエタノール収率向上に寄与したと考えられた。

xylose, Saccharomyces, bioethanol

講演番号：3B03p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ B校舎03会場

酸化還元バランスの調整によるキシロースからのエタノール醗酵収率の改善

Improvement of ethanol yield from xylose by adjustment of redox balance of cofactors

○畠中治代 前田智秀 安江友里 西山和恵 （サントリービジネスエキスパート（株） 微生物科学研）

○Haruyo Hatanaka, Tomohide Maeda, Yuri Yasue, Kazue Nishiyama (SUNTORY BUSINESS EXPERT LIMITED, Institute for Microbial Science)

【目的】植物バイオマスに含まれる、ヘミセルロース由来のキシロースから、*S. cerevisiae*でエタノールの生成を行う際の問題の一つに、その醗酵収率の低さがある。そこで、これを改善するため、酵母の育種を行った。

【方法】キシロース醗酵能を付与するために酵母に導入している、*Pichia stipitis*のキシロース還元酵素はNADPHを、キシリトール脱水素酵素は、NADを基質として必要とする。補酵素の酸化還元バランスの観点から眺めると、グルコースからエタノールを醗酵する際、バランスが崩れることはないが、キシロースの場合はNADPHおよびNADが減少する方向へ進んでいく。そこで、NAD濃度を上昇させることを目的として、細胞質に局在するNAD kinaseをコードする*UTR1*あるいは*YEF1*の破壊株を育種した。また、NADPH濃度を上昇させるために、ミトコンドリアのNAD kinase をコードする*POS5*を細胞質にて高発現する育種を試みた。さらに、キシロース醗酵の主な副産物であるキシリトールを低減することを目的として、グリセロールチャネルとして知られる*FPS1*の破壊株を育種し、それら育種株でのキシロース醗酵における効果を検討した。

【結果】育種した株を用いて、５％キシロースを含む培地で醗酵試験を行った。*UTR1* 破壊株、*YEF1*破壊株では、主な副産物であるキシリトール、グリセロール、酢酸の生成量が減少して、エタノール収率が向上した。キシロースの資化速度もほぼ親株と同じであり、予想通りの効果を得る事が出来た。一方、細胞質にて*POS5*を高発現した株では、キシリトールが親株の2倍程度に増加し、エタノール収率は激減した。NADPH濃度を上昇させることで、キシロース還元酵素による反応速度が上昇するものの、次のキシリトール脱水素酵素による反応が律速となり、キシリトールが蓄積することが原因と思われた。蓄積したキシリトールは、細胞内浸透圧を高めてしまうため、速やかに排出されるものと思われる。Fps1pはグリセロールチャネルとして知られており、細胞内の浸透圧調整のためにその発現、活性調節がなされている膜タンパクである。我々はこのFps1pがキシリトールの排出も担っているものと考えて、*FPS1*の破壊株を作成した。また、細胞内外の浸透圧にかかわらず、その活性が低下しない、N末を欠失させた変異型Fps1pも作成し、その高発現株も作成した。変異型*FPS1*発現株では、キシリトールの生成量が上昇したが、*FPS1*破壊株では、逆にキシリトールの生成量の低下が見られ、エタノール収率は上昇した。これらの事から*FPS1*はキシリトールを排出するチャネルの1つであることが確認された。興味深いことに*FPS1*破壊株では、グリセロール生成量は逆に増加した。これは、*FPS1*の破壊により、キシリトールより下流の代謝が促進したことと、他のグリセロールチャネル発現量が上昇したせいかもしれない。

Xylose fermentation, NAD kinase, Redox balance

講演番号:3B03p18
講演日時、会場:3月24日17:26～ B校舎03会場

廃棄ソフトセルロース系バイオマス資源の土壌放線菌による糖化および糖化物のエタノール生産への利用

Abandonment soft-cellulose biomass resources saccharification by the soil actinomycete, use to the ethanol vapour of a glycation products.

○長瀬 恭平[1]、根本 純[2]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化）

○Kyohei Nagase[1], Jyun Nemoto[2], Takako Hirano[2], Wataru Hakamata[1,2], Toshiyuki Nishio[1,2]（[1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. And Life Sci., Bioresource Sciences. Nihon Univ.）

【目的】

植物は地球上に最も多量に存在するバイオマス資源である。しかし、資源利用に適している植物バイオマスの現在の利用状況は、伐採量のうちおよそ50%は燃焼用の燃料の槇や炭としてしか利用されていない。また、農作物由来の稲わら、麦わら、およびもみ殻などの廃棄ソフトセルロース系バイオマス資源の効率的な利用方法も確立されていない。植物バイオマス資源の成分構成比は約50%がセルロース、約20%がキシランを含むヘミセルロース、約15～30%がリグニンとなっている。これら3つの要素をバランス良く分解することが、最も効率の良いバイオマス資源の利用につながると考えられる。そのため、土壌中の共生環境にならってこのようなバイオマス資源を効率的に分解できるような土壌放線菌を探索し、それらを利用して共生発酵法による分解酵素生産とソフトセルロース糖化を同一容器内で行うオンサイト生産を目指し、この糖化で得られた糖化物を酵母により発酵させてエタノール生産を検討する。このシンプルな方法が確立できれば、小規模分散型（地産地消型）としてソフトセルロースの糖化が行え、環境への負荷の軽減や廃棄物そのものを固形燃料や肥料として再利用できる可能性もうかがえる。

【方法・結果】

土壌放線菌約500菌株より一次スクリーニングとして、セルロース分解菌、キシラン分解菌、リグニン分解菌を平板培地上で選抜した。この時、セルロース分解酵素生産菌はCMCとCongo-redを、キシラン分解酵素生産菌はBeechwood xylanを、リグニン分解酵素生産菌はRemazol Brilliant Blue Rをそれぞれ培地中に含有させた。続いて液相中での分解強度を観察するため、アズリン多糖を用いて選抜を行った。二次スクリーニングとして、固相・液相両培地中で有意な分解を示した菌を用いてβ-グルコシダーゼ活性とβ-キシロシダーゼ活性を*p*-NP体を用いて選抜を行った。現在、二次スクリーニングを経て最も高い活性を示した菌について同定中である。今回はスクリーニング結果を中心に報告する。

Actinomycete, Saccharification, Wheat straw

講演番号：3B03p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ B校舎03会場

Acremonium cellulolyticus C-1 と *Saccharomyces cerevisiae* ATCC4126 の共培養による効率的なエタノール生産

Efficient bioethanol production by co-culture of *Acremonium cellulolyticus* C-1 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC4126

○ 成瀬　和弥，加藤　竜也，朴　龍洙[1]（静岡大・農・応生化，[1]静岡大創科技院）
○ Kazuya Naruse, Tatsuya Kato, Enoch Y Park[1] (Fac. Agric. Shizuoka University., [1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka University.)

【目的】現在、二酸化炭素などの温室効果ガスによる地球温暖化の影響が世界中で危惧されている。このため、二酸化炭素の排出量を削減するためにバイオエタノール等の代替エネルギー生産が研究されている。しかし、工場規模でバイオエタノールを生産する場合、セルロースを糖化するセルラーゼの価格が高く、コストが高くなってしまう問題がある。このため、本研究では高セルラーゼ生産菌である *Acremonium cellulolyticus* C-1 と高エタノール生産菌である *Saccharomyces cerevisiae* ATCC4126 を共培養することで、セルロース資源から一度の共培養でバイオエタノール生産を行った結果について報告する。
【方法】60 時間前培養を行った *A. cellulolyticus* を Solka Floc、Urea、$(NH_4)_2SO_4$ 及び微量イオンを含む培地に植菌し、32℃で 60 時間培養してセルラーゼの生産を行った。この培養液に 24 時間前培養を行った *S. cerevisiae* と炭素源として Solka Floc (International fiber corporation. U.S.A)を加えて、同条件で培養することで、培地中でセルラーゼ生産、糖化、発酵の全てを行った。この培養液を 12 時間ごとにサンプリングし、セルラーゼ活性、乾燥菌体重量、グルコース濃度、エタノール濃度を測定した。
【結果】培養 60 時間目のセルラーゼ活性は 6.8 FPU/ml であり、この培養液に 150 g/L の Solka Floc と *S. cerevisiae* の前培養を植菌後 12 時間でエタノール生産濃度は 25.74 g/L に達した。これは推定エタノール収率 67.4%に該当し、セルラーゼ生産とエタノール生産工程を一緒にすることにより、低コストかつ短時間でセルロースからの効率的にエタノール生産が可能であることを示唆する。

Bioethanol, *Acremonium cellulolyticus, Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：3B03p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ B校舎03会場

カクテルマルチコピーインテグレーション法を用いた *Candida utilis* のキシロース代謝酵素量比の最適化

Construction of *Candida utilis* with ratio-optimized expression of xylose-metabolizing enzymes using a cocktail multicopy integration method.

○玉川 英幸、吉田 聡（キリンHD・フロンティア技術研）
○Hideyuki Tamakawa, Satoshi Yoshida (Central Laboratories for Frontier Technology, KIRIN Holdings Co. Ltd.)

【目的と背景】*Candida utilis*は増殖力・発酵力に優れるトルラ酵母である。本酵母はキシロースを含む培地で旺盛に生育することができるものの、キシロースからエタノールを発酵生産することはできない。我々はこれまで、補酵素要求性がNADH型に変換された*Candida shehatae*由来キシロース還元酵素遺伝子（*mXYL1*）、キシリトール脱水素酵素遺伝子（*XYL2*）、*Pichia stipitis*由来キシルロースリン酸化酵素遺伝子（*XYL3*）が導入された*C. utilis*は、キシロースからエタノールを生産できることを報告している[1)]。しかし、その発酵能は収率や速度の面において改善の余地があった。そこで、本研究では、*C. utilis*のキシロース発酵力の増強を目的として、カクテルマルチコピーインテグレート法によってキシロース代謝酵素遺伝子群の発現量比の最適化を行った。

【方法】*C. utilis*の多コピー染色体組み込み型ベクターであるpCU155は形質転換により最大で90コピーが染色体の*URA3*座に安定的に組み込まれた[2)]。*mXYL1*、*XYL2*、*XYL3*をそれぞれpCU155にクローニングし、3種のベクターを制限酵素処理によって線状化し、それらのDNA断片を混合して、*C. utilis* NBRC0988株に同時に導入した。得られたクローンの中からキシロース発酵性が高い株を選抜し、キシロースの発酵能、各遺伝子の導入コピー数を解析した。

【結果】カクテルマルチコピーインテグレート法によって得られたクローンは3種のキシロース代謝酵素遺伝子がランダムに多コピーで組み込まれており、クローンによってキシロースからのエタノール生産量、キシリトールの副生量が異なっていることが予想された。そこで、160クローンについて、それらの中からキシロース発酵性が安定的に高い株を3株選抜した。そして、キシロースを含む培地を用いてエタノール生産性を評価したところ、これらの株ではそれぞれの遺伝子が1コピー組み込まれた株より、キシロースからのエタノール生産量が43%増加していた。また、消費したキシロースに対するエタノール収率は84%であった。さらに、導入された遺伝子のコピー数を解析したところ、得られた3株ではいずれも代謝経路の下流にいくにつれて導入されたコピー数が増加していた。これらの結果より、カクテルマルチコピーインテグレーション法は代謝合成経路の律速段階の推定と高生産菌株の構築が同時にできる有用な方法であることが示された。

1) Tamakawa et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. (2011)
2) Kondo et al. Nat. Biotechnol. (1997)

Candida utilis, bio-ethanol, xylose

講演番号：3A04a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ A校舎04会場

フミヅキタケの産生する植物成長調節物質の探索と合成

Search for and synthesis of growth regulating compounds towards plants from *Agrocybe praecox*

○伏見圭司[1]、安西航太[2]、徳山真治[2]、桂武彦[3]、切岩祥和[3]、松本則行[4]、関谷敦[5]、橋爪大輔[6]、長澤和夫[7]、永尾大祐[8]、浅川倫宏[8]、菅敏幸[8]、平井浩文[2]、河岸洋和[1,2]（[1]静大院・創造、[2]静大農・応生化、[3]静大農・バイオ、[4]新潟・森林研、[5]森林総研、[6]理研、[7]東農工大工・生命工、[8]静県大・薬）

○Keiji Fushimi[1], Kouta Anzai[2], Shinji Tokuyama[2], Takehiko Katsura[3], Yoshikazu Kiriiwa[3], Noriyuki Matsumoto[4], Atsushi Sekiya[5], Daisuke Hashizume[6], Kazuo Nagasawa[7], Daisuke Nagao[8], Tomohiro Asakawa[8], Toshiyuki Kan[8], Hirofumi Hirai[2], Hirokazu Kawagishi[1, 2] ([1]Educational Division, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [3]Department of Biological and Environmental Science, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [4]Niigata Prefectural Forest Research Institute, [5]Forestry and Forest products Research Institute, [6]Advanced Technology Support Division, RIKEN Advanced Science Institute, [7]Department of Biotechnology and Life Science, Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, [8]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)

【目的】新潟県のあるビニールハウスで、通常よりも肥大したイチゴの実を確認し、その後、根元の土壌からフミヅキタケが発生するという現象が確認された。前大会において、フミヅキタケの培養ろ液に由来する植物成長調節物質を報告した。[1, 2)] 本研究では、フミヅキタケに由来する植物成長調節物質のさらなる単離・精製および合成を目的とした。
【方法】１．植物成長調節物質の単離：フミヅキタケの菌糸体の大量培養を行い、得られた培養ろ液を酢酸エチルで抽出し、レタスに対する植物成長調節活性試験の結果を指標にしながら各種クロマトグラフィーにより化合物の単離・精製を試みた。２．植物成長調節物質の合成：出発原料から酸化反応、増炭反応による連続反応と官能基の変換により化合物の合成を試みた。
【結果】フミヅキタケの培養ろ液 - 酢酸エチル可溶部から化合物 1 が得られた。NMRを始めとした各種機器分析による構造解析を行い、これまでに単離・構造決定した化合物の類縁体であることを明らかにした。さらに、これまでに報告した植物成長調節物質を Agrocybynes A-D、化合物 1 を Agrocybyne E と命名した。[3)] 現在 Agrocybynes A-E の合成を行い、イチゴに対する成長調節活性試験を試みている。

1) 伏見圭司ら、平成22年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p 4
2) 伏見圭司ら、平成23年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p 16
3) Keiji Fushimi *et al.*, *Tetrahedron*, in press

Agrocybe praecox, Agrocybyne, plant growth regulating compound

講演番号：3A04a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ A校舎04会場

チャナメツムタケ由来の生理活性物質の探索

Search for biologically functional compounds from *Pholiota lubrica*

○的場　隆太[1]、伏見　圭司[2]、平井　浩文[1]、河岸　洋和[1,2]（[1]静大農・応生化、[2]静大院・創造）

○Ryuta Matoba[1],Keiji Fushimi[2], Hirofumi Hirai[1], Hirokazu Kawagishi[1,2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Educational Division, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】チャナメツムタケ（*Pholiota lubrica*）はモエギタケ科スギタケ属のキノコであり、北半球温帯に分布する可食性のキノコである。ブナなどの広葉樹林やアカマツ、カラマツなどの針葉樹林に群生する木材腐朽菌の仲間で、秋になるとその子実体が発生する。チャナメツムタケに関する生理活性はいくつか知られているが、[1-3]生理活性物質の単離・精製および構造解析の研究はなされていない。本研究では、チャナメツムタケに由来する生理活性物質の探索を試みた。

【方法および結果】チャナメツムタケ子実体をエタノール、アセトンで抽出を行った。減圧濃縮後、ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチルで液－液分配を行い、クロロホルム可溶部を各種クロマトグラフィーに供し、化合物の単離・精製を試みた。現在、生理活性物質の単離・精製を進め、NMRを始めとした各種機器分析による化合物の構造解析を目指している。

1) 荒川信彦ら，日本栄養・食糧学会誌（1977），**30**(1)，29-33
2) 関谷敦ら，日本公開特許公報（2007），JP 2007001961 A 20070111
3) Hiroshi Araya；*Allelopathy*（2007），341-352

Pholiota lubrica, mushroom, biologically functional compound

講演番号：3A04a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ A校舎04会場

*Russula vinosa*子実体に由来する機能性物質の探索

Search for biologically functional compounds from fruiting bodies of *Russula vinosa*

○川出　美咲[1]、呉　静[2]、高山　真規子[3]、矢澤　一良[3]、平井　浩文[1]、河岸　洋和[1, 2]
（[1]静大農・応生化、[2]静大院・創造、[3]東京海洋大院・海洋科学技術）
○Misaki Kawaide[1], Wu Jing[2], Makiko Takayama[3], Kazunaga Yazawa[3], Hirofumi Hirai[1], Hirokazu Kawagishi[1,2]
([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology)

【目的】*Russula vinosa* は中国福建省に生育するキノコで、広葉樹と共生する外生菌根菌である[1)]。またこのキノコは食用であり、食品化学的な成分分析や抗菌活性や抗癌活性の生理活性が報告されている[2, 3)]。しかし、機能性物質の単離や構造解析はなされていない。本研究では, *R.vinosa* 子実体に由来する機能性物質の探索を目的とした。

【方法】*R.vinosa* 乾燥子実体をヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で順次抽出し、各可溶部をレタスに対する植物成長調節活性試験および破骨細胞形成阻害活性試験に供した。その結果、酢酸エチル可溶部にレタスに対する成長促進活性、ヘキサン可溶部および酢酸エチル可溶部に破骨細胞形成阻害活性が見られた。そこで、各活性試験の結果を指標にしながら酢酸エチル可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODSカラムクロマトグラフィー、HPLCにより、順次精製を行った。

【結果】*R.vinosa*子実体酢酸エチル可溶部から化合物**1**および**2**を単離した。現在、NMRをはじめとした各種機器分析にて構造解析を行い、各活性試験を試みている。また、さらなる機能性物質の単離・精製を試みている。

1) Chen Yu-Hang , Chen Zheng-Ming (2007). *CJEA*, **15**(5),171-173
2) Xu Xuping *et al*., (2003). *Mycosystema*, **22**(1), 107-111
3) Li Huizen *et al*., (1998). *Mycosystema*, **17**(1), 68-74

Russula vinosa, mushroom, functional compound

講演番号：3A04a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ A校舎04会場

サケツバタケが産生する機能性物質に関する化学的研究

Chemical studies on biologically functional compounds produced by *Stropharia rugosoannulata*

○呉　静[1]、徳山　真治[2]、小山　智之[3]、矢澤　一良[3]、長井　薫[4]、松本　哲夫[5]、平井　浩文[2]、河岸　洋和[1,2]（[1]静大院・創造、[2]静大農・応生化、[3]東京海洋大・ヘルスフード、[4]山梨大・医工総合、[5]群馬・林業研究所）

○Jing Wu[1], Shinji Tokuyama[2], Tomoyuki Koyama[3], Kazunaga Yazawa[3], Kaoru Nagai[4], Tetsuo Matsumoto[5], Hirofumi Hirai[2], Hirokazu Kawagishi[1,2] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [3]Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, [4]Department of Epigenetic Medicine, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, Yamanashi University, [5]Gunma Prefectural Forestry Experiment Station)

【目的】サケツバタケはモエギタケ科モエギタケ属のキノコであり、日本、ヨーロッパ、北アメリカ、ニュージーランド等に自生している。昨年度の本大会において、サケツバタケからの破骨細胞形成阻害活性および抗MRSA活性物質について発表した[1,2)]。本研究ではこのキノコからのさらなる活性物質の単離、精製、構造決定、活性発現機構の解明を目的とした。

【方法】サケツバタケ子実体を70%エタノール、アセトンで抽出し減圧濃縮後、ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、水で順次抽出し、得られた各可溶部を破骨細胞形成阻害、抗小胞体ストレス誘導神経細胞死抑制、抗MRSA、抗真菌の活性試験に供した。活性が確認されたヘキサン可溶部を各種クロマトグラフィーによって分画した。

【結果】ヘキサン可溶部より、新規化合物を含む数種の活性物質を単離した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトルにより決定した。各化合物を活性試験に供したところ、破骨細胞形成阻害、抗小胞体ストレス、抗MRSA、抗真菌がそれぞれ確認された。さらに各種活性試験で活性が確認された画分から、活性物質の探索を進めている。

1）呉静ら、平成 23 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p15
2) Wu, J. *et al*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1631-1634 (2011)

Stropharia rugosoannulata, mushroom, structuctural determination

講演番号：3A04a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ A校舎04会場

土壌分離細菌 MF32 株が生産する細菌のコロニー形成を促進する物質に関する研究

Studies on substances which promote colony formation of bacteria produced by a bacterium, strain MF32

○河合 亮、山田 哲也、藤野 宣知、長澤 寛道、作田 庄平(東大院農生科・応生化)
○Ryo Kawai, Tetsuya Yamada, Noritomo Fujino, Hiromichi Nagasawa, and Shohei Sakuda (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo)

【目的】
我々は細菌のコロニー形成を促進する物質が新規微生物の分離に有用だと考え、コロニー形成促進物質および活性物質の生産菌を探索してきた。細菌のコロニー形成促進物質のスクリーニングの結果、土壌より分離した 515-5 株および MF32 株と名付けた 2 株が活性物質の生産菌として見出された。515-5 株より活性物質として単離した L-hercynine(L-histidine betaine)は終濃度 6 μM でコロニー数を約 1.6 倍に増加させる活性を有していた。前回の本大会で、L-hercynine への感受性を指標にユニークな細菌種を取得することができることを報告した。本研究では MF32 株が生産する活性物質の単離・構造決定および感受性細菌の取得を目的とした。
【方法および結果】
活性の検定には、サンプルを添加した腐植酸・ビタミン寒天培地に土壌懸濁液を希釈したものを塗布し 7 日間培養した後、出現した細菌のコロニー数を数え、サンプルを添加していないコントロールの培地と比較して活性を評価する方法を用いた。MF32株をベネット培地で 7 日間培養して得た菌体のメタノール抽出物を活性炭カラムクロマトグラフィー、逆相HPLCの順に供して精製を行った。培養液20リットルから精製を行った結果、活性画分0.8 mgが得られた。得られた活性画分を25 ng/mlの終濃度で培地に添加すると、出現するコロニー数は約2倍に増加した。現在、構造解析および感受性細菌の取得を行っている。

colony formation , actinomycetes , bioactive substances

講演番号：3A04a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ A校舎04会場

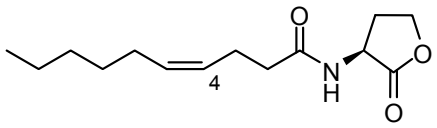
糸状菌内に共生する細菌が産生する新規アシルホモセリンラクトン

Identification of a new AHL produced by endobacteria in *Mortierella* fungus

○甲斐 建次、笠松 幸司、林 英雄（阪府大院・生命環境）
○Kenji Kai, Koji Kasamatsu, Hideo Hayashi (Osaka Prefecture University)

【目的】

グラム陰性細菌はアシルホモセリン（AHL）を化学シグナルとしたクオラムセンシング（QS）を行っている。QS を制御する物質を糸状菌二次代謝産物中に求めスクリーニングを行ったところ、接合菌 *Mortierella alpina* A-178 培養物抽出物から AHL 類そのものを単離・構造決定した（2009 年度大会）。本菌がなぜ AHL 類を産生しているのかが不明であったが、*M. alpina* 細胞中に細菌（エンドバクテリア）が共生し、それらが本当の AHL 生産者であること示唆する実験結果を得た（2011 年度大会）。本共生系の解析を進める過程で、新規 AHL（図）を *M. alpina* A-178 培養物抽出物から見出した。今回、その化学構造の決定を報告する。



図．今回同定した新規アシルホモセリンラクトン

【方法と結果】

M. alpina A-178 を PDB で生育させて得た培養物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル）に供した。得られた画分を、AHL 応答性レポーター遺伝子を組込んだ *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 を用いたレポータージーンアッセイに供した。活性画分（80% と 100% 酢酸エチル溶出）を HPLC（Inertsil ODS-3、10 から 70% アセトニトリルのグラジエント溶出）で分画したところ、既知の AHL 類が溶出されない画分においてレポータージーンの活性化が認められた。また、本画分を GC/MS で分析したところ、AHL 類が EI-MS で特徴的に与えるフラグメントイオンが検出された。これらのことから、本画分には新規な AHL が存在することが強く示唆された。本物質は分子イオンピークを *m/z* 253 に与え、既知の AHL である *N*-decanoylhomoserine lactone（C_{10}-HSL、MW 255）よりも分子量が 2 小さいことが分かった。フラグメンテーションの詳しい解析から、アシル鎖の 4 位に二重結合があることが予想された。以上の結果から、本物質を *N*-(4*Z*-decenoyl)homoserine lactone（C_{10}ene-HSL）であると推定した。

構造を確定するために、推定化合物を化学合成した。4-Pentyn-1-ol を出発原料にして、5 段階で目的物質を合成した。得られた合成標品と天然物の GC/MS データを比較したところ、それぞれの保持時間と MS が完全に一致した。よって、*M. alpina* A-178 が産生する新規 AHL は C_{10}ene-HSL であることを決定した。また、キラル GC 分析により、天然 C_{10}ene-HSL は L:D = 9:1 の比であることが分かった。

本物質の他に、極めて疎水性が高い AHL が *M. alpina* A-178 培養液抽出物から見出されており、その単離・構造決定も進めている。

endobacteria, quorum sensing, *N*-acylhomoserine lactone

講演番号：3A04a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ A校舎04会場

*Staphylococcus aureus*が産生する*Pseudononas aeruginosa* クオラムセンシング制御物質の単離・同定

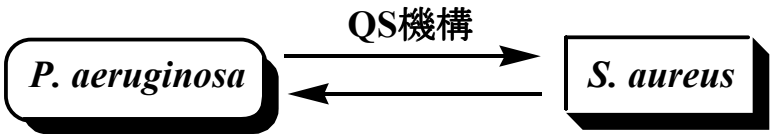
Isolation and identification of novel *Pseudomonas aeruginosa* Quorum sensing inhibitors from *Staphylococcus aureus*

○藤井健二[1]・尾田健太郎[2]・新野 啓介[3]・山田 裕美[3]・老川 綾[3]・ 皆川 周[3],・加藤 文紀[4]・奥田 潤[3]・ 菅井基行[3]・ 後藤 直正[3]・北山隆[1、2]（近畿大院農バイオ[1]・近畿大農バイオ[2]・京都薬大微生物感染制御学[3]・ 広島大院医歯薬細菌学[4]）

○Kenji Fujii[1], Kentaro Ohta[2], Keisuke Shinno[3], Hiromi Yamada[3], Aya Oikawa[3], Shu Minagawa[3], Fuminori Kato[4], Jun Okuda[3], Motoyuki Sugai[3], Naomasa Gotoh[3], Takashi Kitayama[1, 2]（Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric., Kinki Univ.[1] Fac. Agric., Adv. Biosci., Kinki Univ.[2] Dept. Microbiol. Infect. Cont. Sci., Kyoto Pharm. Univ.[3] Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. Sci., Hiroshima Univ.[4]）

【目的】日和見感染菌である*Pseudomonas aeruginosa* と*Staphylococcus aureus* は、混合感染や菌交代症などを引き起こす。*P. aeruginosa*によって産生される PQSおよびその類似体であるHQNOを介した*S. aureus*増殖抑制が既に知られ[1-3]、その作用機作も明らかになりつつある。最近になって、*S. aureus*によって産生される物質も*P. aeruginosa*の増殖抑制に深く関わることが示唆され[4-5]、両者間の相互作用が明らかとなってきた。そこで本研究では*S. aureus*によって産生されるQS制御物質の探索を行った。

【方法および結果】*S. aureus* 培養上清を酢酸エチル抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画したところ、複数のQS制御物質が存在することが分かった。これらを単離し同定した結果、それぞれが一つのペプチド結合を有する7種類のアミノ酸類縁体(cyclic dipeptide)であることが分かった。



1) Lucas, R. H., *et al. PNAS*. **2006**, *103*, 19890-19895.
2) Irina S. Barequet., *et al. Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1681-1687.
3) Saara, Q., *et al. Infection and Immunity*. **2006**, *74*, 910-919.
4) 皆川ら、日本細菌学会第62回関西支部総会要旨集 **2009**.
5) 皆川ら、2010年度日本農芸化学会大会要旨集 **2010**.

quorum sensing, *Staphylococcus aureus*, cyclic dipeptide

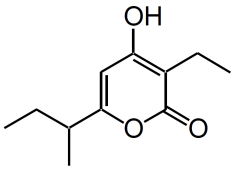
講演番号：3A04a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ A校舎04会場

Streptomyces 属放線菌の自己胞子発芽抑制物質

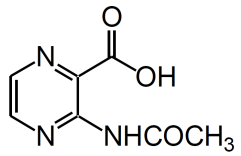
Self-inhibitor of Spore Germination in *Streptomyces* spp.

○横山 森，柏木 沙織，青木 友，川出 洋，夏目 雅裕（農工大院・農）
○Mori Yokoyama, Saori Kashiwagi, Yuu Aoki, Hiroshi Kawaide, Masahiro Natsume (Grad. Sch. Agri., Tokyo Univ. Agri. Tech., Japan)

【目的】胞子の発芽は微生物の生存にとって重要なステップであり、温度、湿度、酸素濃度といった環境要因によって制御されている。もう一つの重要な制御因子は胞子に含まれる自己胞子発芽抑制物質である。Petersen らは、*Streptomyces viridochromogenes* から germicidin を自己胞子発芽抑制物質として報告した。我々はメロンがんしゅ病の病原放線菌から自己胞子発芽抑制物質を単離構造決定し、hypnosin と命名した。また、germicidin とその類縁体が *S. coelicolor* において自己胞子発芽抑制物質として機能していることを明らかにした。その研究の過程で、*S. coelicolor* に対する germicidin 類の発芽抑制活性が Petersen らによって報告された *S. viridochromogenes* に対する活性より著しく弱いことを見出した。そこで我々は *S. viridochromogenes* 胞子抽出物の胞子発芽抑制活性を再調査することにした。また germicidin 生合成遺伝子を持たないことが明らかにされている *S. griseus* 胞子抽出物の発芽抑制活性も調べた。



Germicidin



Hypnosin

【方法】胞子発芽抑制活性は 96 穴プレートを用いた吸光度法により測定した。すなわち、試料のメタノール溶液を分注後、クリーンベンチ内で風乾し、胞子懸濁液と培地を添加、超音波処理して、28˚C 36～48 時間インキュベートした後の吸光度変化から発芽抑制率を求めた。胞子抽出物は胞子をよく形成した寒天平板培養物にガラスビーズを乗せて転がし、胞子を付着させたガラスビーズごと $CHCl_3$-CH_3OH-H_2O 混合溶媒で抽出して得た。

【結果】Germicidin とその類縁体は我々のアッセイ方法では *S. viridochromogenes* に対して 200μg/ml 以上の濃度でないと発芽抑制活性を示さず、Petersen らが報告した 40pg/ml という最少活性発現濃度より遙かに高い値となった。また、germicidin 類は、*S. coelicolor* に対してと同様、全て同程度の発芽抑制活性を示し、Petersen らが報告した構造−活性相関は認められなかった。*S. viridochromogenes* 胞子抽出物から常法により酢酸エチル可溶酸性、中性、塩基性画分を調製して活性を調べた結果、中性画分が最も強い活性を示し、酸性画分が中程度の活性を示した。*S. griseus* 胞子抽出物についても同様な実験を行った結果、酢酸エチル可溶中性画分のみが発芽抑制活性を示した。現在、両菌株の発芽抑制活性物質のクロマト挙動を比較しながら精製を進めている。

germicidin; hypnosin; self-inhibitor

講演番号：3A04a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ A校舎04会場

放線菌*Streptomyces* sp. TM-74の産生するシデロフォアの構造決定

Structure determination of new siderophore produced by *Streptomyces* sp. TM-74

○小谷　真也[1,2]、小早川文哉[1]、肥田木道生[1]（[1]静大・農，[2]静大院・創造）
○Shinya Kodani, Fumiya Kobayakawa, Michitaka Hidaki (Shizuoka University)

【目的】シデロフォアとは、ある種の微生物および植物が分泌する低分子性の鉄キレート化合物の総称である。とくに*Streptomyces*属の放線菌からは、ハイドロキサメート構造を有するシデロフォアが複数単離されている。最近の発表者の研究で新規シデロフォアtsukubachelin Aが単離されている（Kodani *et al.* Eur. J. Org. 2011）。さらなる新規シデロフォアの単離を目的としてスクリーニングを行った結果、*Streptomyces* sp. TM-74株からtsukubachelin Bと命名した新規シデロフォアを単離、化学構造の決定を行った。
【方法】筑波山土壌から単離したTM-74株と命名した放線菌にシデロフォア産生能が見られたので、16S rDNAの解析を行った。その結果、TM-74株は、*Streptomyces*属の放線菌であることが示唆された。さらに、鉄欠損液体培地を用いて、5日間培養後、ろ過し細胞を除いた培養液に塩化鉄を加え、鉄シデロフォア複合体を形成させた。濃縮後、HPLC分取によって新規シデロフォアを単離した。さらに詳細な構造解析を行うために、COSY、TOCSY、HMBC、HMQCの二次元NMRを含むNMRおよびMSスペクトラムを用いた構造決定を行った。
【結果】NMRおよびMSスペクトラムの解析により、tskubachelin Aに類似した構造を有する新規シデロフォアであることが明らかとなり、tsukubachelin Bと命名した。6つのアミノ酸からなるヘキサペプチドであり、2モルのSer 、1 モルのOrn、 *N*-α-methyl-*N*-δ-hydroxy-*N*-δ-formylornithine、*N*-α-methyl-*N*-δ-hydroxyornithine、およびcyclic *N*-hydroxyornithineを含んでいることが明らかとなった。立体化学に関してもマーフィー法を用いた分析を行い、検討中であり、その結果を合わせて発表する予定である。

Streptomyces, siderophore, NMR

講演番号:3A04a10
講演日時、会場:3月24日10:49～ A校舎04会場

放線菌*Streptomyces* sp. MK-30株からのbafilomycin類縁体の単離と構造の決定

Isolation and structure determination of new bafilomycin analogue from *Streptomyces* sp. MK-30

○肥田木道生[1]、村尾綾子[1]、小川直人[1]、小谷真也[1,2]（[1]静大・農、[2]静大院・創造）
○Michitaka Hidaki, Ayako Murao, Naoto Ogawa, Shinya Kodani (Shizuoka University)

【目的】抗生物質の探索源として放線菌は非常に重要な微生物であり、二次代謝産物の多様性から、現在でも抗生物質探索の研究が世界中で行われている。本研究において新たに茶園土壌から放線菌の単離を行い、アセトン抽出物を用いた抗微生物活性のスクリーニングを行った。その結果、*Streptomyces* sp.MK-30株において抽出物から抗酵母活性が見られたので、抗酵母物質の単離と構造決定を行った。
【方法】牧の原市の茶園土壌から、ISP2寒天培地を用いて放線菌の単離を行った。合計34株の放線菌を単離し、アセトン抽出物に関して、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Saccharomyces cerevisiae*の4種類の微生物に対するペーパディスク法を用いた抗菌作用試験を行ったところMK-30株に酵母*S. cerevisiae*に対する活性が見られた。そこで、MK-30株の16S rDNAの配列を用いた同定を行い、*Streptomyces*属の放線菌であることを明らかにした。寒天培養菌体をアセトン抽出し、抽出液を減圧濃縮後、逆相オープンカラムを用い含水メタノールによって溶媒分画した。活性の見られた100%メタノール溶出画分からODSカラムを用いたHPLC分取によって新規抗酵母物質を単離した。この成分はポジティブイオンモードのESI-MS測定で*m/z* 822にイオンピークを与えた。さらに化学構造を決定するために、重アセトン中での各種NMRスペクトラムの測定を行い、構造決定を試みた。
【結果】COSY、TOCSY、HMBC、HMQCの二次元NMRスペクトラムの測定の結果、16員環ラクトン構造を有する新規bafilomycin類縁体であることが明らかとなった。その詳細な構造に関して現在解析中であり、本大会において発表する予定である。

antiyeast compound, *Streptomyces*, bafilomycin

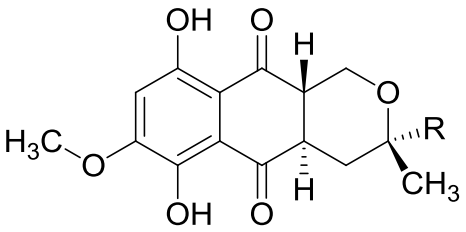
講演番号：3A04a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ A校舎04会場

Fusarium 属菌の生産する新規な dihydrofusarubin 類の構造と生物活性
Structure and bioactivity of dihydrofusarubins produced by Fusarium sp.

○鈴木 大進、前地 晃良[1]、石原 亨[1]、中島 廣光[1]　（鳥取大院･連農、[1]鳥取大･農）
○Masanobu Suzuki, Akiyoshi Maeji, Atsushi Ishihara, Hiromitsu Nakajima (Uni. Grad. School of Agri. Sci., Tottori, Facul. of Agri., Tottori)

【目的】Dihydrofusarubin 類は*Fusarium* 属や *Nectria* 属などの糸状菌が生産する色素であり、抗菌性や細胞増殖抑制作用といった生物活性を持つことが知られている。我々は*Fusarium* 属の１菌株の代謝産物中から新規な dihydrofusarubin A類縁化合物を単離、構造決定し、昨年度報告した。今回我々は同じ菌株からさらに新たな類縁化合物を単離、構造決定し、また、それらの生物活性について調べているので併せ報告したい。

【方法・結果】Dihydrofusarubin A 類縁化合物を生産する*Fusarium* 属の１菌株（Mj-2株）を麦芽培地で培養した。液体培地抽出物を、シラホシカメムシに対する忌避活性試験の結果に基づく忌避活性を指標として各種クロマトグラフィーで精製し、化合物 **1** を単離した。各種機器分析データから、本化合物は$C_{19}H_{24}O_7$の分子式を持つ、新規な dihydrofusarubin A の類縁化合物であった。化合物 **1**の UV スペクトルと類似したスペクトルを示す代謝産物を本菌の培地抽出物中に検索し、化合物 **2**, **3**, **4** を単離することができた。各種機器分析データから、化合物 **2** は anhydrofusarubin であり、化合物 **3**,**4** は新規な dihydrofusarubin 類縁化合物であることが明らかとなった（Fig. 1)。これら代謝産物のレタス幼植物の成長に対する影響を調べたところ、化合物 **1**, **2** は1 mMから根の伸長阻害活性を示したが、化合物 **3**, **4** では目立った活性は見られなかった。現在，これら代謝産物の他の生物活性についても調べている。



Compound **1**, R = $O(CH_2)_3CH_3$
Compound **2**, R = H
Compound **3**, R = $O(CH_2)_3CH_3CH_2CH_3$
Compound **4**, R = $O(CH_2)_2CH_3(CH_2)_2CH_3$

Fig. 1　Dihydrofusarubin 類縁化合物の構造式

dihydrofusarubin, Fusarium, pigment

講演番号：3A04a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ A校舎04会場

シイタケの抗菌物質とその生産を促進するトリコデルマ代謝産物

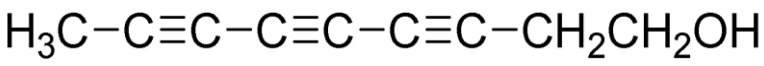
The antifungal substance produced by *Lentinula edodes* and the metabolites of *Trichoderma harzianum* which promotes its production

○藤田 真智子、石原 亨[1]、時本 景亮[2]、中島 廣光[1] （鳥取大院・農、[1]鳥取大・農、[2]菌蕈研）

○Machiko Fujita, Atsushi Ishihara[1], Keisuke Tokimoto[2], Hiromitsu Nakajima[1] (Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [1]Fac. Agric., Tottori Univ., [2]Tottori Mycol. Inst.)

【目的】トリコデルマは抗菌物質や溶菌酵素を生産してシイタケ菌糸を侵害する。しかし、寒天培地上でシイタケとトリコデルマを対峙培養すると、両菌の接触部においてシイタケ菌糸が褐変し拮抗線が形成され、トリコデルマの侵入が一時的にくい止められることが見出された。この現象にはシイタケの抗菌物質が関与することが考えられ、拮抗線付近からnona-3,5,7-triyn-1-ol (NTY) が単離された。本研究では、対峙培養におけるNTYの分布と経時的変化を調べ、さらにトリコデルマ代謝産物がシイタケのNTY生産を促進することを見出したので報告する。

【方法・結果】シイタケ (*Lentinula edodes*) TUFC10608株とトリコデルマ (*Trichoderma harzianum*) TMIC60622株を麦芽寒天培地上で対峙培養した。培地を5つの部分に分け、各部分のNTY量の経時的変化をLC-MS/MSで分析したところ、対峙開始7日目から拮抗線付近でNTYが増加し始めることが明らかになった。このNTY生産の増加にはトリコデルマ代謝産物の関与が考えられるため、麦芽液体培地で7日間培養したシイタケ菌糸をトリコデルマの培養濾液に移植し10日間培養後、培養濾液中のNTY量を調べた。その結果、トリコデルマの培養濾液にシイタケ菌糸を移植した場合のNTY量は0.32μg/mLであり、移植せずそのまま培養を続けた場合に比べ約30倍増加することがわかった。現在、このNTY生産を促進するトリコデルマ代謝産物の精製を試みている。



Nona-3,5,7-triyn-1-ol (NTY)

Lentinula edodes, *Trichoderma harzianum*, antifungal substance

講演番号：3A04a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ A校舎04会場

子嚢菌*Lachnum palmae*からの新規生物活性物質の探索

Search for Novel Bioactive Substances from the Discomycete *Lachnum palmae*

○田辺 友佳[1]、松本 拓矩[1]、細矢 剛[2]、供田 洋[3]、繁森 英幸[1]（[1]筑波大院・生命環境科学、[2]国立科学博物館・植物研究部、[3]北里大院・薬）

○Yuka Tanabe[1], Takunori Matsumoto[1], Tsuyoshi Hosoya[2], Hiroshi Tomoda[3], Hideyuki Shigemori[1] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Department of Botany, National Museum of Nature and Science, [3]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University)

【目的】当研究室では、未活用子嚢菌からの新規生物活性物質の探索研究を行っている。その一環として、これまでに子嚢菌門盤菌類の一種である*Lachnum palmae*の菌体抽出物より、顕著な抗菌活性を有する2種の新規ジベンゾピロン化合物Palmariol A及びBを単離・構造決定してきた。そこで本研究では、本菌株の培養上清部について更なる新規生物活性物質の探索を行った。

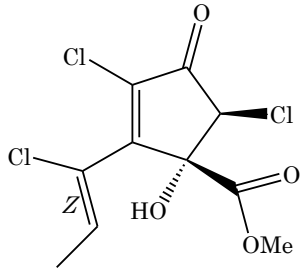
【方法】*L. palmae*を液体培地中（polypeptone 1 %, yeast extract 0.5 %, glucose 2 %, KCl 0.5 %, pH 7.5）で約2週間培養した後、遠心分離により上清部と菌体部に分離した。前者を酢酸エチルで分配し、ペーパーディスク法を用いた抗微生物活性試験を行ったところ、酢酸エチル可溶部（LP-S-EA）に*Penicillium* sp., *Botrytis* sp.に対する顕著な抗真菌活性が見られた。

次に、LP-S-EA画分を、NMRスペクトルデータや抗微生物活性試験を指標に、シリカゲルカラムや逆相HPLCなどを用いて、さらに分離・精製を行い、新規生物活性化合物を単離した。これらの新規化合物の構造は、^{1}H及び^{13}C NMR、2D NMR、ESI-MS、X線結晶構造解析などにより決定した。

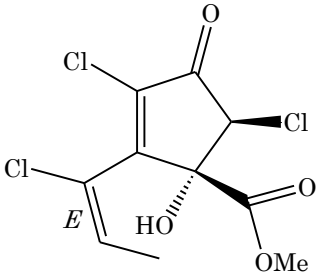
【結果】上清部由来の酢酸エチル可溶部より、塩素を2～3個有する新規シクロペンテン化合物Palmaenone A及びB、Palmaenol A、Palmaetriolの4種を単離することができた。

Palmaenone A及びB、Palmaenol Aは、それぞれ塩素が3個結合した珍しい化合物である。X線結晶構造解析より、Palmaenone A及びPalmaenol Aはラセミ体として存在することがわかった。また、Palmaenone BはPalmaenone Aの二重結合部分の幾何異性体である。さらに、Palmaenol AはPalmaenone Aのカルボニル基が還元された化合物であり、Palmaetriolは、Palmaenol Aの塩素1個が水酸基に変わった化合物である。

Palmaenone A及びBは、*Micrococcus aureus*、*Escherichia coli*、*Xanthomonas campestris*、*Mucor racemosus*、*Penicillium* sp., *Botrytis* sp.などに対し顕著な抗微生物活性が認められた。



Palmaenone A



Palmaenone B

Discomycete, *Lachnum palmae*, Antimicrobial activity

講演番号：3A04a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ A校舎04会場

菌類が生産するラッカーゼ阻害活性物質について

Flavipin as a new inhibitor of laccase from *Magnaporthe grisea*

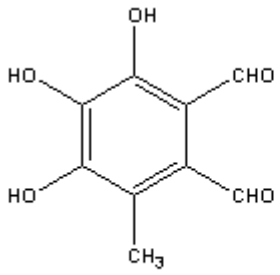
○尾形　京子、貫名　学（山形大・農）
○Kyoko Ogata, Manabu Nukina (Yamagata Univ.)

【目的】2010年度の本大会[1)]において、いもち病菌(*Magnaporthe grisea*)のlaccaseを阻害する物質の探索において、ネジバナの罹病部から分離した糸状菌が強力な阻害物質を生産することを報告した。今回、その阻害物質がflavipinであることがわかったので報告する。

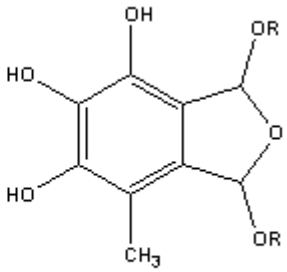
【方法および結果】ネジバナの葉の罹病部から分離した菌（ok1-59-8）を、マルツ培地で1週間振盪培養し、得られた培養ろ液をHP-20に通液させた後、樹脂をMeOH洗浄してMeOH溶出液を得た。MeOH溶出液を濃縮後、残渣をEtOAc-H_2Oで分配した。ついでEtOAc抽出物をSephadex LH-20カラムクロマトグラフィーで繰り返し分画・精製し、活性物質を含む分画（ok2-88-11）を得た。この分画の活性物質は、以下の実験結果からflavipinと同定した。

① この分画のNMRスペクトルは、活性物質に含まれるジアルデヒド部分が水和してジアセタールとなり、生じた２つのアセタール部位でのジアステレオマー混合物として存在すると解釈された。

② また、活性物質をNMRチューブ中CD_3OD溶液に放置しておいたところ、徐々にCD_3OD付加体のスペクトルに変化した。



flavipin



R=H,Me

③ さらにCD_3OD付加体を$HClO_4$触媒による酸加水分解反応を行うことによりジアルデヒド体を得た。

これらのことから活性物質をflavipinと同定した。ついで標品のflavipinを既知の方法[2)]で合成し、同じであることを確認した。

なおLaccase阻害活性試験には、laccase粗酵素液としていもち病菌のpotato-sucrose 液体培地による3日後の培養ろ液を1/2(water)に希釈した液を200μl用い、反応の基質には1-ナフトールを3μl(10mg/ml acetone, 30μg)使用した。laccase反応の進行による反応溶液が紫色化する度合いを判定した。その結果、天然から得られたflavipinは、全量213μl中1μgで強い紫色化反応の阻害が見られた。

1) 尾形ら、2010年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p.3, 2AAp06(2010).
2) J.K.Nitao, et al.,*Nematology*, **4**,55-63(2002).

flavipin, laccase-inhibitor, *Magnaporthe grisea*

講演番号：3A04a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ A校舎04会場

微細藻*Dunaliella salina*の有する抗ピロリ菌活性

Anti-*Helicobacter pylori* activity of micloalga *Dunaliella salina*

○工藤　勇人、柏木　丈拡、青木 章敏、島村　智子、山口　裕司[1]、竹中　裕行[1]、竹内　啓晃[2]、杉浦　哲朗[2]、受田　浩之（高知大農、[1]マイクロアルジェコーポレーション、[2]高知大医）

○Hayato Kudo, Takehiro Kashiwagi, Akitoshi Aoki, Tomoko Shimamura, Yuji Yamaguchi[1], Hiroyuki Takenaka[1], Hiroaki Takeuchi[2], Tetsuro Sugiura[2], Hiroyuki Ukeda (Faculty of Agriculture, Kochi Univ., [1]MicroAlgae Co., [2] Department of Clinical Laboratory Medicine, Kochi Univ.)

【目的】*Dunaliella salina* (*D. salina*) は耐塩性の微細藻であり、環境ストレス条件下で機能性物質であるβ-カロテンやグリセロールを藻体内に多量に生産、蓄積することが知られている。そのため、β-カロテンやグリセロールの抽出を目的に、*D. salina*の産業的培養が行われている。一方、*Helicobacter pylori* (ピロリ菌) は人の胃粘膜に存在しており、胃炎や胃潰瘍、胃がん、十二指腸潰瘍の原因細菌として知られている。ピロリ菌の除菌治療は、上部消化管疾患のみならず、多様な疾患の罹患リスクを低減させることから、臨床の場でも本菌の除菌が推奨されている。しかし、特定の疾患にしか除菌治療の保険適用が認められていない現状や、薬剤耐性株の増加による除菌成功率の低下が問題となっている。本研究では、*D. salina*に抗ピロリ菌活性を見出し、抗菌活性に寄与する物質の特定を行った。

【方法】*D. salina*は藻体を酢酸エチルに浸漬し、一晩抽出を行った後、ろ過したものを*D. salina*抽出液として試験に供した。ピロリ菌は高知大学医学部保有の臨床分離株9株 (抗生物質耐性株7株を含む) を使用した。試料の抗ピロリ菌活性はディスク拡散法を用いて以下の手順で評価した。ピロリ菌をブルセラ液体培地に混和して調製した懸濁液 (OD_{600} ≒ 0.6) をブルセラ寒天培地に塗布した後、試料を20 μL染み込ませたディスク (直径6 mm) を置き、微好気培養 (37ºC、3日間) した後、形成した増殖阻止円の直径を計測した。また、寒天希釈法により抗菌成分の最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。*D. salina*酢酸エチル抽出液に含まれる抗ピロリ菌成分はシリカゲルオープンカラム、ODSオープンカラム、逆相HPLCにより、順次精製し、LC-MS、NMRを用いて構造解析を行った。

【結果】*D. salina*抽出液をシリカゲルオープンカラムにて分画したところ、70% Hexane/EtOAc画分に最も高い活性が認められた。この70% Hexane/EtOAc画分をODSオープンカラムによる分画に供したところ、70% MeOH/H_2O画分に最も高い活性が認められた。次に、70% MeOH/H_2O画分を逆相HPLCにより分画したところ、活性への複数成分の関与が示唆された。そのうち、比較的高い活性を示すことが判明した2つのピーク (化合物α、化合物β) について、LC-MS及びNMR分析による構造解析を行った。その結果、化合物αと化合物βは共にβ-カロテンの分解物である可能性の高い、炭素数18のテルペン誘導体の(*E*)-8-(1,2-dihydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexyl)-5,6,7,8-tetrahydroxy-6-methyloct-3-en-2-oneであることが判明した。寒天希釈法により両化合物のMICを測定したところ、化合物α (抗生物質感受性株：MIC = 35 μg/mL、抗生物質耐性株：MIC = 40 μg/mL) の活性が化合物β (抗生物質感受性株：MIC = 50 μg/mL、抗生物質耐性株：MIC = 60 μg/mL) よりも抗菌活性が高いことが明らかとなった。抗生物質耐性株に対しても一定の活性を示したことから、本研究の成果は機能性食品素材の創製や薬剤への応用の一助になり得るものと期待される。

Dunaliella salina, *Helicobacter pylori*, antimicrobial activity

講演番号：3A04p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ A校舎04会場

タイトル
Title　ネコの本能行動を制御する嗅覚システムの解明
○宮崎 雅雄、北條渉、西村貴志、山下哲朗（岩手大・農）
○Masao Miyazaki, Wataru Hojo,Takashi Nishimura,Tetsuro Yamashita (Iwatedai)

【目的】ネコは、伴侶動物として我々にとても身近な動物だが、ネコの行動を科学的に検証している事例は少なく、多くの行動原理が解明されていない。その一つが尿マーキングによる縄張り行動である。ネコの縄張り行動は広く知られているが、情報媒体となっているにおい物質の分子種、その処理に関わる嗅覚神経回路、他個体の嗅覚情報から得る利益など殆ど分かっていない。そこで我々は、ネコの縄張り行動の仕組みについて研究を行った。
【方法】ネコが仲間のマーキング尿を嗅いだ際に提示するフレーメン(頭を持ち上げ口を半開きにして恍惚とした表情を提示する行動)と呼ばれる本能行動に着目し、フレーメンの生物学的な意味とフレーメンフェロモンの精製を試みた。更にフレーメンフェロモンが主嗅覚系と鋤鼻系のどちらの嗅覚系で受容されるか嗅覚受容システムの解析を行った。
【結果】フレーメンはネコ科動物、ウシなど偶蹄類、ウマ、ゾウの雄が発情雌の尿を嗅いだ時に観察される。これは雄が発情雌の尿中性フェロモンを口から鋤鼻器（フェロモン受容器で鼻中隔に位置し上顎前歯の裏側に開口部がある）に取り込む目的で行い、フレーメン自体もフェロモンで誘起されると報告されていた。しかし本研究でネコでは、雄が発情雌の尿を嗅いだ時だけでなく、雌雄いづれも同性の尿を嗅いだ時にもフレーメンすることを見出した。更に、ネコに自己尿を提示してもさっと嗅ぐだけでフレーメンをしないが、自己尿を鼻に垂らして強制的に嗅がすとフレーメンすることが分かった。以上の結果、ネコのフレーメンは、繁殖行動に関係するものと、非自己の嗅覚情報で誘発される縄張り行動に関係するものがあると分かった。
　縄張り行動に関係するフレーメンの概念はネコ以外の動物で報告が無かったので、これに着目してフレーメンフェロモンの同定を試みた。これまでの結果より、フェロモンが脂溶性の低分子化合物であることが明らかになった。雄ネコのフレーメンを生物検定の指標にオスの尿から抽出した脂質を液体クロマトグラフィーで分画して質量分析計で解析した結果、フェロモン候補物質が脂肪酸の一種である可能性を見出すことができた。
　ネコには、一般的なにおいを受容する主嗅覚系とフェロモンを受容すると考えられている鋤鼻系の2つの嗅覚システムが備わっている。ネコの鋤鼻器が切歯管と呼ばれる管を経て口腔内にだけ開口していることに着目して、切歯管を医療用ボンドで塞ぎ、フェロモン活性画分をネコに嗅がせフレーメンの有無を調べた。その結果、切歯管を閉塞してもネコがフレーメンすることが分かった。これは、フレーメンフェロモンが従来考えられていた鋤鼻系ではなく主嗅覚系で受容されていることを示唆する結果であり、今後更に検証を行っていきたいと考えている。

pheromone, olfactory, cat

講演番号：3A04p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ A校舎04会場

ウメエダシャクとヒロオビトンボエダシャクの生殖隔離機構

Reproductive isolation between *Cystidia couaggaria* and *C.truncangulata.*

○田久保 賀子[1]、中 秀司[2]、山川 玲[1]、村上 陽子[1]、安藤 哲[1]（[1]農工大院・BASE、[2]鳥取大・農）

○Yoshiko Takubo[1] ,Hideshi Naka[2] ,Rei Yamakawa[1] ,Yoko Murakami[1] ,Tetsu Ando[1]

([1] Tokyo University of Agric. & Tech., BASE, [2] Tottori University)

【目的】

ウメエダシャク（*Cystidia couaggaria*、鱗翅目：シャクガ科）の幼虫は、モモ、ウメなどの果樹を食害し、成虫は年一回初夏に発生する。これまでにシャクガ科エダシャク亜科においては、世界で30種ほどの昆虫からタイプⅡの性フェロモンが報告されているが、*Cystidia*属昆虫においては研究例がない。そこで、処女雌から得たフェロモン腺抽出物を分析するとともに、野外誘引試験からウメエダシャクの性フェロモンを同定した。また、鳥取県では同属のヒロオビトンボエダシャク（*C. truncangulata*）が本種と同所的に生息していることから、昼行性であるこれら2種間の生殖隔離に興味を持ち、性フェロモンが果たしている役割を明らかにすることとした。

【方法と結果】

野外から両種の蛹を採取し、羽化した処女メスからフェロモン腺抽出物を得た。まずウメエダシャクの抽出物をGC-EADにて分析したところ、明確なEAD活性を示す5成分（**A**～**E**）の存在が明らかとなり、なかでも成分**C**に最も強い活性が認められた。またGC-MS分析の結果から、直鎖飽和炭化水素に加えC_{21}～C_{27}のジエンやトリエンの存在が示された。それら不飽和炭化水素は特徴的な開裂イオンを示し、合成標品のスペクトルとの比較により（6*Z*,9*Z*）-6,9-ジエンや（3*Z*,6*Z*,9*Z*）-3,6,9-トリエンであることがわかり、**A**はC_{21}の飽和炭化水素、**B**はC_{21}のジエン、**C**、**D**、**E**はC_{21}、C_{23}、C_{25}のトリエンであることが判明した。野外試験において、成分**D**と**E**、すなわちC_{21}トリエンとC_{23}トリエンの混合物に多数の雄成虫が誘引され、本種も他のシャクガ科昆虫と同様に、摂食した植物中に含まれるリノレン酸由来と考えられるタイプⅡの化合物を雌雄間のコミュニケーションに利用していることがわかった。2成分の最適な混合比は2：3～1：4であり、他のEAD活性成分などを添加しても雄蛾の誘引は増強されなかった。

一方、ヒロオビトンボエダシャクでは、処女雌のフェロモン腺の抽出を明期あるいは暗期において行ったが、雄蛾の触角はいずれの抽出物に対しても明確な反応を示さず、また、それらの抽出物のGC-MS分析では飽和炭化水素の他にタイプⅡのフェロモン様物質を確認することができなかった。このことからフェロモンの生産量が極端に少ないか、本種の雄成虫においては化学物質にたよることなく視覚によって雌を発見しているなどの可能性が考えられた。本種の性フェロモンの実態は未知であるが、ウメエダシャクのフェロモントラップには本種は全く誘引されないことから、これら2種の生殖隔離に少なくともウメエダシャクの性フェロモンが重要な要因となっているものと思われる。ところで、雄の触角の機能を確認する目的で**B**～**E**の合成品のEAD活性を調べたところ、ウメエダシャクの雄の触角よりは弱いものの、興味深いことにすべての化合物に対して反応する結果が得られた。今後、処女雌トラップへ雄蛾が誘引されるかどうか調べるとともに、野外観察などから本種の配偶行動への性フェロモンの関与の有無を明確にする予定である。

plum cankerworm moth, male attraction, sympatric species

講演番号：3A04p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ A校舎04会場

ウスタビガが産生する非共役ジエン構造を有する性フェロモンの同定

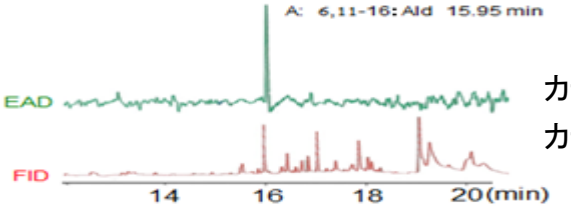
Identification of the unconjugated-dienyl sex pheromone produced by *Rhodinia fugax* females

○宮地崇司・Nguyen Duc Do・中秀司[1]・安藤哲（農工大院 BASE、[1]鳥取大 農）
○Takashi Miyachi, Nguyen Duc Do, Hideshi Naka[1], Ando Tetsu
(Tokyo University of Agric. & Tech., BASE, [1]Tottori University)

ヤママユガ科の昆虫は、世界で 1000 種以上分布している。日本ではその内の 11 種が野外で生息しており、それらの多くはヨナグニサンのように準絶滅危惧種である。また国内でも分布域により形態等が異なるものが多く、それらは分類学上亜種として取り扱われている。性フェロモンは、繁殖において重要な役割を果たしており、生殖隔離の重要な要因として考えられることより、種間に加え亜種間でのフェロモン成分の違いに興味が持たれる。これまで、エリサンやサクサンなどの性フェロモンが同定されているが、それらは日本の自然種ではなく、日本固有のヤママユガ科昆虫の性フェロモンに関してはこれまで報告がない。そこでまず、特徴的な繭を作り比較的野外での採取が容易なウスタビガ(*Rhodinia fugax*)において性フェロモンの化学構造を明らかにすることとした。

鳥取県で採取したウスタビガの処女雌からフェロモン腺を切除し、抽出物を得た。GC-EADにて分析したところ、明確なEAG活性を示す一成分が確認でき（図１）、GC-MS分析からC_{16}のジエンのアルデヒドであることが判明した。極性カラムでの分析で標品の共役ジエン化合物より短い保持時間を示すため、二つの二重結合は非共役であることが考えられ、二重結合を決定するため、まずジイミド還元によりモノエンアルデヒドを導いた。その後にDMDS誘導体化を行った結果、6,11-ジエンであることが明らかになった。ところで、その反応物中にはC_{16}やC_{18}モノエンのアセテート体から生成したと思われるDMDS付加物が存在したため、抽出物のGC-MSデータを再度精査したところ、それらアセテートの存在を確認することができた。ジエンアルデヒドの幾何異性を決定するために現在4つの異性体の合成が進行中であり、今後、誘引試験で同定結果を確認するとともにモノエン化合物の役割について検討する予定である。

演者が別途行っているヒメクジャクヤママユの分析では、6,11-ジエンアセテートを示すマススペクトルが得られており、またサクサンからはアルデヒドとアセテートの両成分が同定されていることから、6,11-ジエンは、ヤママユガ科昆虫のフェロモンを特徴付ける構造の1つであることが示された。



カラム：DB-23 (0.25 mm × 30 m)
カラム温度： 80℃（1 分間維持）から
8℃/min で 210℃まで

図1.GC/EADによるウスタビガのフェロモン腺抽出物分析

pheromone, *Rhodinia fugax*, 6,11-hexadecadienal

講演番号：3A04p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ A校舎04会場

コケガ亜科昆虫が分泌するメチル分岐を有する新規性フェロモンの立体化学の解明

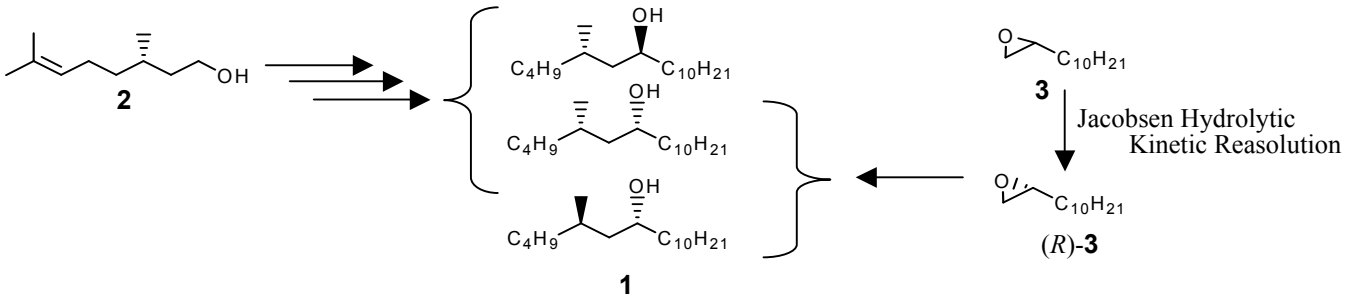
Stereochemistry of methyl-branch in the novel sex pheromone secreted by lichen moth

○山川　玲、清田　隆太郎、安藤　哲（農工大院・BASE）
○Rei Yamakawa, Ryutaro Kiyota, Tetsu Ando (TUAT　BASE)

【目的】ヒトリガ科ヒトリガ亜科の昆虫の多くは、直鎖不飽和炭化水素とそのエポキシ誘導体を性フェロモン成分として分泌することが知られているが、最近、コケガ亜科の 1 種（ヒメホシキコケガ）から、新規なメチル分岐ケトン類が同定された。生合成的にも注目される化合物であり、また近縁種の性フェロモンとの構造の違いに興味を持ち、大学のキャンパス内で偶然得られた 1 頭のハガタキコケガ雌成虫を材料に、その性フェロモンの構造決定を試みることとした。

【方法と結果】フェロモン腺雌抽出物のGC-MS分析は、炭素数18で8位に水酸基を有する化合物がほぼ単一成分として含まれることを示した。しかしながら、合成した直鎖2級アルコールは保持時間が異なることから、天然成分は直鎖ではないことが考えられた。残った抽出物を用いて、メシル化と$LiAlD_4$還元を行いGC-MSにて分析したところ、重水素を含む5-methylheptadecaneの生成を認めることができた。この結果から、未知成分は5-methylheptadecan-7-ol (**1**)、あるいは 13-methylheptadecan-8-ol であることが明らかになった。

そこで、合成標品との比較により未知成分の平面構造を決定し、さらには2つの不斉中心の立体化学を決定することとした。まず(*S*)-β-citronellol (60 % ee、**2**)をメチル基のキラルビルディングブロックとし、(5*S*,7*R*)-**1**と(5*S*,7*S*)-**1**を主生成物とした混合物を得た。マススペクトルに加えてGC-MSでの溶出時間が一致する合成物を含んでいたため、天然成分のメチル基は5位に存在することが確認された。この合成では両異性体の区別ができないため、別途、Jacobsen速度論的光学分割加水分解により得られるキラルな末端エポキシ化物(**3**)より(5*S*,7*S*)-**1**と(5*R*,7*S*)-**1**の混合物を合成した。ジアステレオマーはアキラルなHPLCカラムで、またエナンチオマーは順相キラルHPLCで分離可能であり、最終的に立体化学が決定された4つの光学活性体 (>98 % ee)を得ることができた。誘引試験を実施したところ、(5*R*,7*R*)-**1**にのみ誘引活性が認められ、他の異性体は全く雄蛾を誘引しなかった。このメチル分岐を有する2級アルコールは、新規な天然生理活性物質であり、コケガ類の多くは特異な化合物群をフェロモン成分としていることが期待される。



lepidoptera, sex pheromone, chiral HPLC

講演番号：3A04p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ A校舎04会場

メチル分岐を含む蛾類性フェロモンのキラルＨＰＬＣ分析

Chiral HPLC analysis of lepidopteran sex pheromones including a branched-methyl group

○牧迫沙織・山川 玲・丸山涼子・安藤 哲（農工大院BASE）
○Saori Makisako, Rei Yamakawa, Ryouko Maruyama ,Tetsu Ando
(Tokyo University of Agric. & Tech., BASE)

【目的】　多くの蛾類性フェロモンは直鎖上の化合物であるが、メチル分岐を有する化合物もハモグリガ科、シャクガ科、ドクガ科などの雌成虫から同定されている。分岐点の３級炭素は多くの場合キラル中心となり、その立体化学は光学活性な合成化合物の雄成虫に対する野外誘引試験によって推定され、両エナンチオマーのキラルＧＣカラムでの分離が困難なため、天然フェロモンそのものの絶対立体配置の決定は行われていない。ところで最近、演者らはヒトリガ科のヒメホシキコケガ（*Lyclene dharma dharma*）より、性フェロモン成分として６位あるいは 14 位にメチル分岐を有する 2-オクタデカノンを同定し、大変興味深いことに、それらのラセミ体の合成化合物はキラルＨＰＬＣで光学分割が可能であることを見出した。その結果を踏まえ、フェロモン腺抽出物をキラルＨＰＬＣにて 30 秒ごとに分画し、含まれるフェロモン成分をＧＣ-ＭＳにて定量することで、抽出物には 6-メチル体、14-メチル体ともに *S*体が主に含まれていることが明らかになった[1)]。ただし、この方法で光学純度を示せるほど両エナンチオマーは分離していないため、処女雌がどのくらい選択的に *S*体を生産しているか示すことはできていない。そこで、検出感度と定量性の向上を目的に、ＵＶ吸収を示す誘導体のキラルＨＰＬＣでの光学分割を検討することとした。さらに、モモハモグリガの性フェロモンである 14-メチル-1-オクタデセンの立体化学を、同様な手法で決定することとした。

【方法と結果】　６-メチル-2-オクタデカノンのヒドラジン誘導体もキラルカラムで光学分割が可能であり、10 ng という微量で検出できることが判明した。現在、コケガのフェロモン腺抽出物を用いた実験を検討中である。

一方、14-メチル-1-オクタデセンを分割できるカラムを見出すことはできなかったが、それをオゾン分解して得られる 13-メチルヘプタデカナールはキラルＨＰＬＣで光学分割が可能であった。そこで両エナンチオマーを合成し、溶出順序（*S*体→*R*体）を決定した。今後、このアルデヒドのヒドラジン誘導体のキラルＨＰＬＣ分析を行い、さらにモモハモグリガのフェロモン腺抽出物を用いて実験する予定である。

1) Adachi *et al.*, Positions and stereochemistry of methyl branches in the novel sex pheromone components produced by a lichen moth, *Lyclene dharma dharma*. *J. Chem. Ecol.*, **36**: 814-823 (2010).

Chiral HPLC, sex pheromone, branched-methyl group

講演番号：3A04p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ A校舎04会場

GC-FT-IRを用いたイラガ性フェロモンの分析

GC-FT-IR analysis of the sex pheromones secreted by nettle moths

○柴崎 寛、山川 玲、中 秀司[1]、安藤 哲（東農工大院・BASE、[1]鳥取大農）
○Hiroshi Shibasaki, Rei Yamakawa, Hideshi Naka[1], Tetsu Ando (TUAT BASE、[1]Tottori Univ.)

多くの蛾類性フェロモンは、末端に官能基を有するタイプⅠ化合物あるいは末端に官能基を含まないタイプⅡ化合物から構成されている。それぞれの種が分泌する種特異的な性フェロモンは、炭素数や官能基に加え二重結合の幾何異性の違う成分から構成されており、その構造上の違いを高感度かつ正確に分析することが求められる。これまで多くの場合、二重結合の幾何異性はGCの保持時間を合成標品と比較することで推定されてきたが、もしもIRスペクトルが測定できればより確実なものとなることが期待される。

GCとIRを直結した装置としては、カラムから流出したものを気相状態で測定したものが開発されていたが、感度が十分でなく、また得られるスペクトルがこれまでの液体や結晶のデータと同一ではないなどの理由から汎用されていない。今回使用したGC-FT-IR（Discover IR：Spectra Analysis社製）は、分離した化合物をキャピラリー末端から-30℃程度に冷却された円盤に吹きつけ液化あるいは固化させ、そこに赤外線を当てることでIRスペクトルを得る仕組みになっている。GCの高度な分離能と合わせ、かなり限られた量でのスペクトルの測定が可能である。蛾類の一匹あたりの性フェロモン分泌量は数十から数百ナノグラムであることから、その構造決定に活用可能であることが考えられた。ところで、幼虫が毒刺を持つ害虫として知られているイラガ類で、これまで6種の昆虫において性フェロモンが同定されており、多くが末端に共役ジエン構造を有するタイプ1化合物である。末端共役ジエンの幾何異性体の分離は、強極性のキャピラリーGCカラムでも十分ではないが、(*E*)-体が960 cm^{-1}付近の吸収を示すことから判別することができる。そこで、イラガ類を対象に天然フェロモン成分の構造決定への利用を試みた。

ヒロヘリアオイラガ（*Parasa lepida lepida*）は(*Z*)-7,9-decadien-1-olを分泌することをすでに報告しているが、新たに抽出物をGC-FT-IRで分析したところ、該当する化合物は960 cm^{-1}付近の吸収を示さないことより(*Z*)-体であることが確証できた。一方、イラガ（*Monema flavescens*）においては、GC-EADとGC-MS分析などの結果から、フェロモン腺抽出物にはEAG活性を有する8-decen-1-olと7,9-decadien-1-olの2成分が含まれていることが示されたが、いずれの成分もGC-FT-IRの測定で960 cm^{-1}付近に吸収を示すことより(*E*)-体であることが明らかになった。

本装置の測定領域は4000～700 cm^{-1}であり、残念ながら(*Z*)-体の二重結合の有無を直接示すことはできなかったが、少なくとも800 cm^{-1}以上の領域でのスペクトルがナノグラムオーダーの化合物量で得られることが確認できた。これはGC-MSに匹敵する感度を意味しており、蛾類の性フェロモンの同定に限らず、ある程度の揮発性を有する多くのセミオケミカル（エコロジカル・ボラタイル）の同定・分析に広く活用されるものと考えられる。

GC-FT-IR, nettle moth, pheromone, structure determination, configuration of double bonds

講演番号:3A04p08
講演日時、会場:3月24日15:16～ A校舎04会場

ヤマトシロアリ属兵蟻由来のジテルペンアルコール

Identification of a diterpene alcohol compound of the genus *Reticulitermes* (Rhinotermitidae)

○ Nguyen Trong Tuan、北條賢[1]、竹松葉子[2]、山岡亮平、秋野順治(京工繊大繊維・応生、琉球大農・農林環境[1]、山口大農・生物資源[2])
○ Nguyen Trong Tuan、Masaru Hojo[1], Yoko Takematsu[2], Ryohei Yamaoka, Toshiharu Akino (KIT, [1]RU, [2]YU)

We compared soldier chemicals of *Reticulitermes* species, including *R. speratus speratus*, *R. speratus kyushuensis*, *R. okinawanus* and *R. kanmonensis*. Hexane extracts of each soldier termite was fractionated by silica gel column chromatography, eluted successively with hexane, 5%, 10%, and 50% ether in hexane, and 100% ether. Soldiers of all species and subspecies possessed *beta*-selinene, which was previously reported as a major component of soldier chemicals of *R. speratus*. One additional compound was found in these species and subspecies except *R. okinawanus*. It was eluted in 50% ether fraction, and identified as (E,E)-geranyl linalool, based on comparing retention index and mass spectra with both commercial and synthesized compound. As this diterpnene alcohol was found only in the soldier termites, which are responsible for colony defense, we therefore suppose that it might be a deterrent and a toxin against predators or an alarm pheromone in these species.

Key words: *Reticulitermes*, *beta*-selinene, (E,E)-geranyl linalool

講演番号：3A04p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ A校舎04会場

ヤエヤマサソリ毒液由来殺虫性ペプチドLaIT1のNおよびC末端領域欠損体の合成と毒性評価

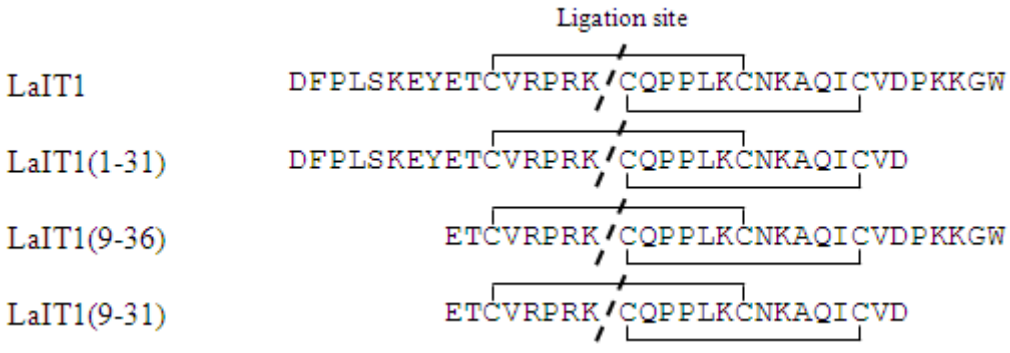
Synthesis and toxicity evaluation of N- or C-terminally truncated analogs of insecticidal peptide LaIT1 from *Liocheles australasiae* scorpion venom

○長尾 淳也、石堂 嵩典、宮下 正弘、中川 好秋、宮川 恒（京大院農・応用生命）
○ Junya Nagao, Takafumi Ishido, Masahiro Miyashita, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa (Kyoto univ)

【目的】サソリ毒液中には様々な生理活性成分が存在し、その多くは各種イオンチャネルに作用する神経毒ペプチドである。我々はこれまでに、日本に生息するヤエヤマサソリの毒液から、昆虫特異的に作用する毒素LaIT1を単離構造決定した。LaIT1は36残基のアミノ酸からなり、ジスルフィド結合を2つもつペプチドで、N末端から13、15残基目のアルギニンが活性発現に重要であることが分かっている。しかし、それ以外のアミノ酸残基の重要性については不明な点が多い。本研究ではLaIT1のN末端およびC末端領域の役割を解明するため、一方または両方が欠損したLaIT1類縁体を合成し、その殺虫活性を測定した。

【方法】LaIT1類縁体の合成は、ペプチドフラグメント縮合法の一つであるNative Chemical Ligation (NCL) 法を用いて行った。まず、C末端側フラグメントとしてLaIT1の17-31残基および17-36残基からなるペプチドを、また、N末端側フラグメントとして9-16残基および1-16残基からなるペプチドチオエステル前駆体をそれぞれFmoc固相合成法によって調製した。次にこれらの各フラグメントを、4-メルカプトフェニル酢酸を含む水溶液中で縮合させ、直鎖状ペプチドを得た。さらに、空気酸化によりジスルフィド結合を形成させ、HPLCにより精製を行った。それぞれの類縁体は注射法によってコオロギに投与し、殺虫活性を評価した。

【結果】いずれの欠損体も、直鎖状ペプチドを空気酸化すると、天然型LaIT1とは異なるジスルフィド結合様式をもつペプチドが多く得られた。同様の方法で全長LaIT1を合成する際には、これらは全く生成しないことから、両末端領域はLaIT1のジスルフィド架橋構造の形成に寄与していると考えられた。また、天然型架橋様式をもつそれぞれの欠損体について殺虫活性を測定したところ、著しい活性の低下が見られた。このことからLaIT1の末端領域は活性発現においても重要な役割を果たすことが示唆された。



scorpion toxin, Native Chemical Ligation, insecticidal activity

講演番号：3A04p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ A校舎04会場

ヤエヤマサソリ毒液由来殺虫性ペプチドLaIT1の溶液構造と活性発現に重要な部位

Solution structure and bioactive surface of an insecticidal toxin LaIT1 from the venom of scorpion *Liocheles australasiae*

○宮下 正弘、堀田 彰一朗[1]、宮川 拓也[1]、中川 好秋、永田 宏次[1]、田之倉 優[1]、宮川 恒（京大院農・応用生命、[1]東大院農生科・応生化）

○Masahiro Miyashita, Shoichiro Horita[1], Takuya Miyakawa[1], Yoshiaki Nakagawa, Koji Nagata[1], Masaru Tanokura[1], and Hisashi Miyagawa (Kyoto Univ., [1]Univ. of Tokyo)

【目的】LaIT1はヤエヤマサソリ毒液から単離されたペプチド毒素であり、昆虫特異的な毒性を示す。LaIT1は36残基からなるが、類似配列を有するペプチドがほとんど存在しない。また、他の多くのサソリ毒素とは異なり、２つしかジスルフィド結合を持たない。これらの構造的特徴から、LaIT1は独特の立体構造を有していることが予想された。そこで、本研究ではLaIT1の立体構造と活性発現に重要な部位を明らかにすることを目的として、NMR解析による溶液構造の決定を行った。

【方法および結果】^{13}Cならびに^{15}Nによってラベルした LaIT1を、大腸菌発現系を用いて作製した。チオレドキシンならびにHisタグを融合させたLaIT1（Trx-His_6-LaIT1）をコードするベクターを大腸菌に導入し、[^{13}C]グルコースおよび[^{15}N]塩化アンモニウムを含むM9培地で培養して発現を誘導した。得られたTrx-His_6-LaIT1を、エンテロキナーゼ処理してチオレドキシンならびにHisタグを除去した後、陽イオン交換カラムを用いて精製した。得られたLaIT1を異種核3次元NMR測定に供し、観測可能な主鎖原子と側鎖原子の化学シフトをすべて帰属した。さらに、観測された299のNOEに基づく距離制限、２つのジスルフィド結合による制限、２つの水素結合による制限を用い、LaIT1の立体構造を計算によって求めた。その結果、LaIT1はinhibitory cystine knot（ICK）モチーフと類似した構造を持つことが明らかとなった。ICKモチーフを持つ生理活性ペプチドとして、プロテアーゼ阻害剤やイオンチャネルブロッカーなど多数知られているが、これらはいずれも３つ以上のジスルフィド結合を含んでいる。これらと比較すると、LaIT1にはN末端領域を中央のβシート領域に固定化するジスルフィド結合が欠損しており、他のICKペプチドとは異なる要因によってN末端領域の構造が安定化されていることが示唆された。また、これまでのアラニン置換体による構造活性相関研究から、13および15番目のアルギニン残基が活性発現に重要であることが分かっているが、この２つの残基とそれを囲むように存在する疎水性残基からなる分子表面が活性発現に寄与していることが示唆された。

Scorpion toxin, Heteronuclear 3D NMR, Inhibitory cystine knot motif

講演番号：3A04p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ A校舎04会場

マダラサソリ毒液由来殺虫性ペプチドIm-3の配列同定とその毒性評価

Characterization of sequence and toxicity of Im-3 derived from the venom of *Isometrus maculatus*

○河内　智行、宮下　正弘、中川　好秋、宮川　恒　（京大院農・応用生命）
○Tomoyuki Kawachi, Masahiro Miyashita, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa (Kyoto Univ.)

【目的】サソリ毒液には殺虫性毒素を含む多数のペプチドが存在しており、その多くはイオンチャネルを標的とした神経毒素である。マダラサソリ(*Isometrus maculatus*)は日本の八重山諸島などに生息しており、Buthidae科に属する。この科に属するサソリの毒液からは、高い殺虫活性をもつペプチド毒素が多く発見されていることをふまえ、本サソリ毒液に含まれている毒素の単離・同定を進めた結果、これまでに殺虫性ペプチドIm-1、Im-2の同定に成功した。本研究では、さらに探索を進め、得られた毒素の配列解析とその毒性の評価を行った。
【方法および結果】石垣島にて採集したマダラサソリを用いて実験を行った。採取した雌サソリ毒液を逆相HPLCにより20画分に分け、コオロギを用いた殺虫試験を行った。活性が認められた3画分のうち、Im-1およびIm-2を含むもの以外の1画分について、逆相HPLCによる精製を進めた。その結果、質量6894のペプチド(Im-3)がこの画分の活性本体であることが分かった。Im-3のアミノ酸配列をエドマン分解法と質量分析法によって決定したところ、63残基から構成され、ジスルフィド結合を4つ含むことが明らかとなった。この配列について相同性検索を行った結果、BjIT2およびBsIT4と呼ばれるペプチドと類似性を示した。これらのペプチドはいずれもButhidae科サソリ由来の抑制性昆虫神経毒素であり、ナトリウムチャネルに作用する毒素に分類されている。１頭あたり１μgのIm-3をコオロギおよびマウスに注射法によって投与した結果、コオロギに対して顕著な毒性を示す一方、マウスに対しては異常を示さなかった。このことから、Im-3は昆虫に選択的に作用を示す毒素であることが推測された。

scorpion toxin, sequence analysis, insecticidal activity

講演番号：3A04p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ A校舎04会場

タイトル：アメリカザリガニの外骨格に含まれるキチンに強固に結合しているタンパク質の構造・機能解析

Title： Structural and functional analyses of a protein strongly bound to chitin in the exoskeleton of *Procambarus clarkii*.

○鈴木道生、杉坂亜里沙[1]、小暮敏博、長澤寛道[1]（東大・院理、[1]東大・院農）

○Michio Suzuki, Arisa Sugisaka, Toshihiro Kogure, Hiromichi Nagasawa (Univ. of Tokyo)

【目的】アメリカザリガニの外骨格はキチンとタンパク質を主体とする有機物と非晶質の炭酸カルシウムから成る。炭酸カルシウムの沈着（石灰化）には、そこに含まれるタンパク質が重要な役割を果たしていると考えられているが、その全体像は未だ明らかになっていない。われわれはこれまで、酢酸可溶性およびSDS可溶性タンパク質の単離・精製、構造・機能解析を行ってきた。本研究では、アメリカザリガニの外骨格に含まれるタンパク質のうち、キチンと極めて強固に結合しているタンパク質の同定を試み、構造・機能解析を行った。

【方法】外骨格を酢酸で脱灰して残った不溶物をSDS/DTT溶液で繰り返し加熱抽出し、その残渣を得た。この残渣に含まれる、キチンに強固に結合していると考えられるタンパク質の部分配列を取得し、それを基にcDNAをクローニングすることによって、そのタンパク質の全アミノ酸配列の情報を得た。この配列から、大腸菌発現系を用いて全長、配列前半部、配列後半部の組換え体タンパク質を作製し、それぞれについてキチン結合活性の比較を行った。

【結果】外骨格のSDS不溶性画分をトリプシンで処理し、可溶化した消化産物を逆相HPLCで分離することによって配列解析が可能な3つの断片を得た。それらの断片のアミノ酸配列を元に縮重プライマーを設計し、3’-RACEおよび5’-RACEを行うことにより、タンパク質をコードするcDNAの全長を得た。ORFはシグナルペプチド（15残基）とタンパク質（140残基）をコードしていた。この配列の中央部にはキチンと結合する保存領域であるRebers-Riddiford配列を有していた。この配列はアメリカザリガニのCasp-2およびアオガニのCP14.1タンパク質と高い相同性を示した。また、不溶性画分をエンドプロテイナーゼAsp-Nで消化し、そこから得られた断片について配列解析を行ったところ、トリプシン消化で得られた断片とほぼ同じ箇所の部分配列が得られたのみであった。タンパク質側からの配列解析ではN末端に近い配列が得られなかったことから、この部分においてキチンと共有結合を含む強い結合様式でキチンに結合している可能性が高いと考えられた。そこで、キチンに結合する活性を有する領域を明らかにするために、配列の全長、前半部および後半部の組換え体タンパク質を作製し、各組換え体タンパク質についてキチン結合活性の強さを明らかにし、比較を行っているところである。

calcification, chitin, crustacean

講演番号:3A04p13
講演日時、会場:3月24日16:21～ A校舎04会場

アコヤガイ真珠層由来の基質タンパク質Pif 80におけるアラゴナイト結合部位の探索

A search for the critical domain for aragonite binding in Pif 80, a matrix protein derived from the nacreous layer of *Pinctada fucata*

○三木　匠、鈴木　道生[1]、宮部　耕成、長澤　寛道（東大院農生科・応生化、[1]東大院理・地球惑星）

○Takumi Miki, Michio Suzuki[1], Kosei Miyabe, Hiromichi Nagasawa (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo; [1]Graduate School of Science, The University of Tokyo)

【目的】アコヤガイ(*Pinctada fucata*)は日本における真珠養殖に用いられる貝であり、その貝殻は内側の真珠層と外側の稜柱層の二層構造をとる。真珠層は炭酸カルシウム結晶多形のうち準安定であるアラゴナイト単結晶が積み重なった構造をとり、稜柱層は炭酸カルシウム結晶多形のうち最安定であるカルサイト多結晶が集まった構造をとる。またアコヤガイ貝殻中には少量の有機基質が含まれており、この有機基質がアコヤガイ貝殻形成を制御する上で重要であることが知られている。以前、真珠層形成に関与する基質タンパク質としてアコヤガイ真珠層の酢酸不溶性/SDS可溶性画分からPif 80が同定された。Pif 80にはアラゴナイト特異的結合活性があり、この活性が真珠層形成を制御する上で非常に重要であると考えられる。そこで本研究では、Pif 80の配列の中のアラゴナイト結合部位の同定を目的とした。
【方法】アコヤガイPif 80アミノ酸配列中でアコヤガイ近縁種Pif 80ホモログにおいて保存性が高い領域をs1、s2（s2-1、s2-2)とし、これらの領域の組換えタンパク質を大腸菌発現系により作製し、精製した。またアコヤガイPif 80アミノ酸配列中に存在する繰り返し配列を含む領域をs3とし、この領域の組換えタンパク質も同様に作製、精製した。これらの組換えタンパク質をアラゴナイト、カルサイトと別々にインキュベートし、水、0.1 M 塩化ナトリウム水溶液、0.5 M 塩化ナトリウム水溶液および0.5 M EDTAを用いて順次タンパク質を溶出し、これらをSDS-PAGEに供することでアラゴナイト、カルサイトに対する結合能を評価した。
【結果】組換えタンパク質s1、s2-1、s2-2はアラゴナイト、カルサイト両方に結合した。またs2-1、s2-2についてはカルサイトとインキュベートした場合、水溶出画分にもタンパク質の一部が回収されたことからカルサイトよりもアラゴナイトに強く結合することが示唆された。組換えタンパク質s3については作製、精製を行い、現在結合能を調べている。また、アラゴナイト、カルサイトに対する結合能の違いをより定量的に評価する新たな系の構築を行っている。

biomineralization, *Pinctada fucata*, nacreous layer

講演番号:3A04p14
講演日時、会場:3月24日16:32～ A校舎04会場

造礁サンゴの骨格タンパク質galaxin由来の組換えタンパク質を用いた機能解析

Functional analysis of recombinant proteins derived from galaxin, a reef-building coral exoskeletal protein

○川崎麻哉子、遠藤博寿、長澤寛道（東大院農生科・応生化）
○Mayako Kawasaki, Hirotoshi Endo, Hiromichi Nagasawa (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

【目的】造礁サンゴは、炭酸カルシウムを主体とした骨格を形成する。しかし、これらのサンゴ骨格の形成に関する分子機構についての知見は乏しく、特にサンゴの外骨格のタンパク質に関しては現時点で全長の配列決定がなされているのはアザミサンゴ(*Galaxea fascicularis*)から抽出されたgalaxinのみである。Galaxinは、約30残基からなるunitが10個直列に並んだ構造を有する（以下、U1～U10と表記する)。さらに、それぞれのunitには連続する２つのシステイン残基が２か所ずつ含まれるという非常に特徴的な配列を有している。そこで、本研究では大腸菌発現系を用いて調整したgalaxinの組換えタンパク質を用いて、骨格形成におけるその役割を推定することを目的とした。
【方法・結果】アザミサンゴ成体からRT-PCRによりgalaxinをコードするORF全長を含むcDNAを単離した。次に、galaxin の成熟タンパク質の全長、および10回繰り返し配列のうち、U1-3, 1-6をGST融合タンパク質として発現させたところ、成熟タンパク質全長は不溶性画分に、U1-3, 1-6は可溶性画分に発現した。精製したGST融合タンパク質をプレシジョンプロテアーゼを用いてタグを除去した後、逆相HPLCを用いて目的のフラグメントの精製を試みたが、分取したいずれのピークにもgalaxinのフラグメントは見出せなかった。そこで、MBPタグを用いて成熟タンパク質全長を再度発現させたところ、可溶性画分に発現させることに成功した。精製したMBP融合タンパク質をFactor Xaを用いてタグの除去を行い、HPLCに供して目的の組換えタンパク質を分取した。得られた組換えタンパク質を用いて炭酸カルシウム結晶(アラゴナイトおよびカルサイト)への結合能を評価した結果、galaxinはアラゴナイトとカルサイト両方へのアフィニティを有することが示唆された。現在、さらにgalaxinの機能解析を進めるために組換えタンパク質を用いた*in vitro*での炭酸カルシウム結晶形成実験、およびキチン結合実験を行っている。

Keywords: biomineralization, coral, galaxin

講演番号:3A04p15
講演日時、会場:3月24日16:43～ A校舎04会場

アコヤガイの殻皮タンパク質の分子生物学的解析

Molecular biological analyses of periostracum proteins of the pearl oyster *Pinctada fucata*

○中山 誠志、鈴木 道生[1]、遠藤 博寿、青木 秀夫[2]、木下 滋晴[3]、渡部 終五[3]、長澤 寛道（東大院農生科・応生化、[1]東大院理・地球惑星、[2]三重県水産研、[3]東大院農生科・水生科）

○Seiji Nakayama, Michio Suzuki[1], Hirotoshi Endo, Hideo Aoki[2], Shigeharu Kinoshita, Shugo Watabe and Hiromichi Nagasawa (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo; [1]Graduate School of Science, The University of Tokyo; [2]Mie Prefecture Fisheries Research Institute; [3]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

【目的】真珠養殖に利用されるアコヤガイ(*Pinctada fucata*)の貝殻は二層構造をとり、各層は異なる結晶多形、微細構造をもつ。このうち外側の層である稜柱層は、殻皮(periostracum)という非細胞性の膜状組織と接した空間で形成されるため、この殻皮が稜柱層形成に何らかの役割を果たしていると考えられるが、これまで殻皮について生化学的・分子生物学的な研究はほとんどなされていない。そこで本研究では、アコヤガイの殻皮から、稜柱層の形成に関わるタンパク質を探索することを目的とした。

【方法・結果】アコヤガイ体液の上清、沈殿、稜柱層、真珠層、及び殻皮からSDS/DTT溶液を用いてタンパク質を抽出しSDS-PAGEに供したところ、10 kDa付近に殻皮特異的と考えられるバンドを見出した。二次元電気泳動の結果、10 kDa付近には複数のスポットが確認されたため、これらのバンド、スポットについてN末端及び内部アミノ酸配列を取得した。次に、得られた配列を用いてESTデータのBLAST検索を行い、2つの主要なcDNA配列断片を取得した。それらを*PPP*(*P*inctada *P*eriostracum *P*rotein)*-1, -2*と命名し、cDNAクローニングによって全塩基配列を取得した。これらの遺伝子についてRT-PCRを用いた組織別発現解析を行った結果、*PPP-1, -2*共に外套膜の縁辺部で特異的に発現シグナルが確認された。現在、組換えタンパク質を用いたキチン結合能の解析、及び*in situ*ハイブリダイゼーションによる発現細胞の同定を行っている。

biomineralization, *Pinctada fucata*, periostracum

講演番号:3A04p16
講演日時、会場:3月24日16:54～ A校舎04会場

ミッドカイン(MK)を指標とした抗腫瘍活性スクリーニング～海洋天然物ライブラリを用いて～

Antitumor screening as indicator of the MK activity, using a natural resources library.

○祖納元 りえ、山城知佳、髙石 花蓮[1]、金本 昭彦[2]、石見 盛太[2]、池松 真也
(沖縄高専専攻科生物資源工学コース、[1]神戸大・理、[2]OPバイオファクトリー株式会社)
○Rie SONAMOTO, Chika YAMASHIRO, Karen TAKAISHI[1], Akihiko KANAMOTO[2], Morita IWAMI[2], Shinya IKEMATSU (Okinawa National College of Technology Bioresource engineering, [1]KOUBE university, [2]OP BIO FACTORY CO., ltd.)

【目的】本研究で指標とするミッドカイン(MK)は多くの癌で広く発現しているタンパク質である。癌の発生・進展に関与し、生存・移動も促進していると考えられている。MKは初期の癌から強い発現が見られ、進行癌でも比較的発現が高い。癌の進行度とMKの発現量は相関していると考えられ、腫瘍マーカーとしての用途が期待されている。そのため本研究では沖縄近海で採取される海洋資源700種類のライブラリ成分中に含まれる抗腫瘍活性成分の探索と特定を目的とし、癌細胞で分泌されるMK量を指標にスクリーニングを行った。本研究の特徴は、sampleの一時的な添加において、MK量の発現を抑えながらも細胞毒性を示さない成分を探索する点にある。細胞毒性を示さない成分を探索することは、副作用の少ない抗腫瘍活性成分を探索することに繋がると考え、スクリーニングの判定基準にMK発現量と併せて設定した。今後、抗腫瘍活性が期待できる8sampleを分画し、抗腫瘍活性成分分子の特定と構造決定を行う。
【方法】神経芽腫由来SK-N-SH細胞が分泌するMK量を指標に2段階のスクリーニングを行う。1段階目のスクリーニングは、N=1で行いSK-N-SH細胞培養24時間後に海洋資源由来天然物ライブラリのsampleを添加し、sample添加24時間後・48時間後の培養上清を回収した。回収した上清をMK-ELISA(酵素結合免疫吸着法)にてMK量を測定した。MK量測定結果より以下の2点を判断基準に用いた。『A) sampleのMK量が24時間から48時間と経時的に減少している B) 24時間・48時間共にMK量が control(sampleを加えていない培養上清)の半分以下に減少している』これらA・Bのどちらかを満たしているsampleは抗腫瘍活性が期待できるsampleとして2段階目のスクリーニングを行うとした。2段階目のスクリーニングはN=5で行い、1段階目と同じ操作に加え、上清回収後に残りの培養上清にWST-1を添加し細胞活性の測定を行った。MK量・細胞活性測定結果により、細胞当たりのMK分泌量(MK量/細胞活性測定値)を求めた。細胞当たりのMK分泌量がA・Bどちらかをみたし、かつ細胞活性が24時間から48時間へ増加しているsampleを抗腫瘍活性が期待できるsampleとみなした。
【結果】1段階目のスクリーニングにより判定基準を満たしたsampleは700sample中71sampleあり、判定基準を満たしたsampleを2段階目のスクリーニングにかけ、さらに判定基準を満たしたsampleは71sample中8 sampleあった。抗腫瘍活性が期待される8 sampleは海綿動物、棘皮動物、刺胞動物に分類される海洋資源であった。今後、特定した8sampleを抗腫瘍活性が期待できる成分まで分画し、抗腫瘍活性成分分子の特定後、構造決定を行う。

Midkine(MK), antitumor, screening of natural resources,

講演番号:3A04p17
講演日時、会場:3月24日17:05～ A校舎04会場

淡水産貝類のカロテノイド分析

Analysis of Carotenoids in freshwater shellfish

○越智淳子[1)]、眞岡孝至[2)]、森 美穂[1)]、坂上吉一[1)]
（[1)]近畿大院・農、[2)]財団法人生産開発科学研究所）
○Junko Ochi[1)], Takashi Maoka[2)], Miho Mori[1)], Yoshikazu Sakagami[1)]
([1)]Kinki University, [2)]Research Institute for Production Development)

【背景・目的】　動植物や微生物に含まれる色素としてカロテノイドが知られている。植物と微生物以外の生物はカロテノイドを生産できないと考えられており、動物に含まれるカロテノイドは食物由来である。水産動物は、海産動物と淡水産動物に分類され、これまでにマガキやアサリなどの海産動物のカロテノイドについては多々報告されている。しかしながら、淡水産動物については詳細な報告がなされていない。本研究では淡水産動物の中でも、食物連鎖において一次捕食者となる貝類に焦点をあて、カロテノイド分析を行い、それらの食性についても合わせ考察した。
【方法と結果】　淡水産二枚貝 2 種（イシガイ、ヌマガイ）と淡水産巻貝 2 種(マルタニシ、カワニナ)の各可食部から、アセトンでカロテノイド成分を抽出した。ロータリーエバポレーターで試料溶液を 5 mL まで濃縮し、カロテノイドの同定・定量を実施した。結果、淡水産二枚貝 2 種からは Diatoxanthin および Fucoxanthin を主とする同様のカロテノイドが検出され、珪藻由来の食物源であることが示された。淡水産巻貝 2 種からはマルタニシで 9 種、カワニナで 14 種類のカロテノイドが検出され、2 種間でのカロテノイド成分が大きく異なったことから、食性が異なる可能性が示唆された。

Key words: carotenoids, shellfish, feeding habit

講演番号：3A05a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ A校舎05会場

新規ヒスチジンキナーゼ阻害剤signermycin Bの作用機構

The mode of action of signermycin B, a novel inhibitor of a histidine kinase

○木野 弘量、渡邊 崇史、五十嵐 雅之[1]、岡島 俊英[2]、梅北 まや[1]、波多野 和樹[1]、石井 英治、江口 陽子、内海 龍太郎（近大院・農・バイオ、[1]微化研、[2]阪大・産研）

○Hirokazu Kino, Takafumi Watanabe, Masayuki Igarashi, Toshihide Okajima, Maya Umekita, Kazuki Hatano, Eiji Ishii, Yoko Eguchi, Ryutaro Utsumi(Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Agric., Kinki Univ., [1]Microb., Chem., Inst., [2]Inst. of Scientific and Industrial Res., Osaka Univ.)

【目的】細菌情報伝達、二成分制御(TCS)系を構成するヒスチジンキナーゼ(HK)阻害剤の探索は、主として、合成化合物ライブラリーを用いて、行われてきた。そのようなHK阻害剤は、特定した作用点を示さず、いまだ選択的な阻害剤は報告されていない。我々は、生研センター異分野支援事業として、土壌放線菌を用いた天然抽出物(10,000検体)を用い、黄色ブドウ球菌 (MRSA)、腸球菌 (VRE)、枯草菌等のグラム陽性菌の細胞壁合成制御を担うTCS, WalK(HK)/WalR(RR)のWalK阻害剤としてsignermycin Bを見出した。signermycin Bはテトラミン酸とデカリン酸骨格からなる化合物(分子量390)で、WalKを阻害(IC50:60 μM)して、多剤耐性MRSAやVREに対しても抗菌性(MIC:3-6 μg/ml)を示した。本研究では、多剤耐性菌に対する有効な分子標的剤の開発研究として、signermycin BのWalKの標的部位も含め、詳細な作用機構研究を行った。

【方法】signermycin BのWalKへの特異性を評価するために、枯草菌体内でWalK,WalRを過剰発現させ、signermycin Bに対する感受性の差を比較した。WalKに対する二量体化阻害を確認するために、WalK自己リン酸化阻害実験をクロスリンカー（グルタルアルデヒド）存在下で行った。さらに、signermycin BがWalKのどのドメインに結合するかを表面プラズモン共鳴法（SPR）による相互作用解析によって解明した。signermycin BによるWalK/WalR制御下遺伝子の発現に及ぼす影響をリアルタイムPCR法により解析を行った。

【結果】最初に、枯草菌体内でWalKとWalRをそれぞれ、過剰発現させたとき、WalK過剰発現時のみsignermycin Bに対して耐性を示した。[γ^{32}P]ATPとクロスリンカーを用いて、自己リン酸化阻害実験において、リン酸化されたWalKはクロスリンカー添加によって、二量体化したが、先にシグナマイシン処理をしておくと、クロスリンカーによる二量体化は阻害された。WalK二量体形成ドメインとATP結合ドメインを用い、SPR解析を行なった結果、WalK二量体形成ドメインに特異的にsignermycin Bは結合することが明らかとなった。最後に、遺伝子の発現解析を詳細に行った結果、signermycin B がWalK/WalRによる*walR*レギュロン遺伝子の発現を強く阻害していることが判明した。これらの結果は、WalK欠損により、予想される遺伝子発現プロファイルと一致した。これらの結果から、signermycin BはWalK二量体形成ドメインに結合し、WalK自己リン酸化を阻害し、そのことによりWalK/WalR制御下遺伝子発現を選択的に抑制し、細胞分裂抑制と細菌致死効果を示すことが明らかになった。

Two-component system, Antibacterial agent, Multi drug resistance

講演番号：3A05a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ A校舎05会場

増殖に必須なレスポンスレギュレーターWalRに対する阻害剤walrycin Bの作用機構解析

Mode of action of walrycin B targeting the essential WalR response regulator

平井　有紀、○吉岡　誠訓、土井　章弘、後藤　恭宏、岡島　俊英[1]、内海　龍太郎（近畿大院・農・バイオ、阪大・産研）
Yuki Hirai, ○Akinori Yoshioka, Akihiro Doi, Yasuhiro Gotoh, Toshihide Okajima[1], Ryutaro Utsumi (Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Agric, Kinki Univ., [1]Osaka Univ.)

【目的】近年、抗菌剤の多用により、複数の抗菌剤に耐性を持つ多剤耐性菌が出現している。そのため、多剤耐性菌にも効果がある新規抗菌剤を開発することが急務となっている。そこで、我々は、細菌の情報伝達系である二成分制御系（TCS）に着目した（1, 2)。その中でも、枯草菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）等の多剤耐性菌を含む、低G+Cグラム陽性菌に広く保存されている、細菌の増殖に必須な、細胞壁代謝に関与する二成分制御系WalK/WalRに着目した。このうち、レスポンスレギュレーターであるWalRを標的とした阻害剤の選択的スクリーニング法であるHD法により、WalR阻害剤walrycin Bが単離された（3)。本研究では、WalK/WalRのWalRを特異的に阻害するwalrycin Bの作用部位を解析することを目的とした。
【方法】枯草菌、MRSAにおいて、対数増殖期における、walrycin Bの存在下でのWalR制御遺伝子群の転写量を、リアルタイムPCR法により定量化することによって、WalRへの阻害効果を調べた。また、WalRは、細胞壁代謝に関わるTCSであるため、walrycin Bの添加による細胞増殖、分裂に及ぼす影響を検討した。さらに、WalRとwalrycin Bとの結合部位を特定するため、表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いてWalRとwalrycin Bとの相互作用を検討した。
【結果】定量的リアルタイムPCRの結果、黄色ブドウ球菌においては*isaA*や*ssaA*、枯草菌においては*yocH*や*yoeB*、*yjeA*などのWalR制御遺伝子の発現においてのみ、walrycin Bによる転写制御阻害が見られた。また、walrycin Bによる細胞形態への影響を検討した結果、walrycin B添加の影響により、枯草菌では細胞のフィラメント化、黄色ブドウ球菌では細胞の凝集化が観察された。これは、細胞壁代謝を制御しているWalK/WalRの機能を抑制した場合の表現型と一致している。また、SPRの結果、walrycin BはWalRと相互作用することが示され、WalRの二量体形成ドメインに作用することが示唆された。

1) 内海龍太郎, 五十嵐雅之, 日本薬学会誌, 病原細菌に対する新しい薬剤標的―二成分情報伝達システム 132, 1-8 (2012)
2) Gotoh Y. and Eguchi Y. et al., Curr. Opin. Microbiol., 13, 232-239 (2010).
3) Gotoh Y. et al., J. Antibiotics, 63, 127-134 (2010).

Two component system, MRSA, Antibacterial agent

講演番号：3A05a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ A校舎05会場

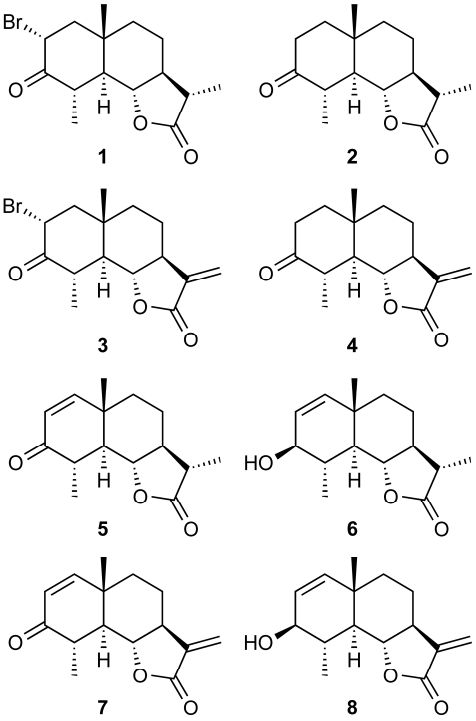
オイデスマン誘導体は転写因子 NF-κB シグナル伝達経路において複数のステップを阻害する

Eudesmane-type sesquiterpene lactones inhibit multiple steps in the NF-κB signaling pathway

○田村 隆一[1]、陳 燕傑[2]、篠崎 美和子[3]、荒尾 圭[4]、王　麗艶[4]、唐　万侠[4]、平野 誠也[5]、小倉 弘嗣[2]、満井 智和[2]、竹谷 茂[1]、安東 政義[3]、片岡 孝夫[1,2]（[1]京工繊大院・応生、[2]東工大・バイオセ、[3]新潟大・工、[4]新潟大院・自然科学、[5]京工繊大・応生）

○Ryuichi Tamura[1], Yanjie Chen[2], Miwako Shinozaki[3], Kei Arao[4], Liyan Wang[4], Wanxia Tang[4], Seiya Hirano[1], Hirotsugu Ogura[2], Tomokazu Mitsui[2], Shigeru Taketani[1], Masayoshi Ando[3], Takao Kataoka[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech., [2]CBRI, Tokyo Tech., [3]Dept. Chem. Chem. Eng., Niigata Univ., [4]Grad. Sch. Sci. Tech., Niigata Univ.)

【目的】多くの植物に含まれているセスキテルペンラクトンは、多彩な生物活性を有している。我々は、グアイアン(guaiane)骨格やオイデスマン(eudesmane)骨格を有するセスキテルペンラクトンを合成し、その生物活性について研究を行ってきた。その結果、α-ブロモケトン構造やα-メチレン-γ-ラクトン構造を有するオイデスマン誘導体が炎症性サイトカインであるIL-1やTNF-αによるNF-κBの核移行を阻害することを見出した。さらに、α-ブロモケトン構造をもつ(11*S*)-2*α*-bromo-3-oxoeudesmano-12,6*α*-lactone（**1**）がTNF-αによって誘導されるNF-κBサブユニットp65の核移行を阻害するが、その変異型p65(C38S)の核移行を阻害しなかったことから、オイデスマン誘導体のターゲット分子の一つが少なくともNF-κBサブユニットp65であることを明らかにした。今回、**1**を含む8種類のオイデスマン誘導体を合成し、NF-κBシグナル伝達経路に対する作用を検討したので報告する。



【方法】ヒト肺がん腫由来A549細胞を**1**～**8**で前処理し、IL-1またはTNF-αで刺激した。NF-κBシグナル伝達経路の重要なステップであるIκBαのリン酸化および分解、もしくはNF-κBの核移行について、特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングを用いて解析した。

【結果】**1**、**3**、**4**、**7**、**8**はIL-1およびTNF-αの誘導するNF-κBの核移行を抑制したが、**2**、**5**、**6**はいずれも抑制しなかった。**5**は、IL-1やTNF-αによる遺伝子の発現誘導を抑制したことから、**5**はNF-κBの核移行より下流の段階を阻害することが明らかになった。さらに、**3**、**4**、**7**は、IL-1およびTNF-αの誘導するIκBαのリン酸化と分解を抑制した。しかしながら、**1**はIL-1によるIκBαのリン酸化と分解のみを抑制し、**8**はIL-1やTNF-αによるIκBαのリン酸化と分解をいずれも抑制しなかった。以上の結果から、オイデスマン誘導体は、分子構造のわずかな違いにより、NF-κBシグナル伝達経路において異なるステップを阻害することが明らかになった。

Inflammatory cytokine, Nuclear factor κB, Sesquiterpene lactone

講演番号：3A05a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ A校舎05会場

TNFレセプター1のシグナル伝達経路に対するタンパク質合成阻害剤の作用機序の解析

Mechanism of action of translation inhibitors on TNF receptor 1-mediated signaling pathway

○平野　誠也[3]、山田　有理子[1]、長田　裕之[2]、竹谷　茂[1]、片岡　孝夫[1]（[1]京工繊大院・応生、[2]理研基幹研・ケミカルバイオロジー、[3]京工繊大・応生）

○Seiya Hirano[1], Yuriko Yamada[1], Hiroyuki Osada[2], Shigeru Taketani[1], Takao Kataoka[1]（[1]Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech., [2]Chem. Biol., RIKEN ASI）

【目的】真核生物において、多くのタンパク質合成阻害剤は、シグナル伝達経路や細胞機能に対する翻訳の役割を評価するためのバイオプローブとして広く用いられている。数種類のタンパク質合成阻害剤は、翻訳反応を直接阻害するだけでなく、MAPキナーゼスーパーファミリーの活性化を誘導するリボトキシックストレス応答を誘導することが知られている。我々は、これまでに、アニソマイシン、グルタールイミド系化合物アセトキシシクロヘキシミド、トリエン-アンサマイシンン系化合物マイコトリエニンIIを含む数種類のタンパク質合成阻害剤がIL-1αによる細胞接着因子ICAM-1（intercellular adhesion molecule-1）の発現誘導に比較して、TNF-αによるICAM-1の発現誘導を選択的に阻害すること、並びにアセトキシシクロヘキシミドがERKとp38 MAPキナーゼを強力に活性化し、その活性化を介してTNFレセプター1のエクトドメインシェディングを誘導することを見出した。今回、我々は、トリエン-アンサマイシン系化合物サイトトリエニンA及びトリコセテン系化合物デオキシニバレノールがTNF-αによるICAM-1発現誘導を選択的に阻害することを見出したので、これらのタンパク質合成阻害剤のTNFレセプター1のシグナル伝達経路に対する作用機序を報告する。

【方法】ヒト肺がん腫由来A549細胞をサイトトリエニンAまたはトリコセテン系化合物で1時間前処理した後、炎症性サイトカインであるIL-1αもしくはTNF-αで刺激した。Cell ELISA法で細胞表面のICAM-1の発現量を測定し、MTT法で細胞生存率を調べた。また、NF-κBシグナル伝達経路に関与する様々なタンパク質の発現量に対する影響を特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングを用いて解析した。

【結果】TNF-αによるICAM-1の発現誘導に対するサイトトリエニンAの選択的阻害、並びにサイトトリエニンAによるTNFレセプター1のエクトドメインシェディングは、MEK阻害剤U0126とp38 MAPキナーゼ阻害剤SB203580により抑制されたが、JNK阻害剤SP600125では抑制されなかった。したがって、サイトトリエニンAはERKとp38 MAPキナーゼの活性化を介してTNFレセプター1のエクトドメインシェディングを誘導することが明らかになった。一方、トリコセテン系化合物デオキシニバレノールはIL-1αに比べて、TNF-αによるICAM-1の発現誘導を選択的に阻害した。その構造類縁体である3-アセチルデオキシニバレノールは、TNF-αによるICAM-1の発現誘導に対して選択的な阻害を示したが、その阻害濃度は10倍程度高く、T-2トキシンやベルカリンでは、選択的阻害がまったく観察されなかった。以上の結果より、特定のトリコセテン系化合物のみがTNFレセプター1によるICAM-1の発現誘導やシグナル伝達経路を選択的に抑制していることが明らかになった。

Cytotrienin A, Deoxynivalenol, TNF receptor 1

講演番号：3A05a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ A校舎05会場

炎症性サイトカインによるNF-κBシグナル伝達経路と遺伝子発現に対するキナクリンの作用機序の解析

Mechanism of action of quinacrine on the NF-κB signaling pathway and gene expression induced by inflammatory cytokines

○森元　今日子、竹谷　茂、片岡　孝夫（京工繊大院・応生）
○Kyoko Morimoto, Shigeru Taketani, Takao Kataoka (Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech.)

【目的】キナクリンは、アミノアクリジン誘導体の一つであり、古くから抗マラリア薬として広く利用されている。また、キナクリンは、DNAインターカレーターとしての作用だけでなく、種々の細胞内情報伝達経路に対する作用も報告されており、これらの生物活性から炎症性疾患やがんに対する治療薬としても期待されている。我々は、キナクリンが炎症性サイトカインによる細胞接着因子ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)の発現誘導を阻害することを見出し、幾つかのヒトがん細胞株を用いてキナクリンの作用機序を解析してきた。その結果、キナクリンが、TNF-αによるICAM-1の発現誘導を阻害するが、その作用点ががん細胞株によって異なることを見出した。本研究では、NF-κBシグナル伝達経路と遺伝子発現に対するキナクリンの作用機序について検討した。

【方法】ヒト肺がん腫 A549 細胞、ヒト繊維肉腫 HT1080 細胞、ヒト乳がん腫 MCF7 細胞をキナクリンで 1 時間前処理し、TNF-α存在下で 6 時間培養した。Cell ELISA 法により細胞表面の ICAM-1 の発現量を測定し、MTT 法および LDH 法により細胞生存率を調べた。また、キナクリンの転写レベルでの影響を調べるため、キナクリンで 1 時間前処理した後、TNF-α存在下で 4 時間培養し、定量 PCR 法を用いて NF-κB 応答性遺伝子である *ICAM-1* 遺伝子の発現解析を行った。さらに、NF-κB のサブユニットである p65 およびリン酸化 p65 に対する特異的抗体を用いて、p65 のリン酸化および核移行に対するキナクリンの作用をウェスタンブロッティングにより調べた。

【結果】キナクリンは、A549 細胞において、細胞生存率に影響しない濃度で TNF-αによって誘導される ICAM-1 の発現を濃度依存的に阻害した。また、MCF7 細胞において、キナクリンは細胞生存率を若干低下させたが、ICAM-1 発現を抑制した。一方、HT1080 細胞では、キナクリンは ICAM-1 の発現を阻害する濃度で細胞生存率を低下させた。定量 PCR 法の結果から、A549 細胞と MCF7 細胞では、キナクリンで処理することにより TNF-αによって誘導される *ICAM-1* 遺伝子の発現量が低下することが観察された。したがって、キナクリンは少なくとも NF-κB シグナル伝達経路、もしくは *ICAM-1* 遺伝子の発現に至るプロセスにおいて転写以前の段階に作用することが示唆された。そこで、これら 3 種類の細胞を用いて NF-κB シグナル伝達経路に対するキナクリンの影響を検討した。その結果、キナクリンはいずれの細胞においても NF-κB の核移行を阻害せず、逆に核移行を促進することが観察された。一方、キナクリンは、A549 細胞および HT1080 細胞では、p65 のリン酸化を阻害せず、MCF7 細胞では p65 のリン酸化を阻害した。以上の結果から、キナクリンは、がん細胞株の種類によって NF-κB のシグナル伝達経路に異なる作用を示すことが明らかになった。

Quinacrine, NF-κB, TNF-α

講演番号：3A05a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ A校舎05会場

クロイソカイメン中のオカダ酸、オカダ酸結合タンパク質の定量および局在

Quantification and localization of okdaic acid and okdaic acid-binding protein in the marine sponge *Halichondria okadai*

○松浦　宏樹、小濱　真実、福沢　世傑[1]、橘　和夫[1]、長　由扶子、山下　まり、此木　敬一（東北大院農・生物産業創成、[1]東大院理・化学）

○Hiroki Matsuura, Mami Kohama, Seketsu Fukuzawa[1], Kazuo Tachibana[1], Yuko Cho, Mari Yotsu-Yamashita, Keiichi Konoki (Tohoku University, [1]The University of Tokyo)

【目的】オカダ酸（okadaic acid, OA）はクロイソカイメンより単離された二次代謝産物であり、タンパク質脱リン酸化酵素（protein phosphatase, PP）の阻害剤として知られている。OAの真の生産者は宿主であるクロイソカイメンではなく共生生物であると考えられる。同生物より単離された2種のOA結合タンパク質（OA-binding protein, OABP）のうち、OABP2と名付けたタンパク質はOAと高結合性を示すが、OABP1とは異なりPPとの相同性が低くその機能は不明である。我々はOABP2が遊離OA濃度を低減させる機能を有すると推定し、OAとOABP2の関係性の観点から機能の解明を目指している。本研究では地域、季節を変えて採取したクロイソカイメンにおけるOAおよびOABP2の定量を行い、地域・季節による変動および両者の相関性を調査すること、さらにカイメン組織を分画し、各画分におけるOA、OABP2の定量を行い、両物質の局在を調べることを目的とした。

【方法】クロイソカイメン中のOA・OABPの定量比較：クロイソカイメンをアセトンに浸漬、ろ過し抽出液を得た。抽出液を乾固した後、80%メタノールに再溶解し、既知の方法に従いLC-MS/MS（MRMモード）によってOAを定量した。OABP2についてはOABP2特異的ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングによって定量を行った。

OA・OABPの局在：クロイソカイメンをEDTAを含む人工海水中で振盪し、細胞解離液を得た。得られた細胞解離液をサイズ分画し、各画分に含まれるOAとOABP2の含有量を上述の手法に従って求めた。

【結果】クロイソカイメン中のOA・OABPの定量比較：クロイソカイメンにおけるOAおよびOABP2の含有量は地域・季節により変動すること、単位重量のクロイソカイメンに含まれるOAとOABP2には相関関係があることが示唆された。

OA・OABPの局在：特定のサイズ画分にOAが濃縮されており、またこの画分にOABP2が存在することを明らかとした。

Halichondria okadai, okadaic acid, okadaic acid-binding protein

講演番号：3A05a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ A校舎05会場

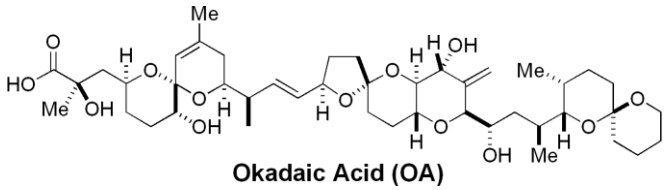
クロイソカイメン細胞の培養およびオカダ酸結合タンパク質OABP2.1の局在

Identification of okadaic acid binding protein OABP2.1 in the sponge cell culture from *Halichondria okadai*

○小濱　真実[1]、松浦　宏樹[1]、西谷　豪[2]、伊東　久美子[3]、大和田　修一[2]、長　由扶子[1]、山下　まり[1]、此木　敬一[1]（東北大院農・生物産業創成[1]、東北大院農・応生科[2]、東北大院農[3]）

○Mami Kohama[1], Hiroki Matsuura[1], Gou Nishitani[2], Kumiko Ito[3], Shuichi Owada[2], Yuko Cho[1], Mari Yotsu-Yamashita[1], Keiichi Konoki[1] (Tohoku University[1,2,3])

【目的】クロイソカイメンから単離されたオカダ酸（Okadaic Acid、OA）は、哺乳類のタンパク質脱リン酸化酵素PP1、PP2Aに対してそれぞれ150 nM、30 pMの解離定数で結合する阻害剤であり、強力な発がんプロモーターである。



Okadaic Acid (OA)

クロイソカイメンにはOABP1、OABP2の二種類のOA結合タンパク質が存在し、アミノ酸配列の相同性からOABP1はPP2Aであると考えられた。一方、OABP2は相同性を示すタンパク質を持たないためその機能は不明だが、クロイソカイメン中で遊離OA濃度の抑制を担うと推定された。本研究ではOABP2の機能解明を目指し、クロイソカイメン細胞の培養を試み、分子生物学的手法および免疫組織化学的手法によりOABP2およびOAの局在を調べることを目的とした。

【方法】神奈川県三浦市で採集したクロイソカイメンを現地にて固定した。研究室に持ち帰りカイメンを適切に処理し、薄層切片とした。その後、抗OABP2.1ポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行った。また、固定処理を行わなかったクロイソカイメンを細断し、EDTA含有人工海水に懸濁させた。次に解離したクロイソカイメン細胞をEDTA非存在下で懸濁させ、クロイソカイメン細胞が再凝集する過程を観察した。凝集した細胞塊より得られるtotal DNAを鋳型に、クロイソカイメンの rDNA、カルモジュリン（CaM）およびOABP2.1をコードする部分配列をPCRにより増幅し配列解析を行った。さらに、クロイソカイメン細胞の凝集塊を得る過程で分離したすべての画分について、LC-MS/MS法によりOA含量を測定し定量した。

【結果】OABP2.1ポリクローナル抗体を用いた免疫組織観察ではOABP2.1貯蔵生物の同定には至っておらず、賦活化、透過処理の条件を種々検討している。また、EDTA処理で解離させたカイメン細胞は約1週間で直径約0.2-0.5 μmの凝集塊となった。PCR産物から凝集塊がクロイソカイメン固有のrDNA、CaM遺伝子およびOABP2.1遺伝子を含むことが判明し、OABP2.1がクロイソカイメン由来のタンパク質であることが分かった。一方、OAはクロイソカイメンに共生する微生物によって生産されると考えられているが、その詳細は不明である。そこで我々はクロイソカイメン細胞の凝集塊にOAが含まれているかどうか調べたが、現段階で検出されていない。

okadaic acid, okadaic acid binding protein, *Halichondria okadai*

講演番号：3A05a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ A校舎05会場

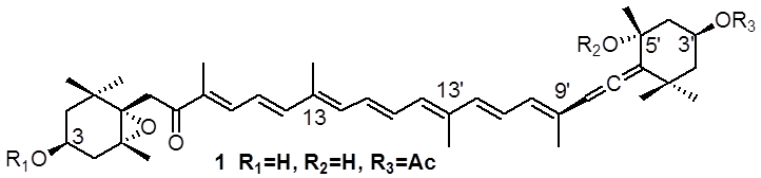
海洋性カロテノイド、フコキサンチンのヒドロキシル基修飾体の細胞毒性とタンパク質結合体の作製

Cytotoxicity of hydroxyl-modified marine carotenoid, fucoxanthin, and preparation of its protein conjugate

○野村　駿、此木　敬一、長　由扶子、山下　まり（東北大院農・生物産業創成）
○Shun Nomura, Keiichi Konoki, Yuko Cho, Mari Yotsu-Yamashita (Tohoku University)

【目的】褐藻やケイ藻に含まれるfucoxanthin (**1**)は抗酸化作用や抗ガン作用など有用な生理活性を持つカロテノイドである。近年、**1**の3'-脱アセチル体であるfucoxanthinol (**2**)がヒト成人T細胞白血病(ATL)細胞に対して**1**よりも強い細胞増殖阻害効果を示すことが報告された[1]。しかし、**1**の3位と5'位のヒドロキシル基の生理活性への影響についての報告がないため、本研究では**1**の3位と5'位のヒドロキシル基を化学修飾し、細胞毒性の変化を調べることを第一の目的とした。また、**1**のタンパク質結合体合成の報告はなく、合成できれば抗体作製など様々な応用が期待できる。そこで、**1**のタンパク質結合体を作製することを第二の目的とした。

【方法、結果】まず **1** を原料として、**1** に含まれる 3 位および 5'位の二つのヒドロキシル基を、2 種類の方法でアセチル化し、R_1 のみをアセチル化した fucoxanthin-3-*O*-Ac (**3**)と、R_1 と R_2 をアセチル化した fucoxanthin-3,5'-di-*O*-Ac (**4**)を作製した。次に、豚膵臓リパーゼを用いて、**2** や R_2 のみをアセチル化した fucoxanthinol-5'-*O*-Ac (**5**)や R_2 と R_3 の両方をアセチル化した fucoxanthinol-3',5'-di-*O*-Ac (**6**) を作製した。また、R_1 をヘミスクシニル化した fucoxanthin-3-*O*-HS (**7**)を作製した。各化合物は HPLC で精製、定量後、マウス白血病(P388)細胞に添加し、MTT 法で細胞毒性を調べた。その結果、他の報告どおりに、**2** の細胞毒性が最も高く、次に **1** および **7** が同等の活性を示し、**3, 4** は **1** および **7** よりも低かった。**5** と **6** の活性は現在さらに検討している。一方、種々検討した結果、**1** を bovine serum albumin (BSA)および keyhole limpet hemocyanin (KLH)に結合できたことが、MALDI-TOF-MS や電気泳動で示唆された。



1 R_1=H, R_2=H, R_3=Ac
2 R_1=H, R_2=H, R_3=H
3 R_1=Ac, R_2=H, R_3=Ac
4 R_1=Ac, R_2=Ac, R_3=Ac
5 R_1=H, R_2=Ac, R_3=H
6 R_1=H, R_2=Ac, R_3=Ac
7 R_1=$CO(CH_2)_2COOH$, R_2=H, R_3=Ac

Ref. 1) Ishikawa *et al.*, *Int. J. Cancer*, 123, 2702-2712 (2008).

Carotenoid, Fucoxanthin, Cytotoxicity

講演番号：3A05a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ A校舎05会場

ソフトコーラル由来の新規センブレン類のメラニン生成抑制活性

Melanogenesis inhibitory effect of new cembrenes isolated from an Okinawan soft coral

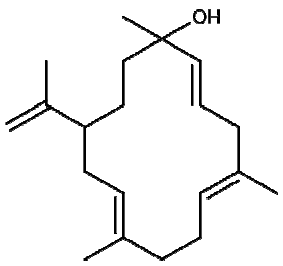
○崔 鳳根、小鹿 一、金本 明彦[1]、藤原 健史[1]（名大院・生命農、[1]オーピーバイオ）
○Bong-keun Choi, Makoto Ojika, Akihiko Kanamoto[1], Takeshi Fujiwara[1]（Nagoya Univ., [1]OP Bio Factory）

【目的】

高齢社会の到来に伴い、近年、体の健康な状態を維持するいわゆるアンチエイジング（抗老化）が注目されている。その中、皮膚におけるメラニン生成は加齢・紫外線・ストレスなどの様々な原因により増加する老化の一形態である。メラニン生成においてチロシナーゼは最も重要な役割をするので、メラニン生成を抑制する物質は色素沈着の予防及び改善につながると考えられる。本研究では、沖縄産ソフトコーラルからこのような阻害活性を示す新規センブレンと類縁化合物を多数見出したので、その活性について報告する。

【方法】

スクリーニングは次のように行った。0.1 %グルコサミンで白色化させた B16 メラノーマ細胞を 24 ウェルに接種し、24 時間後、グルコサミンを含まない培地中、サンプルを処理した。72 時後、細胞の色を確認した。メラニン生成の回復際、白色化作用を指標にスクリーニングを行い、活性の見られた沖縄産ソフトコーラル（未同定）の酢酸エチル可溶部をシリカゲルカラムで分離を行った。さらに、活性画分を ODS カラムで分離し、最後に逆相 HPLC で精製し、活性化合物として新規センブレン（1)とその類縁化合物を単離した。1 の構造は NMR と MS の測定によって決定した。



New cembrene (1)

【結果】

新規センブレン（1）は 10 μg/ml で B16 細胞のメラニン生成を抑制し、細胞を白色化させた。なお、この濃度で細胞の生存に影響を与えなかった。1 の類縁化合物も同様な濃度において B16 細胞のメラニン生成を抑制した。また、詳細な作用メカニズムについても報告する。

Cembrenes, Soft coral, Melanogenesis

講演番号：3A05a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ A校舎05会場

レモンフラボノイドおよびテルペノイドの生物活性の評価

Evaluation of the biological activities of lemon flavonoids and terpenoids

○山本 涼平，井上 和香，鶴田 綾子[1]，玉崎 さとみ[1]，古城 綾佳[1]，武藤 徳男（県広大院・生命，[1]県広大・生環）

○Ryohei Yamamoto, Yasuka Inoue, Ayako Tsuruta[1], Satomi Tamasaki[1], Ayaka Kojo[1], Norio Muto (Kenhirodaiin, [1]Kenhirodai)

【目的】

レモンをはじめとするカンキツの果皮にはポリフェノールなど多くの生理活性物質が含まれており，抗酸化活性や代謝調節活性などの機能性が近年注目されている。我々もこれまでに，レモン抽出物中のα-グルコシダーゼ阻害活性物質の探索を行い，報告してきた。今回，レモン中のフラボノイド，特にその主成分であるエリオシトリンの分子変換と生物活性の変化を解析し，他のテルペノイド類も含めた生物活性の比較評価を行った。また，安全性評価の一環として，ラット小腸粘膜由来上皮細胞（IEC-6細胞）に対する細胞障害性についても評価した。

【方法】

搾ったレモン果汁および果皮の熱水抽出物をHP-20カラム（φ37×250 ml）で分離し，得られた60%メタノール分画を次いでHPLC（Mightysil C-18 ODS, 25%CH_3CN, 0.7 ml/min，280 nm）で分離した。得られた分画を凍結乾燥し，エリオシトリンの黄色粉末を得た。エリオシトリンの脱配糖化はβ-グルコシダーゼなどの酵素処理で行った。生物活性は，抗酸化活性をDPPHラジカル消去活性で，またブタ小腸由来α-グルコシダーゼ阻害活性を既報に従って測定した。IEC-6細胞は10% FBSを含むDMEM培地で培養し，細胞障害性の評価はWST-1法で行った。すなわち96ウェルマイクロプレートで24時間前培養を行い，次いで各濃度のサンプルを添加して24時間培養した。培養終了後，WST-1試薬を添加し，2時間後に415 nmの吸光度を測定した。

【結果】

レモン果汁およびレモン果皮よりエリオシトリンを黄色粉末として分離した（純度は HPLC で 95%）。また，エリオシトリンの酵素処理において，アーモンド由来β-グルコシダーゼ処理ではエリオジクチオールのみが得られ，レモンピール水からの分離精製でエリオジクチオールグルコシドを得た。DPPH ラジカル消去活性による抗酸化活性評価の結果，レモンフラボノイド（エリオシトリン，エリオジクチオールグルコシド，エリオジクチオール）はいずれもほぼ同等の強い抗酸化能を示した。しかし，ブタ小腸由来α-グルコシダーゼに対しては 3 種のフラボノイドの阻害活性は著しく異なった。さらに，IEC-6 細胞に対するレモンフラボノイドの毒性はエリオジクチオールが最も強かったが，他のフラボノイド類に比べて低いという特徴が認められた。

IEC-6 細胞を用いてレモン由来フラボノイドおよびテルペノイドの細胞内動態および障害性を解析し，機能性成分としての有効性を考察する。

Lemon flavonoid, Eriocitrin, Biological activity

講演番号：3A05a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ A校舎05会場

ホウレンソウ由来フラボノイドの脱顆粒抑制活性の評価と作用解析

Evaluation of granulation-inhibitory effect and action mechanism of spinach flavonoid in RBL-2H3 cells

○森下 雄太，齋藤 亜美[1]，久保田 美紗[1]，代田 修[2]，黒柳 正典[2]，武藤 徳男（県広大院・生命，[1]県広大・生環，[2]徳文大・香川薬）

○Yuta Morishita, Ami Saito[1], Misa Kubota[1], Osamu Shirota[2], Masanori Kuroyanagi[2], Norio Muto (Kenhirodaiin, [1]Kenhirodai, [2]Tokubundai)

【目的】花粉症に代表されるI型アレルギーは，くしゃみや鼻水などの症状を引き起こし，日常生活に支障をきたす。近年，そのI型アレルギー患者は増加しており，食品による予防や改善が期待されている。我々は，脱顆粒抑制活性を指標として野菜等をスクリーニングした結果，ホウレンソウ（*Spinacia oleracea*）の搾汁液に強い脱顆粒抑制作用を認め，作用成分としてフラボノイドのグルクロン酸配糖体（SO-1）を単離・精製した。本研究では，ホウレンソウ由来SO-1とそのアグリコンの脱顆粒抑制活性を評価し，さらにその作用解析を行なった。

【方法】ラット好塩基球性白血病細胞株（RBL-2H3細胞）を使用し，細胞から放出されるβ-hexosaminidase量を指標に脱顆粒抑制活性を評価した。また細胞障害性はWST-1法を用いて評価した。SO-1はホウレンソウの熱水抽出物からDiaion HP20，HPLC等で精製し，そのアグリコンはβ-glucuronidaseによる加水分解後，HPLCを用いて精製した。SO-1とそのアグリコンの細胞内動態については抗原抗体刺激処理下で培地及び細胞抽出液を調製し，HPLCで定量分析した。さらに細胞内シグナル伝達についてはWestern blottingでp-Lyn，p-Syk，p-ERKの発現解析を行なった。

【結果】RBL-2H3細胞評価系において，SO-1は強い脱顆粒抑制活性を示し，そのIC_{50}は1.15 μg/mlであった。SO-1のβ-glucuronidase処理で得られたアグリコンは同様に強い活性を示し，そのIC_{50}は0.61 μg/mlであった。細胞障害性について，SO-1は脱顆粒抑制活性を示す濃度範囲では障害性は認められなかったが，そのアグリコンは10 μg/mlにおいて弱い障害性が認められた。SO-1とそのアグリコン処理時のシグナル伝達について，p-Lyn，p-Syk，p-ERKそれぞれの発現をWestern blottingにより解析を行なったところ，SO-1ではLynのリン酸化やLynの下流に位置するSykのリン酸化が抑制されることが認められたことから，SO-1の作用経路はLynの上流部またはFcεRIγへの影響を介していることが示唆された。アグリコンについてはLynのリン酸化に抑制は見られず，Sykのリン酸化抑制は認められた。また，SO-1の細胞内動態をHPLCで分析した結果，細胞のメタノール抽出液中にSO-1は検出されなかったが，培地中のSO-1量は減少していた。これらの結果から，ホウレンソウに含まれるSO-1とそのアグリコンは，細胞膜表面に作用し，細胞膜の安定化など脱顆粒に関わるシグナル伝達の上流部で作用していると示唆された。

degranulation, RBL-2H3, *Spinacia oleracea*

講演番号：3A05a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ A校舎05会場

ステロイドホルモン受容体の転写活性に及ぼすフラボノイドの影響

Effect of flavonoids on the transcriptional activity of steroid hormone receptor.

○飯田　加賀美、池田　和博[1]、米澤　貴之、車　炳允、井上　聡[1]、永井　和夫、禹　済泰（中部大・生機研、[1]埼玉医大・ゲノム医学研究セ・遺伝子制御）

○Kagami Iida, Kazuhiro Ikeda[1], Takayuki Yonezawa, Byung-Yoon Cha, Satoshi Inoue[1], Kazuo Nagai, Je-Tae Woo (Chubu Univ., [1]Saitama Med. Univ.)

【目的】フラボノイドのステロイドホルモン受容体に対する作用については、イソフラボンのエストロゲン受容体（ER）リガンド活性が広く知られているが、その他のステロイドホルモン受容体への作用についての解析はあまり進められていない。我々は、ルシフェラーゼを用いたレポーター遺伝子解析によって、主なフラボノイドによる糖質コルチコイド受容体（GR)、鉱質コルチコイド受容体（MR)、プロゲステロン受容体（PR）の転写活性への作用を解析した。

【方法】GR、MR、PR、それぞれの発現ベクターと、これら共通の応答配列であるプロゲステロン応答配列の下流にホタルルシフェラーゼを組み込んだ発現ベクターを、ヒト腎由来細胞株 293T に一過性に形質導入し、12 種類の主なフラボノイドの存在下で発現されたルシフェラーゼ活性強度を測定して、これらステロイドホルモン受容体の転写活性に及ぼすフラボノイドの影響を検出した。また、転写共役活性化因子動員を TR-FRET 法を用いて検出することで、GR と PR に対するこれらフラボノイドのリガンド活性を測定した。

【結果・考察】複数のフラボノイドが、GR と MR 応答性のルシフェラーゼ活性を上昇させた。それらのフラボノイドは、内因性リガンド存在下においてもルシフェラーゼ活性を増大させた。しかし、これらのフラボノイドには、無細胞系での転写共役活性化因子動員の検出による GR リガンド活性は検出されなかった。PR に対しても、同様の結果を示すフラボノイドが存在したが、PR に対しては無細胞系でリガンド活性を示すフラボノイドも存在し、それらの中には、ルシフェラーゼ解析において、アゴニスト活性だけでなく、内因性リガンド存在下でアンタゴニスト活性を示すものもあった。

ER リガンド活性が報告されているフラボノイドが、GR、MR および PR に対しても、これらの受容体応答遺伝子の発現を誘導する事を見出した。PR に対しては、無細胞系においてリガンド活性を示すとともに、内因性リガンド存在下の PR 応答性の遺伝子発現に対して、抑制作用を示すフラボノイドが存在した。このことから、PR に対してこれらのフラボノイドは、部分アゴニスト作用を持つ可能性が考えられた。また、無細胞系において GR に対するリガンド活性を示したフラボノイドは存在せず、応答遺伝子発現に対して、GR と MR で、また、内因性リガンド存在下と非存在下で、類似の反応を示した。このことから、受容体への直接のリガンド活性ではなく、間接的な作用によることが示唆された。フラボノイドは ER 以外にも、多数の核内受容体の転写活性化に直接的あるいは間接的に影響することが示唆されたことから、さらに詳細な相互作用の解明が必要である。

glucocorticoid receptor, mineralcorticoid receptor, flavonoid

講演番号：3A05a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ A校舎05会場

ホスホジエステラーゼ 5 阻害剤による緑茶カテキンEGCGのがん細胞特異的アポトーシス誘導活性の増強

Combating EGCG resistance by targeting PDE5, a common resistance factor in various type of cancer

○熊添 基文、杉原 香織、塚本 俊太郎、鶴留 ゆかり，上田 直樹，鈴木 貴視、黄 宇慧、
末益 優美、山田 耕路、立花 宏文
（九大院農院・生機科）
○Motofumi Kumazoe, Kaori Sugihara, Shuntaro Tsukamoto, Yukari Tsurudome, Naoki Ueda, Takashi Suzuki, Yuhui Huang, Yumi Suemasu, Koji Yamada, Hirofumi Tachibana （Kyushu Univ.）

【目的】epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) は緑茶カテキンの一種であり、強い抗がん作用を有することが知られている。我々はこれまでに、EGCG は多発性骨髄腫細胞表面上に高発現する 67 kDa laminin receptor (67LR) を標的とすることで eNOS/NO/cGMP 経路を活性化し、多発性骨髄腫に対し選択的にアポトーシスを誘導することを報告した。さらに、cGMP の分解酵素であるホスホジエステラーゼ 5 (PDE5) が多発性骨髄腫細胞において高発現しており、勃起不全症治療薬として臨床的に用いられている PDE 5 特異的阻害剤が強力に EGCG のアポトーシス誘導活性を増強することを見出した。そこで本研究では、PDE5 阻害剤が多発性骨髄腫以外のがん細胞に対する EGCG の抗がん作用も増強するのではないかと考え検討した。
【方法】ヒト胃がん細胞株 MKN-45、ヒトすい臓がん細胞株 PANC-1、ヒト前立腺がん細胞株 PC-3、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 に対して EGCG 及び PDE 5 阻害剤 vardenafil を添加し、生細胞数を測定した。また、正常ヒト末梢血単核球細胞、正常ヒト繊維芽細胞、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞に対する作用を検討し、その選択毒性について評価した。EGCG 及び vardenafil の各標的分子である 67LR 及び PDE5 の発現レベルをイムノブロッティング法により検討した。さらに、MDA-MB231 を背部に皮下注射移植した BALB nu/CrlCrlj マウスに対し、EGCG 及び vardenafil を投与し、腫瘍成長に対する影響を *in vivo* イメージアナライザーを用いて検討した。
【結果】生理的低濃度にて EGCG が増殖抑制作用及び細胞致死作用を全く示さなかった胃がん、すい臓がん、前立腺がん、乳がん細胞株に対し、vardenafil は強力に EGCG の抗がん作用を誘導することを見出した。特にすい臓がんに対して低濃度の EGCG のみでは有意なアポトーシス誘導は観察されなかったが、vardenafil と共存させることで 90%の細胞がアポトーシスを起こした。一方、EGCG と vardenafil の併用は正常ヒト細胞の増殖及び生存に対して全く影響を与えなかった。さらに、EGCG と vardenafil の併用は *in vivo* においても乳がん細胞の腫瘍成長を顕著に抑制し、検出限界以下まで退縮させた。以上の結果より、EGCG と PDE5 阻害剤の併用は 67LR 陽性のがんに対する新規治療法となる可能性が示された。

EGCG, 67LR, PDE5

講演番号：3A05a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ A校舎05会場

緑茶カテキンEGCG感知関連分子としてのPP2Aの同定

Identification of PP2A as an essential sensing molecule in the EGCG-induced anticancer pathway

○黄　宇慧、塚本　俊太郎、隅田　崇文、阿比留　晶子、山田　耕路、立花　宏文（九大院農院・生機科）

○Yuhui Huang, Shuntaro Tsukamoto, Takafumi Suda, Akiko Abiru, Koji Yamada, Hirofumi Tachibana(Kyushu Univ.)

【目的】緑茶カテキンの一種であるEpigallocatechin-3-*O*-gallate(EGCG)は、その細胞膜上のセンサーである67kDa Laminin Receptor(67LR)を介してmyosin regulatory light chain(MRLC)の脱リン酸化を誘導し、がん細胞増殖抑制作用を発揮するが[1)]、その詳細な作用機序は不明である。そこで本研究では、EGCGのがん細胞増殖抑制作用を担うEGCG感知関連分子の同定ならびにその作用機序の解明を目的とした。

【方法・結果】表現型ベースの遺伝子探索法の一種類であるGenetic Suppressor Elements(GSE)法を用いた網羅的遺伝子解析から、EGCGのがん細胞増殖抑制作用に関与する候補遺伝子 としてprotein phosphatase 2a alpha (PP2A)を同定した。そこで、マウスメラノーマ細胞株B16においてPP2Aの発現をノックダウンしたところ、EGCGのがん細胞増殖抑制作用は消失した。一方、EGCG は、そのがん細胞増殖抑制作用の発現に関与する myosin phosphatase target subunit 1(MYPT1)を活性化(リン酸化レベルの低下)し、MRLC のリン酸化レベルを低下させるが、PP2A の発現をノックダウンしたB16細胞では、EGCGのMYPT1及びMRLCのリン酸化低下作用は観察されなかった。また、EGCGはMYPT1の阻害分子であるCPI-17のリン酸化レベルを低下（不活性化）させたが、PP2Aの発現をノックダウンさせた細胞では、EGCGのCPI-17のリン酸化低下作用は観察されなかった。

B16細胞を移植した腫瘍形成モデルマウスにおいて、EGCGは腫瘍成長抑制作用及び延命効果を発揮するとともに、腫瘍組織においてCPI-17、MYPT1、MRLCの各リン酸化レベルを低下させた。しかしながら、PP2Aの発現をノックダウンしたB16細胞を移植したマウスでは、EGCGの腫瘍抑制作用ならびに延命効果は顕著に減弱するとともに、EGCG による CPI-17、MYPT1、MRLC のリン酸化レベル低下作用も消失した。

以上の結果より、EGCGはPP2Aを介してCPI-17を不活性化することでMYPT1を活性化し、MRLCの脱リン酸化を誘導することで抗腫瘍作用を発揮することが示された。

1) Tachibana, H. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 87, 66-80 (2011).

EGCG, PP2A, CPI-17

講演番号：3A05a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ A校舎05会場

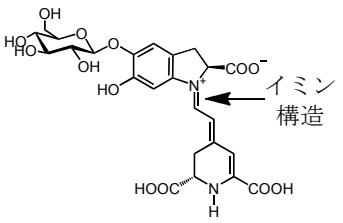
ベタレイン色素の活性窒素種消去機構の解明とベタレイン色素中のイミンの役割

Identification of mechanism for scavenging reactive nitrogen species by betalain pigments and role of imine bond in betalain pigments.

○ 大井辰哉、前田麻起子、崎浜靖子、橋本　誠、橋床泰之（北大院農・応生科）
○ Tatsuya Oi, Makiko Maeda, Yasuko Sakihama, Makoto Hashimoto, Yasuyuki Hashidoko (Hokudai)

【目的】中心子目の多くの植物で生成される水溶性含窒素色素ベタレインは、植物色素のうちでも特に高い抗酸化能を持つ[1)]。ベタレインはアントシアニンと同様、タンパク質の酸化やニトロ化などの細胞障害を引き起こす活性酸素種や活性窒素種を消去する機能を持つと考えられている。アントシアニンでは活性窒素種の消去能と消去機構について詳細な研究がなされているが[2)]、ベタレインは化学的に不安定であるためその消去機構の理解には至っていない。そのために、ベタレインと類似構造を持つ比較的安定な化合物をモデル化合物として、最も反応性の高い活性窒素種であるペルオキシナイトライト($ONOO^-$)との反応性、主要な生成物の化学構造ならびにそれらの生成率を基質ごとに求めた。さらに得られた反応生成物の構造から、ベタレインの活性窒素消去反応機構についての推定を試みた。

【方法及び結果】ベタニンと同様にフェノール性水酸基のついたベンゼン環から共役が伸びたフェルラ酸や、フェノール性水酸基とアミノ基を持つ3-アミノ-6-メチルフェノール等の各モデル化合物0.5mmolをリン酸緩衝液(pH 7.4)中で$ONOO^-$ 2.0 mmolと反応させ、得られた生成物を液液分配と各種クロマトグラフィーにより精製した。得た反応生成物について^{1}H-NMR、LC-MS分析を行い、それらの構造を決定し、ベタレインの分子構造と抗酸化活性の関連性について考察した。これらの反応生成物の化学構造から、活性窒素種の消去はフェノール性水酸基のオルト位のニトロ化に伴うNO_2ラジカル消去が重要な要因であり、また反応性の高いモデル化合物では分子内でのラジカル転移が活発に起こっていることが示唆された。これらの結果を踏まえ、また、$ONOO^-$との反応性が高いモデル化合物にイミン構造を付加させることによって、反応性ならびに反応生成物の組成が大きく変化した。イミン構造を持つモデル化合物と$ONOO^-$との反応においては、イミンの切断とラジカル転移を伴うニトロ化反応が同時に起こることが示され、ベタレインに含まれているイミン構造がその活性窒素消去能に重要な役割を果たしていることが示唆された。従って、ベタレインそのものによる活性窒素種の消去反応においては、ベタラミン酸部分構造がその解明の鍵になると推定された。ベタラミン酸部分の反応の追跡により、植物細胞内におけるベタレインの機能性理解が期待される。



ベタレイン(ベタニン)

1) Stintzing, FC. *et al.*, Trends in Food Science & Technology, 15(1), 19-38, 2004
2) Tsuda, T. *et al.*, FEBS Letters, 484(3), 207-210, 2000

betalain, peroxynitrite, model compounds

講演番号：3A05p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ A校舎05会場

光アフィニティーラベルによる機能解析を目指したジアジニルインドール酢酸の合成

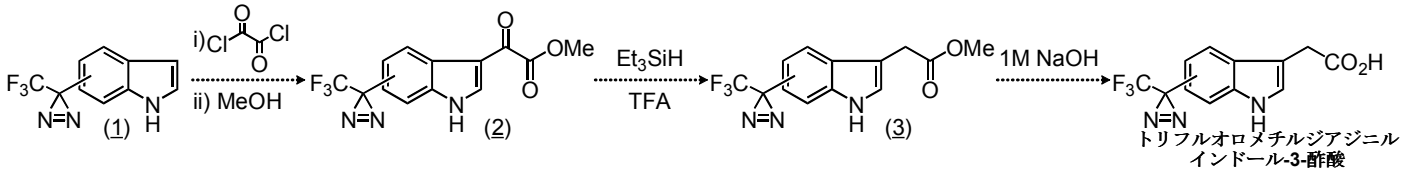
Synthesis of diazirinyl indole-3-acetic acid for a functional analysis with photoaffinity labeling

○村井　勇太、橋床　泰之、橋本　誠（北大院農）
○Yuta Murai, Yasuyuki Hashidoko, Makoto Hashimoto (Hokudai)

【目的】インドール環を含む化合物群はインドール-3-酢酸等さまざまな生理活性を持っている。これら化合物群と相互作用を持つ生体分子の研究は新規薬品や農薬等の開発、あるいは生体内における薬物や毒素等の代謝機構の解明に繋がる。光アフィニティーラベル法を利用してこれらの機能解析を行うことは、ケミカルバイオロジーの概念においても重要な役割を果たす。[1)]　近年、インドール-3-酢酸の受容体が解明されたが、その代謝経路は植物においてさまざまである。インドール-3-酢酸の代謝経路を解明する上でトリフルオロメチルジアジニルインドール-3-酢酸は有用性の高いものであると期待されることから、その簡便かつ効率的な合成を検討した。

【方法】これまで5- or 6-Br インドールからトリフルオロメチルジアジニルインドール(1)を合成し[2)]、化合物(1)のpost-functionalとしてトリフルオロメチルジアジニルトリプトファンやグラミン、3-カルビノール合成の報告を行っている。[3)] 今回トリフルオロメチルジアジニルインドール-3-酢酸においても同様、化合物(1)のpost-functionalとして、まず二塩化オキサゾイル、メタノールの順で反応させることによって化合物(2)を得、次にジアジニル基に影響を及ぼさないトリエチルシラン[4)]によってインドリルカルボニル基を選択的に還元し化合物(3)、その後の加水分解によってトリフルオロメチルジアジニルインドール-3-酢酸を合成するルートを計画した(Scheme1)。

Scheme1: トリフルオロメチルジアジニルインドール-3-酢酸の合成案



【結果】化合物(2)のインドリルカルボニル基の還元を進行させる際、当量以上のトリエチルシランが必要であり、それによるインドール骨格の2,3部位のアルケンも同時に還元されてしまうことが確認された。そこで2,3部位の酸化反応を検討したところ、6-ジアジニル基の場合、活性二酸化マンガンによる酸化によって化合物(3)を得ることに成功し、続く加水分解によって効率良くトリフルオロメチルジアジニルインドール-3-酢酸を合成することに成功した。また5-ジアジニル基の場合、酸化反応において複数の生成物が確認されたため、現在、酸化反応において検討中である。

[1)] M. Hashimoto, Y. Hatanaka, *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 2513.
[2)] 村井　勇太、小田　有二、橋本　誠　日本農芸化学会2010年度大会 P.145 3ACa04
[3)] 村井　勇太、橋床　泰之、橋本　誠　日本農芸化学会2011年度大会 P.178 3A05a09
[4)] M. Hashimoto, Y. Hatanaka, K. Nabeta, *Heterocycles*, **2003**, *59*, 395.

photoaffinity labeling, diazirine, indole-3-acetic acid

講演番号：3A05p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ A校舎05会場

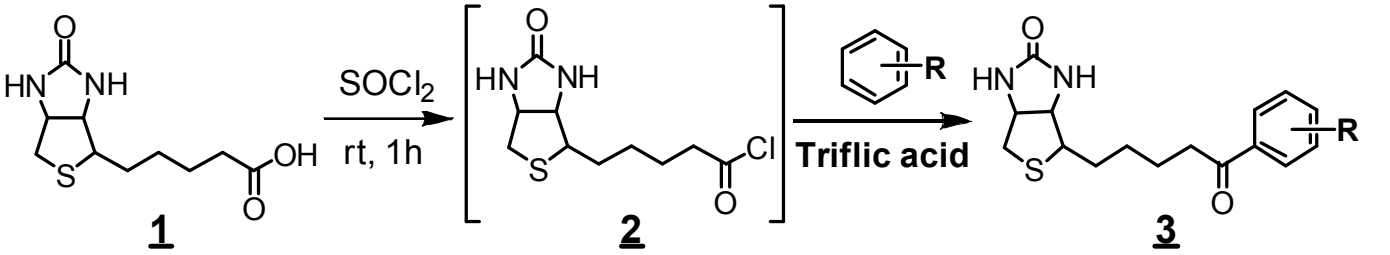
Triflic acidを用いたFriedel-Crafts反応によるビオチン新規誘導体化の検討

Novel derivatizations of biotin by Friedel-Crafts reaction with triflic acid

○武藤　靖幸、橋床　泰之、橋本　誠（北大院農）
○Yasuyuki Muto, Yasuyuki Hashidoko, Makoto Hashimoto (Hokudai)

【目的】ビオチン(**1**)はタンパク質のアビジンと強い親和性（K_a ～2.5 x 10^{15} M^{-1}）を持ち、アフィニティーカラムやラベル化などの様々な手法において広く用いられている。従来、ビオチンの脂肪酸側鎖部分の誘導体化はカルボキシ基をアミド化する方法が主に用いられ、それ以外の報告例は少ない[1)]。これはビオチンの有機溶媒への難溶性に起因していると考えられる。そこで本研究では、古典的有機化学反応であるFriedel-Crafts (F-C)アシル化反応を用いて、ビオチンのカルボキシ基をアシルドナーとした様々な芳香族化合物の導入法を検討した。ジクロロメタン、ベンゼン等を溶媒に、塩化アルミニウム（$AlCl_3$)等のルイス酸を触媒とした通常のF-C反応では、反応が不均一系となりビオチンへの適用が難しい。そこで、立体選択的homophenylalanine合成[2)] 等におけるF-C反応の触媒として報告されている超強酸のブレンステッド酸（triflic acid, TfOH)を溶媒として用いることで、ビオチンの溶解性を上げ、かつF-C反応を触媒することを期待した。
【方法】既存の文献に従い塩化チオニル($SOCl_2$)を用いて室温、１時間でビオチンを酸クロライド(**2**)とし[3)]、TfOH溶媒中、芳香族化合物と各種条件下でF-C反応を行なった。
【結果】触媒兼溶媒として用いたTfOHにより反応は均一系で進行した。ベンゼンとの反応では反応温度を上げることで収率が増加し、50℃で収率43%、70℃で収率70%、100℃のとき収率83%で目的化合物(**3**)を得ることに成功した。トルエンや*o*-, *p*-, *m*- 各種キシレンとの反応では反応温度50℃で収率86～95%、アニソールとの反応では逆に反応温度を下げることで収率が向上し、室温で収率58%、0℃で収率80%、1,2-ジメトキシベンゼンとの反応でも反応温度0℃のとき収率72%となり、いずれの反応も10分から１時間という短時間で終結した。

現在合成した化合物に対して、2-(4'-hydroxyphenylazo)benzoic acid (HABA)を用いたアッセイによりアビジンとの親和性を測定中である。



1) C. Corona, B. K. Bryant, J. B. Arterburn, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 1883-1886.
2) R. Murashige, Y. Hayashi, M. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 6566-6568.
3) C. Kam, A. Abuelyaman, Z. Li, D. Hudig, J. Powers, *Bioconjugate Chem.*, 1993, **4**, 560-567.

biotin, Friedel-Crafts reaction, triflic acid

講演番号：3A05p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ A校舎05会場

微量物質定量を指向した効率的クリック反応条件の検討

Consideration of click chemistry for effective quanta of trace substance

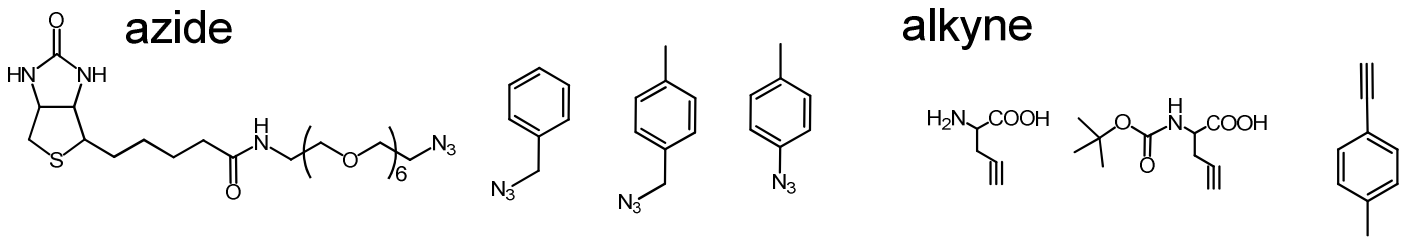
○小笠原　唯、橋床　泰之、橋本　誠（北大院農）
○Yui Ogasawara, Yasuyuki Hashidoko, Makoto Hashimoto (Hokudai)

【目的】

click反応は、生体内に存在しない官能基であるアジドとアルキンが１価の銅触媒存在下で共有結合を形成することから、生体内に導入されたexogenousな化合物を特異的に捕捉・標識するツールとして有用であることが示唆されている。しかし、この反応の効率性（収率）について網羅的に議論された研究はほとんどない。そこで本研究は、click反応を用いて微量物質を検出する上で効率的なclick反応条件を検討することとした。アジド、アルキンを持つ基質をそれぞれいくつか用意し、click反応での銅触媒の種類、反応温度等における反応性の違いを検討した。

【方法・結果】

まず、click反応での銅触媒検討については、アジド側分子としてbenzylazide、*p*-methylbenzylazide、*p*-methylphenylazide等を用いた。アルキン側分子としてはpropargylglycine、*N*-Boc propargylglycine等を準備した。これらの試薬の組み合わせで反応条件検討を行った。click反応は触媒として反応系内に１価銅が存在する必要があるので、１）直接１価銅を用いる方法、２）反応系内にてアスコルビン酸ナトリウムを用いて２価銅を１価銅に還元する方法の２通りで、反応系内の１価銅の定量を行い、比較検討した。１価銅の場合、反応条件により２価銅への酸化が示唆され、還元剤（アスコルビン酸ナトリウム）で再生することで反応を進行させることが可能であった。また、基質と銅触媒、溶媒等の組み合わせによっては反応が完結しない場合があり、click反応の進行には一価銅以外にも別ファクターが関係していると考えられた。基質により、反応条件を最適化する必要性が示唆される。また、*p*-methylbenzylazideと*p*-methylphenylazideの反応性を検討するため、ethynyltolueneと反応を行い、ethynyltolueneの等量、反応温度等を検討した。この二つの基質は各反応条件で同程度の反応性を示すことが確認された。さらに、水溶性の高いエチレングリコール鎖の一方の末端にアジドを持ち、もう一方の末端にタグとしてのbiotinを持つもの(biotin-PEG)を合成した。アルキン側分子にpropargylglycineを用いたbiotin-PEGのclick反応においても、反応温度、アスコルビン酸ナトリウムの等量、銅触媒の種類を検討し、現在buffer中での反応効率を調べている。



click chemistry, Cu, bioactive component

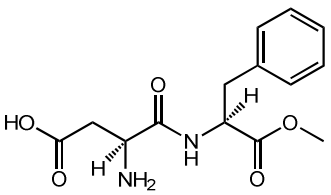
講演番号：3A05p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ A校舎05会場

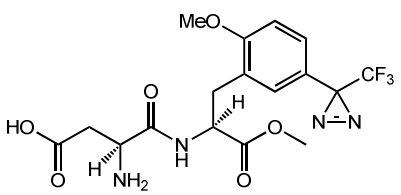
光反応基diazirine含有phenylalanine誘導体を利用した新規光反応性aspartameの合成

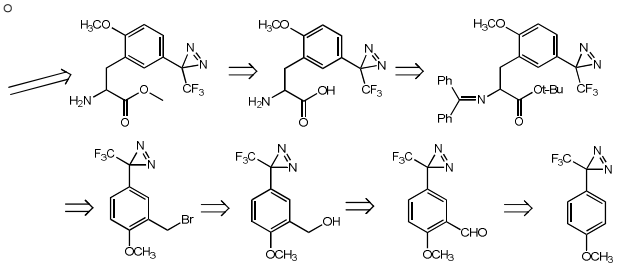
Synthesis of a novel photoreactive aspartame by utilizing L-phenylalanine with diazirine as a photoreactive group

○櫻井 宗矩、橋床泰之、橋本誠（北大院農）
○Munenori Sakurai、Yasuyuki Hashidoko、Makoto Hashimoto(Hokudai)

【目的】生体高分子と生理活性化合物の機能解析において光アフィニティーラベルが有用である。光アフィニティーラベルでは光反応基として主にdiazirine、azide、benzophenoneといったものが用いられているが、その中でも光反応が迅速に進み、かつタンパク質への影響が少ない350nm付近の光照射ですむなどの利点から、diazirineが光反応基として適していると考えられる。しかし一方でdiazirineは合成に多段階の反応を要し、それに伴い官能基の保護が必要となってくることから、その合成が煩雑であるという問題がある。そこで最初に大スケールでdiazirineを合成しその後で官能基を導入するという、post-functionalなdiazirine合成法が考えだされた。本研究では、甘味受容体解明のための光反応性甘味料として、post-functionalな手法によるdiazirinyl基を導入した新規光反応性aspartameの合成を目的とした。
【方法】以前のaspartame構造-活性相関研究で、芳香環のパラ位にヒドロキシ基、メトキシ基を導入した場合、その順に甘味活性が下がっており、aspartame中の芳香環パラ位にdiazirineを導入したところ、同様に甘味活性が低下した。それに対しオルト位にメトキシ基の入った誘導体の甘味活性は従来のaspartameと変わらなかった。以上の結果から、本研究ではaspartameの芳香環のメタ位にdiazirine、オルト位にメトキシ基をもった光反応性aspartameの合成を検討した。
【結果】始めに大スケールでのdiazirineの合成として、4-methoxydiazirineの合成を検討した。出発原料である4-methoxyacetophenoneからそのoxime、tosyl oxime、diaziridineを経て、目的の化合物を高収率で得ることに成功した。続いてそのdiazirineから、post-functionalな手法による光反応性phenylalanineの合成を検討した。4-methoxydiazirineをFriedel-Craftsホルミル化し3-formyl-4-methoxydiazirineを得、これを還元することで3-hydroxymethyl-4-methoxy diazirineを得た。さらにそのヒドロキシ基をブロモ化し、3-bromomethyl-4-methoxydiazirineの合成に成功した。このベンジルブロマイドとグリシン誘導体とのカップリングを行い脱保護することで、光反応性phenylalanineの合成に成功した。現在、L体のphenylalanineをHPLCで分取し、aspartameへの合成を進めていくとともに、立体選択的合成も含めた収率の良い光反応性phenylalanine誘導体の合成についても検討中である。


aspartame


目的の光反応性aspartame



photoaffinitylabel, diazirine, aspartame

講演番号：3A05p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ A校舎05会場

カイコ休眠ホルモン断片誘導体の N-メチルアミノ酸置換体の合成と活性

Synthesis and biological activities of the palmitoyl- and farnesoyl-derivatives of MePheGlyProArgLeu-NH_2 and ProArgMeLeu-NH_2

○羽立直樹、勝崎裕隆、鈴木幸一 [1]、今井邦雄（三重大院生資、[1] 岩手大農・農生科）
○Naoki Hadate, Hirotaka Katsuzaki, Koichi Suzuki[1], Kunio Imai(Miedai, [1]Iwatedai)

【目的】カイコの卵休眠はカイコ休眠ホルモン（DH）で誘起される。DH は 24 アミノ酸からなるペプチドアミドで、その C 末端断片 FGPRLa や PRLa が活性をもつこと、これらの断片をパルミチン酸などの脂溶性残基で修飾すると活性が著しく上昇することが分かっている。一方、DH や上記断片ペプチドはトリプシン分解を受け、Arg のカルボキシル基で切断されるがそれにより活性は完全に失われる。また最近、パルミチン酸とローダミンで二重修飾した C16,Rho-KFGPRLa を幼虫に注射投与すると、休眠活性を示すものの、その多くは活性を発現するサナギ期までの間に分解され、ε-ローダミン化リシンを与えることが判明した。これらの分解を抑制すれば DH やその誘導体をより高活性化できるのではないかと考えた。

そこで、今回は脂溶性残基修飾の FGPRLa の Phe および PRLa の Leu を N-メチル体で置換し、強活性化の可否と酵素分解に抵抗性を示すか調べることにした。

【方法・結果】N-メチルアミノ酸置換体ペプチドは通常の Fmoc-Phe あるいは Fmoc-Leu を対応する保護 N-メチルアミノ酸に変更し、ペプチド合成器を用いて固相合成した。得られた遊離 N-メチルペプチドを塩化パルミトイル処理、あるいは、ファルネシル酸と脱水剤（TBTU-HOBt）処理することにより、対応する脂溶性修飾体に変換した。これまでに、合成ペプチド誘導体として C16-および Farnesoyl-MePheGlyProArgLeu-NH_2 と C16-および Farnesoyl-ProArgMeLeu-NH_2 を得ている。これら試料についてこれまでに判明した予備的検定結果ではサナギへの注射では通常ペプチドと N-メチル体との間にはあまり大きな差は認められないが幼虫に注射投与すると N-メチル体の方が数倍程度強活性である可能性が示唆された。現在、その理由を探るべく、酵素分解に対する抵抗性を調べているところである。また、同様の手法をヤママリンにも適用して活性強化できないか検討している。

この研究は生研センター異分野融合研究事業からの支援のもとで実施している。

講演番号：3A05p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ A校舎05会場

パルミトイル化環状ペンタペプチド（C16-cyclo-KLRLN）立体異性体の休眠誘導能

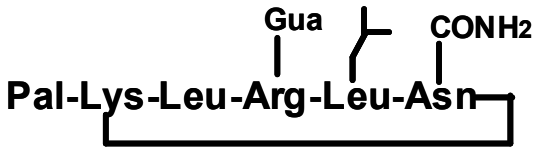
Diapause inducing activities of stereo-isomers of palmitoyl-cyclo- penta-peptide

○中条友紀、勝崎裕隆、鈴木幸一[1]、今井邦雄（三重大院生資、[1]岩手大農・農生科）
○Chujo Yuki, Hirotaka Katsuzaki, Koichi Suzuki[1], Kunio Imai(Miedai, [1]Iwatedai)

【背景・目的】パルミトイル化したカイコ休眠ホルモン C 末端ペンタペプチド（C16-FGPRLa）やヤママユガ由来のペンタペプチドアミド（ヤママリン:DILRGa）のアミノ酸置換体（C16-NIPRLa）はカイコに対して強い休眠誘導能を持つ。この構造の中で、Arg のグアニジン残基、Leu の疎水性側鎖、C 末端のアミド構造が活性発現に重要であることがわかっている。

今回は、これらの活性発現に重要な官能基がしめる空間的配置が休眠誘導能に与える影響を調べることを目的として、パルミトイル化環状ペンタペプチドの D 型アミノ酸による置換体を合成し、活性強度を比較することにした。

環状ペプチドを作成するにあたっては、ペプチドの N 末端に Lys を導入してその α-アミノ基をパルミトイル修飾し、ε-アミノ基を環化に使用することにした。一方、C 末端 Leu の C 側には Asn を配置し、その側鎖アミド基を活性発現に重要な C 末端アミド基の代替として期待しつつ、その C 末端のカルボキシル基を Lys の ε-アミノ基と結合させて環化させることにした。



【方法・結果】まず、鎖状ペプチドを FMOC 法により固相合成し、N 末端遊離側鎖保護の KLRLN 樹脂を得た。これを DMF-ピリジン中で塩化パルミトイル処理して修飾を施した後に、酸性条件下で樹脂と側鎖を切り落として遊離 C16-KLRLN-OH を得た。次いで、この遊離修飾ペプチドを高希釈条件下で TBTU （ 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoro-borate)と、HOBt （1-hydroxybenzotriazole）で処理することにより環化させ、C16-cyclo-KLRLN を得た。実際の合成にあたっては、C 末端 3 アミノ酸残基（Arg、Leu と Asn）を D アミノ酸で置換した立体異性体を 8 種類合成した。現在、これら立体異性体の休眠誘導能を調べており、その結果をまとめて報告する予定である。

本研究は、生研センター異分野融合研究事業からの支援の元で実施している。

講演番号：3A05p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ A校舎05会場

シロイヌナズナの気孔形成を制御するペプチドホルモンの構造活性相関

Structure-Activity relationship of peptide hormones that regulate stomatal differentiation

○杉田 大河、平林 智美、鋒山 真由美、近藤 竜彦、柿本 辰男[1]、坂神 洋次（名大院生命農・応用分子生命科、[1]阪大院・理）

○Taiga Sugita, Tomomi Hiragbayashi, Mayumi Hokoyama, Tatsuhiko Kondo, Tatsio Kakimoto[1], and Youji Sakagami (Grad. Sch. of bioagricultural Science Nagoya Univ., [1]Grad. Sch. of Science Osaka Univ.)

【目的】気孔は植物表皮に存在する器官であり、光や湿度等の環境に応答して開閉することで、植物のガス交換の調節において、重要な役割を果たしている。気孔は葉や茎の表皮上に一定のルールに従って均一に分布していることが知られており、これは気孔形成が高度なパターン形成制御システムによって制御されていることを示している。気孔の前駆細胞であるメリステモイドは、数度の非対称分裂を経た後に孔辺細胞へと分化する。メリステモイドの非対称分裂は、すでに形成されている気孔から離れた位置で行われるために、気孔は互いに隣接しないように形成される。この機構の制御に関与すると考えられている因子として、*EPF*ファミリー遺伝子が注目されている。これらの遺伝子のC末端付近にはシステインリッチな領域が存在し、そのシステイン残基の相対位置は高く保存されていることから、植物体内ではこの部分に由来する生理活性ペプチドが機能していると考えられている。このファミリーのうち、*STOMAGEN*(*EPFL9*)遺伝子に由来し、気孔密度を正に制御するペプチドであるstomagen について、その成熟型はC末端の45残基で分子内に3組のジスルフィド結合が形成されていることを明らかにし、2009年度の本大会で報告した。今回は、同じファミリーに属し、気孔密度を負に制御する*EPF1*、*EPF2*の成熟型と予想されるペプチドを遺伝子組み換え大腸菌を用いて合成し、ペプチドの機能解析、成熟型ペプチドの構造決定、構造活性相関について調べた結果を報告する。【方法・結果】*EPF1*、*EPF2* がstomagen と同様のプロセシングを受けると仮定すると、アミノ酸配列の相同性からともにC末端側の52残基からなるペプチドとして機能することが予想される。そこでこのようなペプチドをHis-tag融合タンパク質として発現させるように設計したベクターを作成し、発現用大腸菌に導入した。この大腸菌を培養してIPTG誘導を行ったところ、目的のペプチドが封入体を形成していることがわかった。そこで封入体を回収して可溶化し、リフォールディングを行った後にタグを切断して、目的とする52残基のペプチドを得た。得られたペプチドは1～10μMで気孔の密度を減少させるという活性を示したことから、大腸菌によって生産したEPF1、EPF2ペプチドが生理活性を有することを確認した。EPF1とEPF2は、そのシステインリッチ領域にstomagen より２個多い８個のシステイン残基を持っている。トリプシンによる酵素消化により得られたEPF1とEPF2の消化断片のMALDI-TOF MSの解析の結果から、どちらのペプチドにおいてもstomagen では保存されていないN末端から5番目と6番目のシステイン残基がジスルフィド結合を形成していることが明らかになった。このことから、得られたペプチドの分子内ジスルフィド結合の様式はstomagen と同様であることが強く示唆された。

stomata, peptide hormone, Arabidopsis,

講演番号：3A05p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ A校舎05会場

プロリン残基に着目したCLV3類縁体の構造活性相関

Structure Activity Relationship of CLV3 peptide

○土屋 玲一郎、近藤 竜彦、横峯 健二郎、小林 耕、安江　奈緒子、坂神 洋次（名古屋大学大学院・生命農学研究科）

○Reiichiro Tsuchiya, Tatsuhiko Kondo, Kenjiro Yokomine, Ko Kobayashi, Naoko Yasue, Youji Sakagami (Graduate School of Bioagricaltural Science, Nagoya University)

【背景・目的】

植物の地上部のほとんどの組織は、茎頂分裂組織(shoot apical meristem, SAM)に存在する少数の幹細胞に由来する。シロイヌナズナから単離された*clv*変異株はSAMが肥大化するという表現型を示す。この変異の原因遺伝子の一つである*CLV3*は、翻訳後修飾により、配列中のプロリン残基が水酸化及び、糖鎖修飾された13残基の分泌型ペプチドホルモンとして、SAMの幹細胞数を負に調節している。我々は*CLV3*過剰発現体より調製したカルスから、配列中に2残基のヒドロキシプロリン残基を含む12残基のペプチド(MCLV3)を検出、同定した。MCLV3は成熟型のCLV3ペプチドと比較し、C末端側が1残基短く、糖鎖修飾されていないが、受容体であるCLV1に結合し、非常に低濃度(10 nM)で生理活性を示すことから合成の容易なCLV3誘導体と考えることができる。本研究では、このMCLV3の構造活性相関を明らかにし、有用なアンタゴニストやアゴニストとなる類縁体を合成することを目的としている。

【方法・結果】

2009年の本大会において、主根の伸長阻害試験及び、受容体との結合活性試験の結果をもとにして、化学合成した様々なMCLV3類縁体の構造と活性の相関について調べた結果を報告した。合成した類縁体の中でも、Pro^9をアラニンに置換した類縁体及び、Pro^9を*N*-置換グリシン(ペプトイド)の一種である*N*-(*R*)-1-phenylethyl glycine で置換した類縁体では、受容体との結合能を保持する一方で、根における活性を失うことが明らかになり、有用なアンタゴニスト候補と考えられた。本大会では、従来の２種類の生物検定に加え、CLV3の本来の機能部位であるSAMに対する生理活性試験を行い、より詳細にMCLV3類縁体の生理活性を評価した。その結果、Pro^9をアラニンに置換した類縁体では、根と同様にSAMにおいても活性を失う一方で、Pro^9を*N*-(*R*)-1-phenylethyl glycine で置換した類縁体では、SAMにおける活性を保持しており、アンタゴニスト候補ではなく、SAMに選択的なアゴニストであると考えられた。

また、MCLV3の水溶液中の構造を解明するためにNMRスペクトル解析及び、コンピューターによる分子モデリングを行った。NMRスペクトル解析の結果、三つのpre-prolylアミド結合においてトランス型の構造が優位であることが明らかになった。しかしながら、コンピュターモデリングの結果とNMRスペクトル解析におけるマイナーなシグナルの存在から、この三つのアミド結合においてシス型の構造を持つMCLV3が存在することが示唆された。

peptide hormone, structure activity relationship, peptoid

講演番号：3A05p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ A校舎05会場

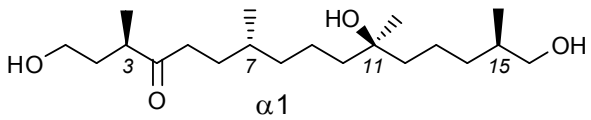
疫病菌交配ホルモンの構造活性相関

Structure-activity relationship of *Phytophthora* mating hormones

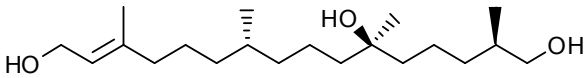
○小鹿　一、モリ シャイラジャ D.、戚　建華[1]、矢島　新[2]、四海圭祐[2]、今岡　忠[2]、額田恭郎[2]、薮田五郎[2]、坂神洋次（名大院・生命農、[1]浙江大・薬、[2]東農大・応生）

○Makoto Ojika, Shylaja D. Molli, Jianhua Qi[1], Arata Yajima[2], Keisuke Shikai[2], Tadashi Imaoka[2], Tomoo Nukada[2], Goro Yabuta[2], Youji Sakagami (Nagoya Univ.,[1]Zhejiang Univ., China, [2]Tokyo Univ. Agriculture)

【目的】疫病菌（*Phytophthora* sp.）は重要農作物に感染してしばしば甚大な被害をもたらす。疫病菌のうち自家不和合性種は、交配ホルモン（α1, α2）を用いて効率的に有性生殖を行う。我々はこれまでに交配ホルモンの解明に成功し[1, 2)]、その過程で7位と11位の絶対配置は必須であることが立体異性体全合成により判明している[2, 3)]。今回は置換基の重要性について知見を得たので報告する。



α1



α2

【方法】α1の誘導体９種、α2の誘導体８種を天然αホルモンからの誘導、または全合成により調製した。ホルモン活性の評価には、α1誘導体に対し*P. nicotianae*のA2交配型を、α2誘導体に対し同種のA1交配型を用いた。ペーパーディスクまたはメンブレンフィルタに誘導体を含ませ、シャーレで培養した菌体コロニー上に置き数日間培養後、周辺に形成された卵胞子（有性胞子）の総数を計測した。誘導体の活性はα1, α2の活性を100%として相対値で比較した。

【結果】α1のdiacetate, dibenzoateは約50%の活性を保持したが、dicarbamateは活性を失った。これは、16-*O*-carbamateは活性をある程度保持するが1-*O*-carbamateは活性を失うことから１-OHが活性に重要であり、diesterは１位アシル基がケトンの関与で脱離するために活性を回復するためと考えられる。15-*epi*体はある程度活性を保持した。その他、ケトンの還元、11-OHの脱水、3-Meの除去はいずれも活性を大きく低下させたことから、16位側以外の全ての置換基・官能基が重要であることが判明した。一方、α2は1-*O*-acetateに数%の活性が見られたものの、diacetate, monoacetate, dicarbamate, monocarbamate, dihydro-α2の全てで、ほぼ活性は消失したことから、全ての置換基が活性に必須と考えられた。

【参考文献】

1) Qi, J. *et al.*, *Science*, **309**, 1828 (2005).
2) Ojika, M. *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 591-593 (2011).
3) Yajima, A. *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 235-237 (2008).

Phytophthora, mating hormone, sexual reproduction

講演番号：3A05p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ A校舎05会場

精密分子設計に基づいた細胞内フコシダーゼのマルチカラー蛍光イメージング剤の開発

Development of multicolor imaging probes for α-L-fucosidase at celler level based on *in silico* study

○塚越 匠[1]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化）

○Takumi Tsukagoshi[1], Wataru Hakamata[1,2], Takako Hirano[2], Toshiyuki Nishio[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon University, [2]Department of Chemistry and Life Science, College of Bioresource Sciences, Nihon University)

【目的】新生タンパク質の主要な翻訳後修飾の１つに *N*-結合型糖鎖修飾がある。新生タンパク質は粗面小胞体で合成され、小胞体内腔に移行する際に糖鎖修飾を受ける。糖鎖修飾されたタンパク質は細胞内の目的部位に到達する過程で、糖残基のトリミング、コンプレックス型糖鎖への変換などのプロセシングが行われる。細胞内の α-L-フコシダーゼはその一連の糖鎖プロセシングに関わる酵素の１つである。本酵素は、炎症・がん・嚢胞性繊維症およびフコシドーシス等の疾患に関連し、本酵素の阻害剤は様々な生理活性が期待され、近年ではピコモル濃度で作用する強力な阻害剤も見出されている。そこで本研究では、培養細胞を用いたフコシダーゼ阻害剤のスクリーニング系開発を目的として、細胞内フコシダーゼのマルチカラー蛍光イメージング剤の開発を行った[1-2)]。

【方法および結果】本酵素の活性を培養細胞で可視化するために、フコシダーゼの基質特異性を考慮した蛍光イメージング剤 (蛍光基質) の精密な分子設計と合成を行った。蛍光基質の分子設計は、フコシダーゼの３次元構造 (PDB ID: 1HL9) を用いたドッキングシミュレーションにより、活性部位のサブサイトを最大限考慮した分子設計とした[3-4)] (化合物 **1**, **3**, and **5**)。さらに、clogD を用いた細胞膜透過性予測を行い、細胞膜透過性の異なる基質デザインについても検討を行った (化合物 **2**, **4**, and **6**)。以上の分子設計に基づいて、３色の蛍光基質 (赤色 **1**-**2**、青色 **3**-**4**、緑色 **5**-**6**) 合計６種のマルチカラー蛍光基質を合成した。これらの蛍光基質を３種の培養ヒト細胞に投与し、蛍光顕微鏡を用いて染色部位の確認を行なった。現在、市販のオルガネラ特異的蛍光試薬を用いて培養ヒト細胞における染色部位の同定を試みている。

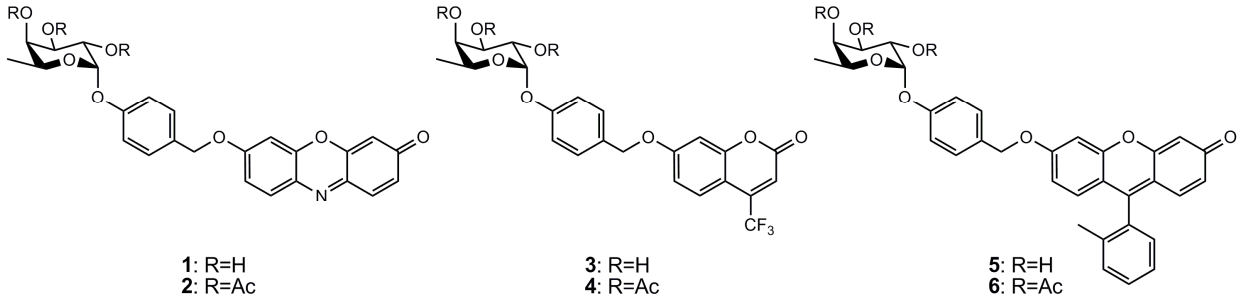


図　細胞内フコシダーゼに対するマルチカラー蛍光基質

[1)] 第6回日本ケミカルバイオロジー学会抄録集, p103, [2)] 日本応用糖質科学会誌, **1**, p60, 2011, [3)] W. Hakamata, *et. al. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 3206–3209, 2011. [4)] W. Hakamata, T. Tsukagoshi, *et. al. Bioorg. Med. Chem. Lett., in press.*

α-L-fucosidase, docking simulation, fluorescent probe

講演番号：3A05p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ A校舎05会場

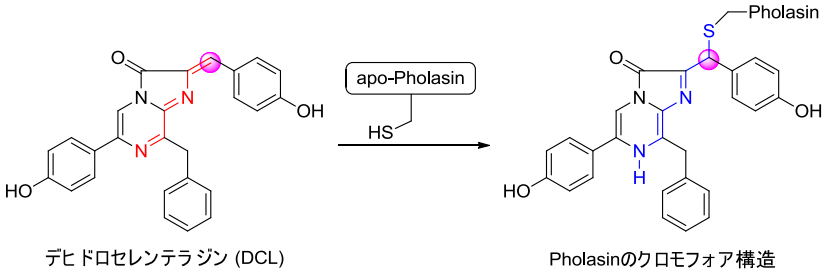
発光タンパク質Pholasinのクロモフォア形成部位に関する研究

Identification of the chromophore binding site within a photoprotein (Pholasin)

○久世 雅樹、田中 瑛子[1]、西川 俊夫[1]、滝川 浩郷（神戸大院・農、[1]名大院・生命農）

○Masaki Kuse, Eiko Tanaka[1], Toshio Nishikawa[1], Hirosato Takikawa (Grad. School of Bioagr. Sci., Kobe Univ., [1]Grad. School of Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】Pholasinはヒカリカモメガイから単離された発光タンパク質であり、活性酸素種の検出キットとして市販されているが、その基質構造は長い間不明であった。我々はこれまでにPholasinの基質がデヒドロセレンテラジン（DCL）であることを明らかにしている[1,2)]。DCLはPholasinの活性部位でシステイン残基と結合してクロモフォア（発光を司る化学構造）を形成している（下図）。本研究ではクロモフォアを形成しているシステイン残基の特定を目的とした。



図：DCLとシステイン残基が結合しPholasinのクロモフォアを形成する。

【方法】天然型クロモフォアは容易に解離してDCLを遊離してしまうために、クロモフォア形成部位の解析は困難である[3)]。そこで、安定なクロモフォアを形成し、質量分析による結合部位の解析を可能とするDCL誘導体を用いることにした。

【結果】フェニルピルビン酸とセレンテラミンを縮合してDCLを合成する手法[4)]を利用して、様々なDCL誘導体を得た。臭素基を導入したDCL誘導体は質量分析において特徴的な同位体由来の分子イオンピークを与えることから、これを用いてクロモフォアを形成しているシステイン残基の特定を試みた。臭素化DCLでPholasinを再構成し、発光前と発光後についてそれぞれプロテアーゼで消化した。現在、得られたペプチド断片をLC-MSで解析し、クロモフォアを形成しているシステイン残基の特定を試みている。

1) Kuse, M.; Tanaka, E.; Nishikawa, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5657.
2) Tanaka, E.; Kuse, M.; Nishikawa, T. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2725.
3) Isobe, M.; Fujii, T.; Kuse, M.; Miyamoto, K.; Koga, K. *Tetrahedron* **2002**, *56*, 2117.
4) Kakoi, H.; Inoue, S. *Heterocycles* **1998**, *48*, 2747.

bioluminescence, dehydrocoelenterazine, photoprotein

講演番号：3A05p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ A校舎05会場

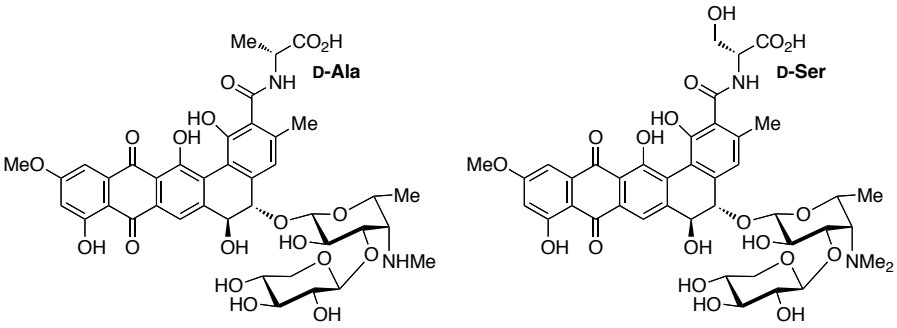
タイトル Pradimicin A の水溶性アナログ・BMY-28864 とマンノースとの複合体の固体 NMR 解析

Title Solid-state NMR analysis of the mannose complex of BMY-28864, a water-soluble analogue of pradimicin A

○ 中川　優[1]、土井崇嗣[2]、竹腰清乃理[2]、五十嵐康弘[3]、伊藤幸成[1, 4]
([1]理研・基幹研、[2]京大院理・化学、[3]富山県大・生工、[4]JST・ERATO)
○ Yu Nakagawa,[1] Takashi Doi,[2] Kiyonori Takegoshi,[2] Yasuhiro Igarashi,[3] Yukishige Ito[1,4]
([1]RIKEN, [2]Kyoto University, [3]Toyama Prefectural University, [4]JST·ERATO)

【目的】 Pradimicin A (PRM-A) は，Ca^{2+} 存在下で D-マンノース (Man) を認識するユニークな天然抗生物質である．BMY-28864 (**1**) は，PRM-A の D-Ala 部分を D-Ser に置換した誘導体であり，PRM-A の水溶性アナログとして作用機構解析や各種生物活性評価に広く用いられてきた．しかしながら，**1** が PRM-A と同様に Man を結合することを直接示す実験的証拠はなかった．そこで本研究では，固体 NMR を用いた独自の解析系により，Ca^{2+} 配位様式と Man 結合部位の両面から PRM-A と **1** との比較を行なうことを目的とした．

【方法および結果】 我々はこれまでに，Ca^{2+} のサロゲートとして $^{113}Cd^{2+}$ を用いた固体 ^{113}Cd-NMR 解析において，PRM-A/$^{113}Cd^{2+}$/Man 複合体が –135 ppm に特徴的な ^{113}Cd シグナルを与えることを確認している [1]．そこで，**1**/$^{113}Cd^{2+}$/Man 複合体を固体サンプルとして調製し，固体 ^{113}Cd-NMR スペクトルを測定したところ，–129 ppm にシャープな ^{113}Cd シグナルが観測された．本結果は，PRM-A と **1** の Ca^{2+} 配位様式がほぼ同様であることを示唆するものである．一方，PRM-A の Man 結合部位に関しては，^{13}C–^{13}C 間の空間的距離を評価できる Dipolar Assisted Rotational Resonance (DARR) を用いた解析により，PRM-A のカルボキシル基が Man 結合部位の重要な構成要素であることを明らかにしている [2]. そこで, カルボキシル基と *N*-メチル基を ^{13}C 標識した **1** と[$^{13}C_6$]Man を用いて **1**/Ca^{2+}/Man 複合体を調製し，その DARR 解析を行なったところ，**1** のカルボキシル基が特異的に Man と近接していることが確認された．以上の結果は，PRM-A と **1** の Ca^{2+} 配位様式および Man 結合部位がほぼ同様であることを示唆している．



Pradimicin A (PRM-A)　　BMY-28864 (**1**)

1) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6084.　2) *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17485.

carbohydrate recognition, pradimicin, solid-state NMR

講演番号：3A05p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ A校舎05会場

ミトコンドリア複合体-Iにおけるアセトゲニン結合部位の同定

Characterization of binding site of natural acetogenin in mitochondrial complex I

○中西　佐予、安部　真人、村井　正俊、三芳　秀人（京大院農・応用生命）
○Sayo Nakanishi, Masato Abe, Masatoshi Murai, Hideto Miyoshi (Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.)

【目的】NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）は、ミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖電子伝達系の初発酵素で、NADHとユビキノンの酸化還元反応を触媒し、それに共役したプロトンポンプ活性により、ATP合成や物質輸送などに必要な電気化学ポテンシャル勾配を形成する。アセトゲニン類はバンレイシ科植物の二次代謝物で、ミトコンドリア複合体-Iの強力な阻害剤である。当研究室でのこれまでの光親和性標識実験により、γ-ラクトン環の結合部位は、45個の異なるサブユニットの内のND1サブユニットであることが分かった。これを受けて、本研究ではTHF環部の結合部位の同定を目的とした。

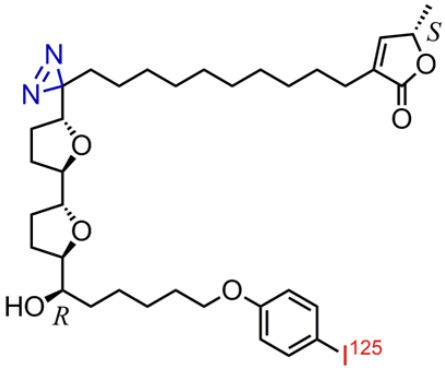


図1．[^{125}I] DANA の構造式

【方法】当研究室で行ったアセトゲニン類の構造活性相関研究に基づいてプローブをデザインした。図1に示すようにTHF環部の隣接水酸基の1つを光反応性のジアジリン環に改変し、検出基として放射性同位体^{125}Iを側鎖部に導入したプローブ（[^{125}I]DANA）を合成し[1]、光親和性標識実験を行った。

【結果と今後の予定】DANAのウシ心筋複合体-Iに対する阻害活性は、天然アセトゲニンと同等の極めて高い活性を維持した。[^{125}I]DANAは膜ドメインを構成するND1サブユニットに結合することがわかった。この結合は、天然アセトゲニンであるブラタシンによって顕著に抑制されたことから、天然アセトゲニンの結合部位に作用していることが確認できた。標識されたND1サブユニットに対して各種プロテアーゼによる限定分解を行い、ペプチドマッピングした結果、[^{125}I]DANAによって標識された箇所は第5～6番目の膜貫通ヘリックスの間に位置するマトリックス側ループ領域に存在することを明らかにした[2]。講演では、さらに詳細な結合部位の同定を目指したプローブの合成についても報告する。

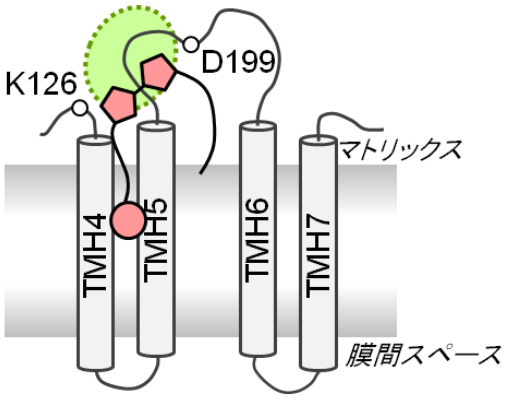


図2．アセトゲニン類の結合モデル

【参考文献】

1) Yamamoto, S. *et al., Tetrahedron Lett.,* 52, 3090-3093 (2011).
2) Nakanishi, S. *et al., Biochim. Biophys. Acta,* 1807, 1170-1176 (2011).

acetogenin, complex I, mitochondria

講演番号：3A05p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ A校舎05会場

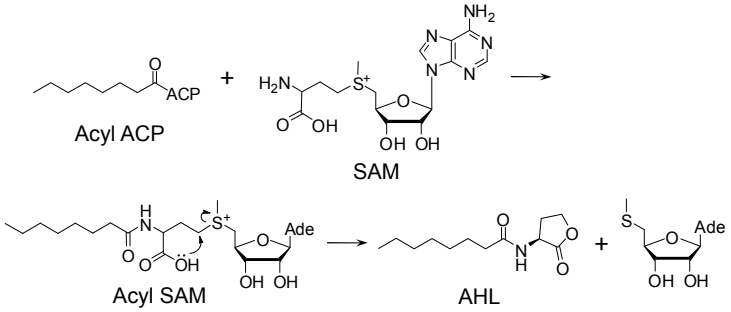
アシルホモセリンラクトン産生を阻害する生合成中間体アナログの開発

Development of acyl SAM analogs that inhibit AHL biosynthesis in Gram-negative bacteria

○藤井 裕城、前中 理沙、甲斐 建次、林 英雄（阪府大院・生命環境）
○Hiroki Fujii, Risa Maenaka, Kenji Kai, Hideo Hayashi（Osaka Prefecture University）

【目的】

グラム陰性細菌は *N*-acylhomoserine lactone（AHL）を化学シグナルとしてクオラムセンシング（QS）を行っている。QS は細菌の病原性を制御していることから、AHL 生合成を特異的に阻害する化合物は抗病原性薬剤の有望なリード化合物となる。AHL は LuxI ファミリーの酵素により acyl-acyl carrier protein（acyl ACP）と *S*-adenosylmethionine（SAM）を基質に生合成中間体である acyl SAM を経由して産生される（スキーム）。基質や反応中間体のアナログは酵素阻害剤の第 1 の候補である。そこで本研究では、図に示すような acyl SAM アナログを合成し、それらの AHL 生合成阻害活性について調べた。



スキーム．AHLの生合成

【方法・結果】

① Acyl SAM アナログの合成

化合物 **1** の合成は次のように行った。2′,3′-*O*-Isopropylideneadenosine を光延反応によりアセチルチオ化し、octanoyl chlororide と 3-bromo-1-propylamine hydrobromide から調製したユニットとカップリングさせてスルフィドを得、最後に isopylidene 基を脱保護した。使用するユニットの変更やスルフィド部分をさらに修飾することで、化合物 **2** や **3** などを含む 25 種の化合物を合成した。

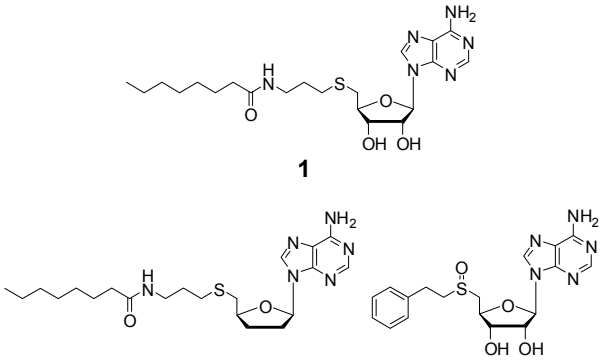


図. Acyl SAM アナログ

② アナログの活性評価

アナログ（100 μM）を添加した培地で根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* Rm41 を培養し、産生された AHL 量からアナログの阻害活性を評価した。その結果、化合物 **1** と **2** では約 40 %、化合物 **3** では約 50 %の AHL 産生阻害がそれぞれ認められた。このことから、acyl SAM アナログにより AHL の生合成を阻害できることが示唆された。

これらのアナログが酵素アッセイ系においても阻害活性を示すかどうかを確認するため、組換え酵素を用いた評価系の構築を進めている。

quorum sensing, *N*-acylhomoserine lactone, inhibitor

講演番号：3A05p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ A校舎05会場

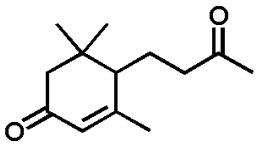
ナスミバエ雄誘引物質の合成および誘引活性

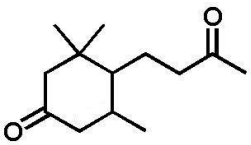
Synthesis and evaluation of male attractants for the solanaceous fruit fly, *Bactrocera latifrons*

○吉田 幸広、小濱 継雄[1]、松山 隆志[1]、原口 大[1]、小野 肇、吉永 直子、森 直樹、西田 律夫
（京大院・農、[1]沖縄県農研センター）
○Yukihiro Yoshida, Tsuguo Kohama[1], Takashi Matsuyama[1], Dai Haraguchi[1], Hajime Ono, Naoko Yoshinaga, Naoki Mori, Ritsuo Nishida (Kyoto University, [1]Okinawa Prefectural Agricultural Research Center)

【目的】ナスミバエ *Bactrocera latifrons* (Hendel) はナス科植物の害虫であり主に東南アジア諸国に分布する。日本では沖縄県与那国島に発生した個体群は不妊化虫放飼法により 2011 年に根絶されたが、沖縄本島への侵入が新たに確認され、その防除が喫緊の課題となっている。ミカンコミバエにおいてはメチルオイゲノール、ウリミバエにおいてはキュールアが雄特異的誘引剤として大量誘殺や発生量モニタリングに利用されているが、ナスミバエにおいては、実用的な誘引剤が開発されていない。これまでにナスミバエ雄に対する弱い誘引剤としてα-イオノン/イオノール類縁体が知られていたが、その 3 位酸化体が強力な活性を示すことを明らかにしてきた (Ishida et al., 2008; Nishida et al., 2009; Enomoto et al., 2010)。とくに 3-oxo-7,8-dihydro-alpha-ionone (P3) の誘引活性は最も強力であることから、P3 およびその関連物質を中心にそれらの合成法の確立を目的として研究を進めた。
【方法】α-イオノンを原料として 3-oxo-alpha-ionone (P1)、そのジヒドロ体 (P3)、さらにテトラヒドロ体（3-oxo-4,5,7,8-tetrahydro-alpha-ionone, P5）へと誘導した。スタイナー型トラップを用い、ナスミバエ不妊化虫放飼中の与那国島の 13 地点で P3 および P5 の誘引試験を実施した（2010-2011 年各月）。
【結果】α-イオノンの 3 位を *tert*-ブチルヒドロペルオキシド、次亜塩素酸ナトリウムにより選択的に酸化し、ジケトン (P1) を得た（収率：59%）。続いて Pd-C 触媒により部分水素添加し、ジヒドロ体 (P3) へと導いた（収率：85%）さらに水素添加を続行させることにより、テトラヒドロ体（P5）を合成した。野外試験の結果、P3, P5 両方のトラップで放飼中の不妊化雄を捕獲することができた (e.g. Nov.-Dec. 2010, 捕獲数 P3：25♂, P5：16♂)。現在、P3：P5 の 2：3 混合物を用いて活性試験を継続中である。

References
Ishida et al., *J. Chem. Ecol.* **34**: 1532-1535 (2008).
Nishida et al., *Entomol. Exp. Appl.* **131**: 85-92 (2009).
Enomoto et al., *Appl. Entomol. Zool.* **45**：551-556 (2010).


P3


P5

Bactrocera latifrons, 3-Oxo-7,8-dihydro-alpha-ionone, attractant synthesis

講演番号：3A05p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ A校舎05会場

ニコチンとネオニコチノイドの活性に対するニコチン性受容体の古典的および非古典的ループ構造の影響

Influence of classical and non-classical loop on the actions of nicotinoids and neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors

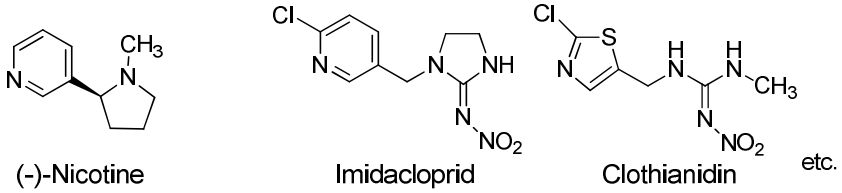
松井美佳奈、○浅野拓也、伊原誠[1]、山下敦子[1]、岡島俊英[2]、松田一彦（近畿大院・農・応生化、[1]理研播磨、[2]阪大・産研）

Mikana Matsui, ○Takuya Asano, Makoto Ihara[1], Atsuko Yamashita[1], Toshihide Okajima[2], Kazuhiko Matsuda (Kink Univ., [1]RIKEN, [2]Osaka Univ.)

【目的】ニコチンとイミダクロプリドをはじめとする合成殺虫剤ネオニコチノイドはともにニコチン性受容体(nAChR)を標的とするが、前者は昆虫と脊椎動物のどちらのnAChRにも作用するのに対して、後者は昆虫のnAChRに対して選択的に作用する。これまでに演者らはこのようなネオニコチノイドの選択的活性発現機構について研究し、受容体のloop CおよびDとの相互作用が関わることを明らかにした。また、アセチルコリン結合タンパク質(AChBP)とイミダクロプリド類縁体との複合体のX線結晶構造を解明し、本化合物のニトロ基がloop Dのみならず非古典的loopの塩基性アミノ酸とも相互作用することを見出した。そこで本研究では、ニコチンとネオニコチノイドの活性に対するloop Dおよび非古典的loopの構造の影響ついて検討したので報告する。

【方法】AChBPと最も高い相同性を示すα7 nAChRを材料として用いて、野生型および変異をもつ受容体をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、化合物に対する受容体の応答として誘起される膜イオン電流を二極膜電位固定法によって測定した。それぞれの化合物により誘起されるイオン電流のピーク値を一定濃度のアセチルコリンによって誘起されるイオン電流のピーク値で規格化し、濃度と規格化電流値の関係から半数効果濃度EC_{50}値を決定した。

【結果】非古典的ループのSer58を昆虫nAChRの対応する箇所で見られる塩基性アミノ酸に置換したところ、当該アミノ酸の置換によってネオニコチノイドが引き起こすα7 nAChRの最大応答値は増大したものの、EC_{50}値は有意に変化しなかった。そこで、非古典的ループのアミノ酸に加えて、loop Dのアミノ酸Gln79も昆虫nAChRの対応する箇所で見られる塩基性アミノ酸に置換した結果、ネオニコチノイドのEC_{50}値は低濃度側にシフトした。またこのとき、昆虫のnAChRに対する選択性を示さないニコチンやアセチルコリンのEC_{50}値は逆に高濃度側にシフトした。これらの結果から、昆虫nAChRの非古典的loopで見られる塩基性アミノ酸は、loop Dのアミノ酸が昆虫タイプのアミノ酸であるときネオニコチノイドとの選択的な結合に寄与することが示唆された。



Nicotinic acetylcholine receptor、 Neonicotinoid、 Nicotine

講演番号：3A05p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ A校舎05会場

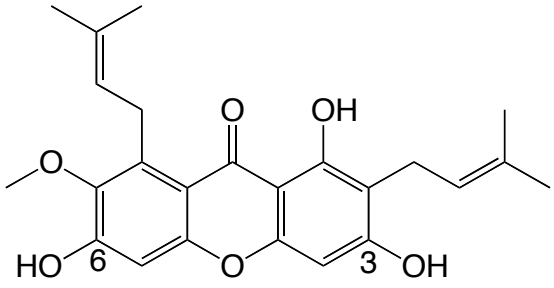
マンゴスチン（*Garcinia mangostana* L.）果皮由来キサントン類のヤマトシロアリおよびハスモンヨトウに対する摂食阻害活性

Antifeedant activity of xanthones in mangosteen pericarp and it derivatives against termite and common cutworms

○中村 安希、森本 正則、大西 麻由、Oraphin Chantarasriwong[1]、
Warinthorn Chavasiri[1]、松田 一彦（近畿大農・応生化、[1]チュラロンコン大・理）
○Yasuki Nakamura, Masanori Morimoto, Mayu Onishi, Chantarasriwong Oraphin[1], Chavasiri Warinthorn[1], Kazuhiko Matsuda (Kinki Univ. School of Agric., [1]Chulalongkorn Univ. School of Sci.)

【目的】熱帯果実マンゴスチン（*Garcinia mangostana* L.）の果皮には、α-mangostin をはじめとするプレニル化された多くのキサントン類が含まれる。マンゴスチン果皮中の主要な二次代謝産物であるα-mangostin もキサントン類であり、ヤマトシロアリ（*Reticulitermes speratus* (Kolbe)）職蟻に対する摂食阻害活性を持つことを報告している。本研究では、α-mangostin 誘導体と、キサントン構造を簡略化した類縁体のヤマトシロアリ職蟻に対する摂食阻害活性発現に必須の化学構造を特定することを目的とした。

【方法・結果】供試化合物であるα-mangostin とその類縁体は、タイ国産のマンゴスチン果皮乾燥品のジクロロメタン抽出物より精製した。一方、２つのベンゼン環の必要性を評価する為に、キサントンの部分構造である *o*-ヒドロキシアセトフェノン類とフラボン類を基本骨格として置換基にバリエーションを持たせ供試化合物とした。ヤマトシロアリ職蟻に対する摂食阻害活性は、選択的ペーパーディスクバイオアッセイを、ハスモンヨトウ（*Spodoptera litura* F.）３齢幼虫に対しては、リーフディスクバイオアッセイによって摂食阻害活性を評価した。これまでのキサントン類に関するヤマトシロアリ職蟻に対する構造活性相関では、α-mangostin の 3, 6 位のフェノール性水酸基のメトキシ基への置換は、活性を低下させる傾向が認められているが、置換基を全く持たない xanthone は、α-mangostin 同様に高い摂食阻害活性を示し、イソプレニル基中の二重結合の還元よるα-mangostin との活性強度に変化は認められなかった。キサントンと片方のフェニル基の結合様式の異なるフラボノイド類においても、シロアリ類に対して昆虫摂食阻害活性を持つためのフェノール性水酸基の重要性が示されている。しかし、A 環、B 環ともに水酸基を持たない flavone でも活性を示した。一方で、ベンゼン環を１つだけ持つ各種誘導体の中にも活性強度に違いが認められたため、それらの抗酸化活性と共に、ヤマトシロアリ職蟻に対して昆虫摂食阻害活性を示す化合物に共通する物理化学性を検討中である。今回の供試化合物の多くは、ハスモンヨトウ幼虫に対しては摂食阻害活性を示さなかった。



α-Mangostin

Mangosteen, Xanthones, Antifeedant

講演番号:3A05p19
講演日時、会場:3月24日17:37～ A校舎05会場

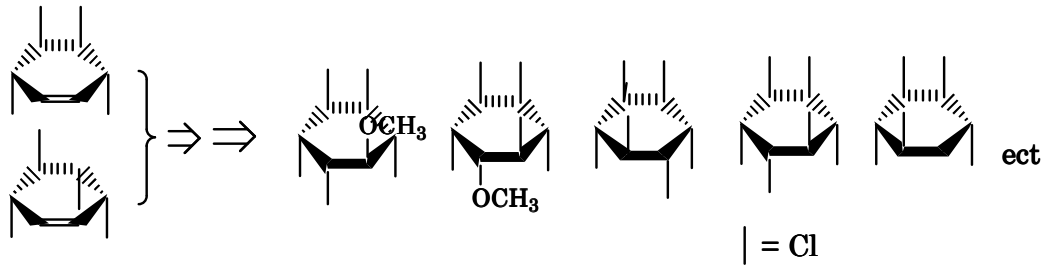
α-BHC およびその類縁体の合成と活性

Synthesis of α-BHC and its analogues, and their insecticidal activities

○田中啓司、森本正則、松田一彦、栗原紀夫[1]（近畿大学 農、[1]京都大学 農）
○Keiji Tanaka, Masanori Morimoto, Kazuhiko Matsuda, Norio Kurihara[1] (Kinki U, [1] Kyoto U.)

【目的】　高い殺虫活性を示すγ-BHCの作用部位は抑制性Clイオンチャンネルであることが知られており[1)]、その部位が、最近、新規開発された、あるいは現在開発中の殺虫剤のターゲットとして特に着目されている。　BHCには8種類の立体異性体が存在する。　その中でγ-BHCのみに高い殺虫活性が認められ、塩素原子の配位がγ-BHCと比べ１か所だけ異なるα-BHCでは殺虫活性は激減する。　γ-BHCの塩素原子を他の置換基に置き換えたγ-BHC類縁体の合成とその殺虫活性は既に調べられている[2)]。しかし、殺虫活性発現に、BHC分子構造上、塩素原子とその立体配位がなぜ必須なのかは、必ずしも十分に解明されていない。　その疑問に迫る為に、本研究では、α-BHCに着目し、その類縁体を合成し、それらの殺虫活性などを調べた。

【方法】下記の合成ルートに従って、類縁体を合成し、それらの殺虫活性、興奮誘起活性をイエバエ(高槻系)、チャバネゴキブリ（京都大西田研で累代飼育されている系統）を用いて、局部滴下法、フィルムコンタクト法で評価した。



【結果】供試したイエバエ、チャバネゴキブリに対し、α-BHC の殺虫活性はきわめて弱く、局部滴下法で LD50 値を求めることは非常に難しかったが、チャバネゴキブリに対するフィルムコンタクト法では評価することが出来、α-BHC を含め、類縁体間の活性比較が可能であった。α-BHC 類縁体の中には、α-BHC より活性の高い化合物も存在し、γ-BHC とα-BHC のハイブリッド化合物（すなわち塩素原子の配位の違う位置の塩素原子を水素原子（H）に置換した化合物で、既合成類縁体[2)]）の殺虫活性もα-BHC より高く、γ-BHC とα-BHC の中間の活性であった。　さらに BHC 異性体の中で唯一のラセミ体であるα体の光学活性体の殺虫活性を評価するために、その光学分割を実施した。

1) K.Tanaka, J.G.Scott and F.Matsumura; Pestic. Biochem. Physiol. 22 124 (1984) “Picrotoxinin receptor in the central nervous system of the American cockroach; Its role in the action of cyclodiene-type insecticides”
2) M.Kiso, T.Fujita, N.Kurihara, M.Uchida, K.Tanaka and M.Nakajima; Pestic. Biochem. Physiol. 8 33 (1978) “Structure-activity relationshhip of lindane analogs”

α-BHC, γ-BHC, inhibitory Cl ion channel

講演番号：3A05p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ A校舎05会場

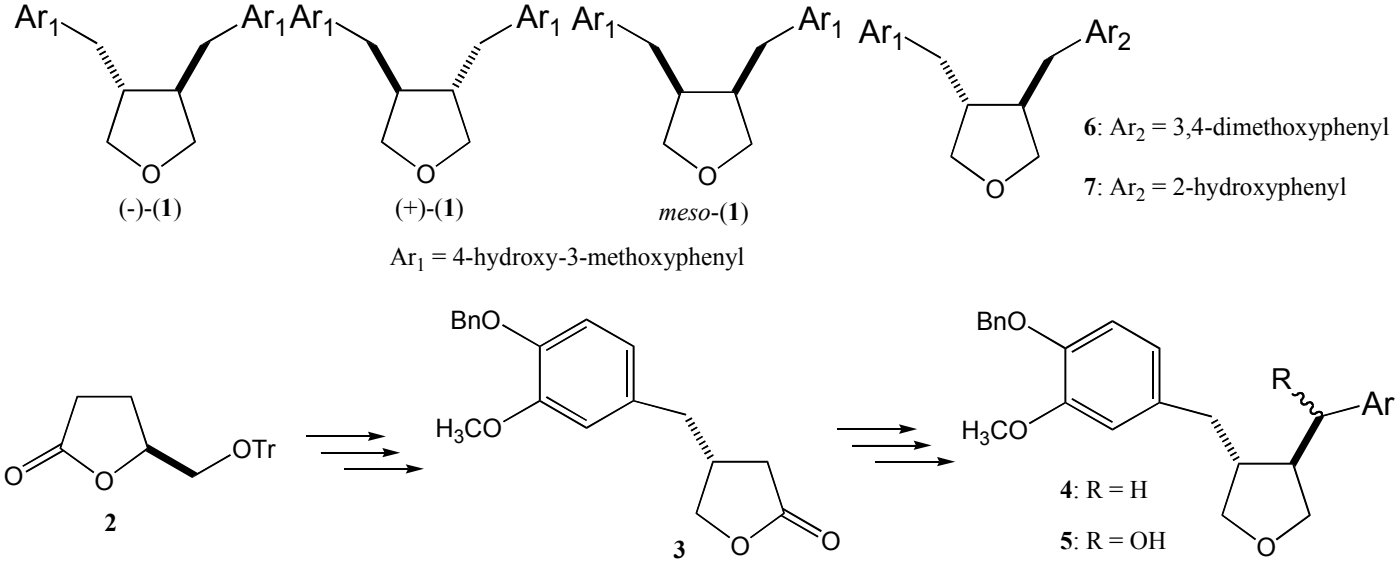
(-)-(8*R*,8'*R*)-9,9'-epoxylignaneのイエバエに対する殺虫活性

Insecticidal activity of (-)-(8*R*,8'*R*)-9,9'-epoxylignane against housefly

○Tuti Wukirsari、西脇寿、首藤義博、山内聡（愛大・農）
○Tuti Wukirsari, Hisashi Nishiwaki, Yoshihiro Shuto, Satoshi Yamauchi (Aidai)

【目的】Lignan, which is one of the most important natural products, is biosynthesized by many plants. Though many kinds of biological activity of lignans have been reported, the effect of stereochemistry on biological activity has not been known. The isolations of stereoisomers of 9,9'-epoxylignane have also been reported. In this research, the relationship between the stereochemistry of 9,9'-epoxylignane and insecticidal activity against housefly was examined, and then the examination about the effect of substituents on the benzene ring was performed.

【方法・結果】The three stereoisomers (-)-(**1**), (+)-(**1**), and *meso*-(**1**) were stereoselectively synthesized to examine the activity. The synthesized compounds were injected to housefly, showing the highest activity of (-)-(**1**) (ED_{50}, 4.8 nmol/fly). At the next step, the derivatives bearing the same stereochemistry as (-)-(**1**) were synthesized. The lactone **2** that was prepared from L-glutamic acid was converted to benzyl lactone **3**, which was submitted to α-benzylation or aldol condensation. After reduction to diol, the intramolecular etherification between the two primary hydroxy groups was achieved to give tetrahydrofuran ring **4** or **5**. By deprotection of **4** gave derivative. In the case of **5**, reduction of benzyl alcohol and deprotection also gave the derivative. The 18 derivatives were synthesized and estimated their ED_{50} value against housefly. The 3,4-dimethoxy derivative **6** showed highest activity (ED_{50}, 0.91 nmol/fly). The activity of 2-hydroxy derivative **7** was also higher activity (ED_{50}, 1.8 nmol/fly) than that of (-)-(**1**).



Lignan, Epoxylignane, Insecticidal activity

講演番号：3A05p21
講演日時、会場：3月24日17:59～ A校舎05会場

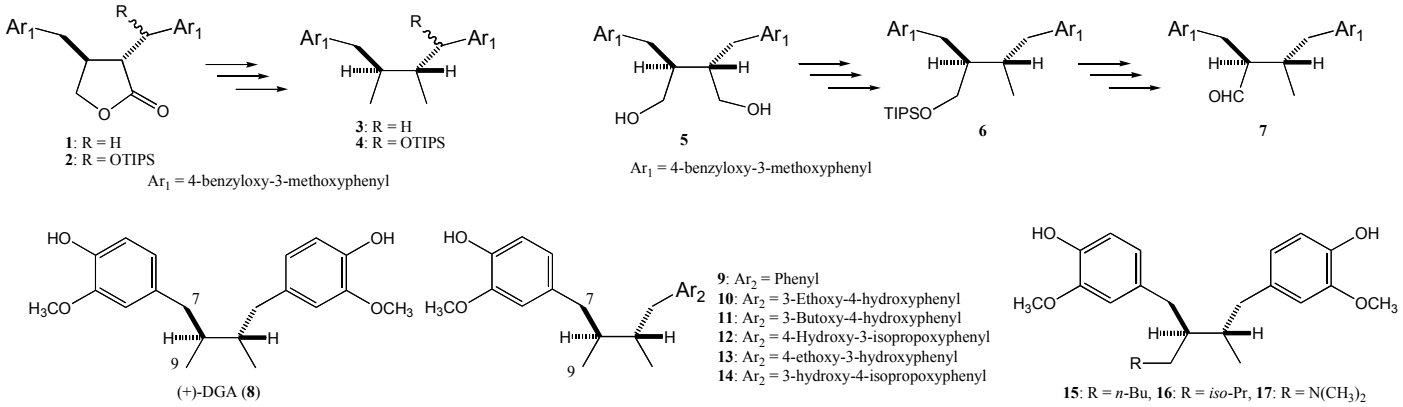
(+)-dihydroguaiaretic acidの構造と抗かび活性

Structure-antifungal activity relationship of (+)-dihydroguaiaretic acid

○長谷部綾香、秋山浩一[1]、西脇寿、山内聡（愛大・農、[1]愛大・総科支セ）
○Ayaka Hasebe, Koichi Akiyama, Hisashi Nishiwaki, Satoshi Yamauchi (Aidai)

【目的】ジベンジルブタン型リグナンであるdihydroguaiaretic acid (DGA)の立体構造と抗微生物活性との関係を調べた結果、植物病原性かびに対してすべての立体が抗かび活性を示し、(+)-体 (**8**)が細菌に対して最も広い抗菌スペクトルを示した。本研究では、(+)-DGAの誘導体を合成し、*Alternaria alternata*を用いて抗かび活性を調べた。

【方法・結果】D-グルタミン酸から調整したラクトンに対してさまざまなベンジルブロミドとのベンジル化またはさまざまなベンズアルデヒド類とのアルドール縮合、水酸基の保護を行い、化合物**1**または**2**を得た。ジオールへの還元の後、メシル化、HMPA中での$NaBH_4$還元により水酸基を除去し**3**または**4**とした。最後に、脱保護、または、脱保護と$Pd(OH)_2$存在化でのH_2処理によるベンジル水酸基の還元によりベンゼン環上の置換基を変換した(+)-DGA誘導体を得た。また、(+)-secoisolariciresinolのフェノール性水酸基を保護した**5**の水酸基の一つをTIPS基で保護した後、メシル化、HMPA中での$NaBH_4$還元を行い**6**とした。さらに、脱シリル化、酸化によりアルデヒド**7**を得た後、アルキルリチウムとの反応、水酸基の除去、または、Wittig反応、水素付加を経て9位のアルキル誘導体を得た。一方、ジメチルアミンとの反応、還元を利用してジメチルアミノ誘導体を調整した。*Alternaria alternata*に対して63 μMで抗かび活性試験を行った結果、(+)-DGA (**8**)は62%の生長率であった。これに対して、7-phenyl体 **9**は生長を完全に抑制し、3-ethoxy体 **10**、3-butoxy体 **11**、3-isopropoxy体 **12**、4-ethoxy体 **13**、4-isopropoxy体 **14**は40-50%の生長率であり、疎水性の化合物のより高い活性が示唆された。9位の誘導体については、ジメチルアミノ体**17**は活性を示さなかったが、アルキル体**15**, **16**は約50%の生長率を示した。このことから、9位も疎水性が、高い抗かび活性に重要であることが示された。7-phenyl体 **9**は、8μMで64%の生長率だった。



Lignan, dihydroguaiaretic acid, antifungal activity

講演番号：3A06a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ A校舎06会場

プラスミノーゲンモジュレーターSMTP生合成の鍵となる新規前駆体pre-SMTPの発見

Pre-SMTP, a key precursor for the biosynthesis of the SMTP plasminogen modulator

○西村 祐一、 鈴木 絵里子、蓮見 惠司（東農工大・農）
○Yuuichi Nishimura, Eriko Suzuki and Keiji Hasumi (Tokyo Nouko Univ.)

【目的】

SMTPは*Stachybotrys microspora*が生産するtprenyl phenolの一群である。特定のアミン類を培養初期に添加することで特定の側鎖を持つSMTPを選択的に生産できる。現在、50種を超える同族体を同定しており、その一つSMTP-7は脳梗塞治療薬として開発中である。本研究では、SMTPのバリエーションを生む上で重要な生合成経路の最終ステップの基質となる前駆体の単離、及び前駆体とアミンとの反応機構の解明を目的とした。

【方法と結果】

SMTP生産において、アミン添加の前後で蓄積量が大きく変化する代謝物を逆相HPLC分析よって確認した。蓄積量が減少する代謝物をHPLCで精製し、NMR等により構造を解析した。得られた２つの代謝物の１つは新規化合物（pre-SMTPと命名）、もう１つはLL-Z1272βと同定された。Pre-SMTPはSMTPの基本骨格のうち、イソプレン側鎖からクロマン構造までの構造をもっていたが、ラクトン部分を欠き、その代わりに*o*-ジアルデヒド構造を有していた。一方、LL-Z1272βはクロマン環構造を欠いており、pre-SMTPよりも上流の代謝物であること推測された。Pre-SMTPはアミンと非酵素的に反応して、該当するアミンをラクタム部分としてもつSMTP同族体を生じた。以上の結果から、pre-SMTPはSMTPの直接の前駆体であることが明らかとなった。非酵素的なpre-SMTPとアミンの反応は、多様なSMTP同族体の合成に有用である。

pre-SMTP, *o*-phthalaldehyde, phthalimidine

講演番号：3A06a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ A校舎06会場

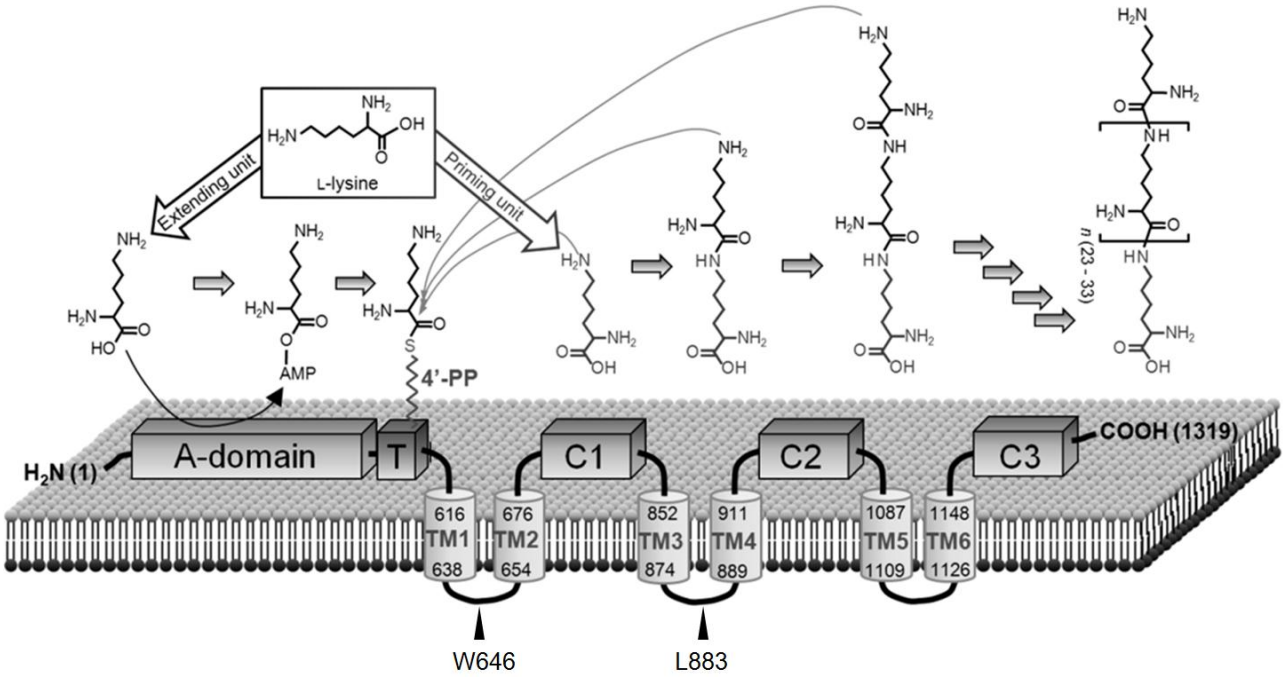
ε-Poly-L-lysine合成酵素におけるペプチド鎖長伸張機構の解析

Investigation of the peptide-chain elongation mechanism in ε-Poly-L-lysine synthetase.

○芋川祐紀、喜多彰洋、塩見真弓、鬼頭奈央子、丸山千登勢、宇多川隆、濱野吉十(福井県大・生物資源)

○Yuuki Imokawa, Akihiro Kita, Mayumi Shiomi, Naoko Kito, Chitose Maruyama, Takashi Utagawa, Yoshimitsu Hamano (Fukui Pref. Univ.)

【目的】L-リジンがイソペプチド結合で直鎖状に繋がったε-Poly-L-lysine（ε-PL）は、放線菌の二次代謝産物として生産されるが、そのペプチド鎖長は菌株によって異なる。これまでに我々は、ε-PL合成酵素(Pls)が非リボソームペプチド合成酵素様の膜酵素であることを明らかにしており、ε-PLのペプチド結合形成に3つのペプチド合成ドメイン（C1-、C2-、C3-ドメイン）が関与していることを見出している。また、W646SあるいはL883Pの変異は、合成されるε-PLのペプチド鎖長を短くすることから、膜貫通ドメイン（TM1～TM6-ドメイン）のリンカー部がペプチド鎖長制御に関与していることを明らかにしている。そこで、本研究では、W646およびL883のアミノ酸残基についてより詳細な変異解析を行った。



【方法・結果】W646のアミノ酸残基を他のアミノ酸18種類へ変換した*pls*変異遺伝子を構築し、*pls*遺伝子が破壊されたε-PL生産放線菌*Streptomyces albulus* に導入した。得られた導入株を培養し、生産されたε-PLの鎖長を調べたところ、W646Q、W646D、W646G、W646Y、W646L、W646Tにおいて W646Sと同じく短鎖ε-PLの生産が確認された。しかし、それ以外の変異においてはε-PLの生産が完全に消失した。現在、L883について同様の変異解析を進めており、これら結果についても報告する。

Peptide synthetase, NRPS, ε-PL

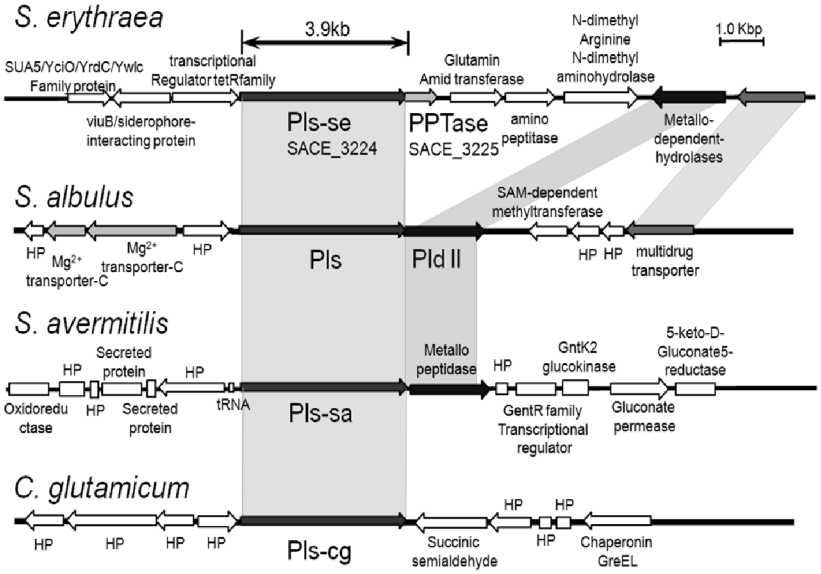
講演番号：3A06a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ A校舎06会場

膜結合型4′-ホスホパンテテイン転移酵素の機能解析

Functional analysis of a membrane-bound 4′-phosphopantetheinyl transferase

○鬼頭奈央子、宇多川隆、濱野吉十（福井県大生物資源）
○Naoko Kito, Takashi Utagawa, Yoshimitsu Hamano (Fukui Pref. Univ.)

【目的】一般的な非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）は、多モジュール型の巨大タンパク質であり、合成途中のペプチド中間体は、T-ドメイン上の補酵素4′-ホスホパンテテイン（4′-PP）を介してチオエステル結合する。4′-PP によるNRPSの翻訳後修飾（ホロ化）は、4′-PP転移酵素(PPTase)が触媒し、CoAが4′-PP基の供与体として利用される。ε-Poly-L-lysine（ε-PL）生産放線菌*Streptomyces albulus*から見出されたε-PL合成酵素（Pls）は、膜酵素であるが、その*N*末領域にNRPSのA-ドメインとT-ドメインを有している。また、基質であるL-リジンはA-ドメインによる活性化を経て、T-ドメイン上の4′-PPに結合することを明らかにしている。しかし、*pls*遺伝子の近傍にPPTaseをコードする遺伝子は存在しない。したがって、*S. albulus*においては、Pls特異的なPPTaseは存在せず、その他の代謝経路で使用されるPPTaseがPlsのホロ化を触媒していると考えられた。しかし興味深いことに、*Saccharopolyspora erythraea*における*pls*遺伝子ホモログ(SACE_3224)においては、その下流にPPTaseをコードする遺伝子(SACE_3225)が存在した。本遺伝子産物は、膜結合型のNRPS様酵素をホロ化する特異なPPTaseであることが推測されたことから、本研究では、その機能解析を行った。



【方法・結果】大腸菌によるSACE_3225遺伝子産物の組換え酵素の構築を種々試みたが、汎用の遺伝子発現系では全く発現が確認されず、不溶性の封入体としても発現しないことが判明した。また、この遺伝子産物のアミノ酸配列をSOSUIプログラムにて分析したところ、膜結合ドメインの存在が示唆された。そこで、本組換え酵素の構築において、放線菌をホストとして、また、発現誘導が可能なpSH19発現ベクターを用いて組換え酵素の構築を試みた。培養条件と遺伝子発現誘導のタイミングを種々検討したところ、ヒスタグ融合タンパク質として微量ながら発現を確認できた。また、各精製ステップにおける本酵素の局在について、ヒスタグモノクローナル抗体を使用したウエスタンブロッティングにて解析したところ、本酵素は膜画分に局在することが判明した。現在、PPTaseとしては稀な膜結合型の本酵素について活性検出を試みている。

4′-phosphopantetheinyl transferase, NRPS, ε-Poly-L-lysine

講演番号：3A06a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ A校舎06会場

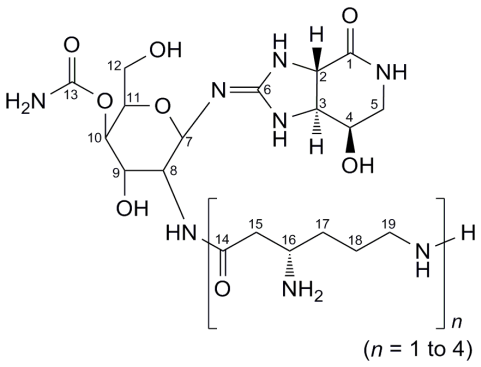
Streptothricin（ST）生合成における非リボソームペプチド合成酵素の機能解析

Functional analysis of the nonribosomal peptide synthetases involved in streptothricin biosynthesis.

○丸山千登勢、豊田順也、片野肇、加藤康夫[1]、泉川美穂[2]、高木基樹[2]、新家一男[3]、宇多川隆、濱野吉十（福井県大・生物資源、[1]富山県大工・生工研セ、[2]JBIC、[3]産総研）

○Chitose Maruyama, Jun-ya Toyoda, Hajime Katano, Yasuo Kato[1], Miho Izumikawa[2], Motoki Takagi[2], Kazuo Shin-ya[3], Takashi Utagawa, Yoshimitsu Hamano (Fukui Pref. Univ., [1]Toyama Pref. Univ., [2]JBIC, [3]AIST)

【目的】放線菌*Streptomyces rochei* NBRC12908が生産する抗生物質STは、その構造に1～4残基からなるβ-リジンオリゴペプチド（β-LOP）を有している。最近我々は、β-LOPの生合成が新規反応メカニズムを有する非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）によって触媒されることを明らかにした。単独型のNRPS（A-ドメイン）であるORF5とORF19は、両者ともβ-リジンを活性化するが、ORF5によって活性化されたβ-リジンだけがORF18（NRPS;T-ドメイン、C-ドメイン）のT-ドメインにローディングされる。興味深いことに、ORF19によって活性化されたβ-リジンは、ORF18のT-ドメインに結合した状態で進行するβ-リジンオリゴマー化の伸長基質として直接使われ、そのペプチド形成は、ORF19が直接触媒する極めて興味深いメカニズムを有している。また、T-ドメイン上で伸長したβ-LOPは、ORF18のC-ドメインの触媒により、フリーのST生合成中間体ストレプトサミンと縮合し、１～4残基のβ-LOPを有するSTとしてリリースされ、フリーのβ-リジンと縮合した場合は、5～7残基のβ-LOPとしてリリースされる。このように、ストレプトサミン存在下においては、β-LOPの伸長途中の早い段階で、C-ドメインの触媒によりSTとしてリリースされると考えられた。そこで本研究では、C-ドメインの触媒活性の改変によって長鎖β-LOPを有するSTの合成が可能になるか検討した。**【方法と結果】**ORF18のC-ドメインと典型的なNRPS C-ドメインのアミノ酸配列についてアライメントを作成した。その結果、ORF18のC-ドメインは、NRPS C-ドメインで保存されているペプチド合成活性に重要なHHxxxDGモチーフによく似たH^{287}QxxxDM^{293}モチーフを有していることを見出した。そこで、組換えORF18（rORF18）の部位特異的変異酵素Q288AとQ288Hを構築し、rORF5およびrORF19とともに酵素反応を行った。野生型のrORF18を用いた反応では、1～5残基のβ-LOPを有するSTの生成が観察されたが、rORF18-Q288Aは3～6残基のβ-LOPを有するSTを与えた。また、rORF18-Q288Hは野生型と同じく1～5残基のβ-LOPを有するSTを生産したが、3～4残基のβ-LOPを有するSTの生産性が飛躍的に向上した。以上の結果から、ORF18のC-ドメインの機能改変は長鎖β-LOPを有するSTの合成に有用な手法であり、現在、この機能改変に有効なその他変異および触媒アミノ酸残基の同定を試みている。



NRPS, peptide, beta-lysine

講演番号：3A06a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ A校舎06会場

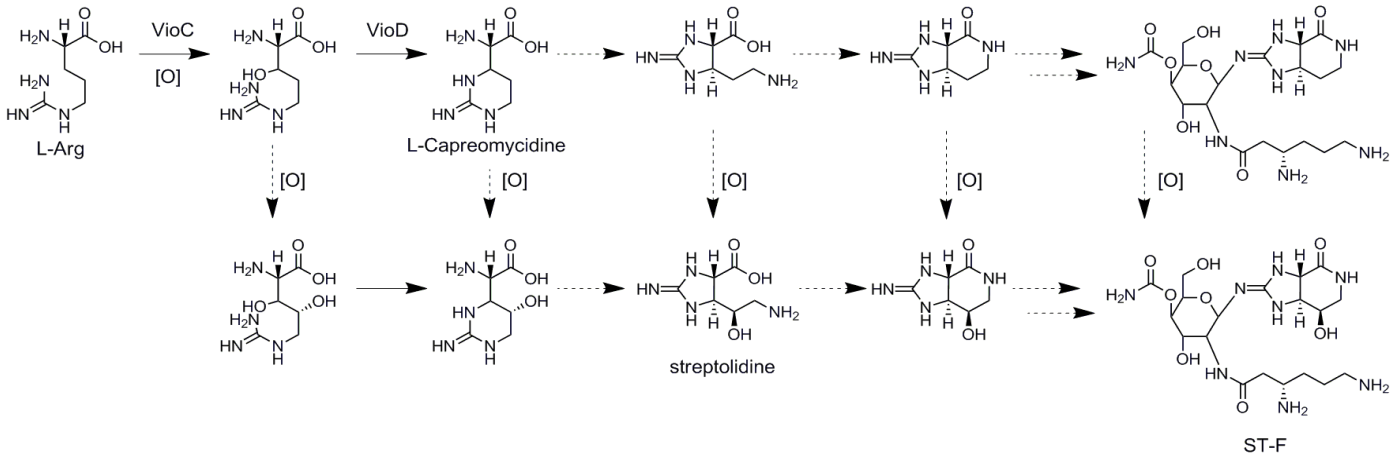
Streptothricin（ST）生合成酵素群に見出したL-アルギニン水酸化酵素の機能解析

Functional analysis of L-arginine β-hydroxylase in streptothricin biosynthetic enzymes.

矢野愛佳、丸山千登勢、金森祐介、泉川美穂[1]、高木基樹[1]、新家一男[2]、宇多川隆、○濱野吉十（福井県大・生物資源、[1]JBIC、[2]産総研）

Aika Yano, Chitose Maruyama, Yusuke Kanamori, Miho Izumikawa[1], Motoki Takagi[1], Kazuo Shin-ya[2], Takashi Utagawa, ○Yoshimitsu Hamano (Fukui Pref. Univ., [1]JBIC, [2]AIST)

【目的】ストレプトスリシン（ST）のストレプトリジンラクタム構造はSTの生理活性に重要であることが知られており、L-アルギニンを生合成出発物質として中間体ストレプトリジンを経由して生合成されることが既に報告されている。しかし、4位の水酸基が導入される生合成のタイミングについては未解明のままであった。また、生合成中間体L-カプレオマイシジンは、抗生物質ビオマイシンの生合成中間体であり、その生合成酵素、VioC（L-arginine β-hydroxylase）とVioD（アミノ基転移酵素）が同定されている。ST生合成酵素群においてもこれら酵素のホモログとして、それぞれORF12とORF14が存在しており、本研究ではORF12の機能解析を行った。



【方法と結果】*orf12*遺伝子の破壊株を構築しST生産培養を行った。その結果、STの生産性が完全に消失したことから、本遺伝子はST生合成に必須であることが判明した。そこで、ORF12の組換え酵素（rORF12）を構築し、その反応産物をLCMSで分析した。その結果、VioCと同じくα-ケトグルタル酸、Fe^{2+}依存的に反応産物を与え、その分子量は基質であるL-アルギニンの分子量より32Da増加した。しがたって、ORF12はVioCとは異なり同時に2つの水酸基を付与する水酸化酵素であることが示唆された。また、ORF14の組換え酵素（rORF14）を構築し、rORF12反応産物を基質として反応させたところ、ストレプトリジンまたは水酸化カプレオマイシジンの分子量と一致する化合物へと変換されたことから、rORF12反応産物は実際にストレプトリジンの生合成中間体であることが強く示唆された。現在、本反応産物の単離精製と構造決定、および、ORF12の反応速度論的解析を行っており、これら研究成果についても紹介する。

dioxygenase, hydroxylase, L-arginine ß-hydroxylase

講演番号：3A06a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ A校舎06会場

イソプレニル修飾酵素ComQのイソプレノイド選択性に関わるアミノ酸残基の同定

Identification of amino acid residues relating to selectivity of isoprenoid in isoprenyltransferase ComQ

○山崎　梨沙、辻　史忠[1]、岡田　正弘[2]、石原　紋子[1]、村上　一馬[3]、入江　一浩[3]、金丸　京子[4]、坂神　洋次[1]（名大農・応用生命科、[1]名大院・応用分子生命科、[2]中部大応生・環境生物科、[3]京大院農・食品生物、[4]名大院・生物機構）

○Risa Yamasaki, Fumitada Tsuji[1], Masahiro Okada[2], Ayako Ishihara[1], Kazuma Murakami[3], Kazuhiro Irie[3], Kyoko Kanamaru[4], Youji Sakagami[1] (Meidai, [1,4]Meidaiinn [2]chubudai, [3]Kyodai)

【目的】タンパク質のイソプレニル化は、担子菌類の接合管形成フェロモンのシステイン残基で発見されたのが初めての報告例である。現在ではこの翻訳後修飾は、生物界に普遍的に存在することが明らかにされている。近年、タンパク質のイソプレニル化の二例目として、枯草菌ComXフェロモンにおけるトリプトファン残基のイソプレニル化が報告された。しかしこの翻訳後修飾は現在までのところ、ComXフェロモンが唯一の報告例であり、生物界における普遍性は明らかにされていない。そこで本研究は、トリプトファン残基のイソプレニル化の普遍性を検証するために、ComXの修飾酵素であるComQを対象として、ComQのリガンド結合部位の詳細な解析を試みた。
【方法】イソプレニル化の一種であるゲラニル化を受ける枯草菌RO-E-2株由来のComQを用いて、ComQ変異体を作製した。具体的には、イソプレノイド結合部位と推測される部分付近のアミノ酸を置換した。辻らが確立した*in vitro*酵素反応系を用い、ComQ変異体とComXフェロモン前駆体、ゲラニルピロリン酸またはファルネシルピロリン酸を反応させ、酵素反応液をLC/MSで解析することによって、ComQに転移するイソプレノイドの選択性を検証した。
【結果】解析の結果、野生株では検出されないファルネシル化トリプトファン残基含有ペプチドを検出した。このことより、ComQに結合するイソプレノイドの長さを決定するアミノ酸残基を同定した。また、アミノ酸残基の側鎖の大きさが転移するイソプレノイドの長さに関与していることが示唆された。これらの結果は、新規ComQ,ComXの探索に有用な情報である。

$ComX_{RO\text{-}E\text{-}2}$,$ComQ_{RO\text{-}E\text{-}2}$, isoprenylation

講演番号：3A06a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ A校舎06会場

ゲラニルトリプトファンの生合成に関する研究

Research on biosynthesis of geranyl tryptophan

○石原　紋子、辻　史忠、岡田　正弘[1]、中川　彩、村上　一馬[2]、入江　一浩[2]、金丸　京子[3]、坂神　洋次（名大院生命農・応用分子生命科、[1]中部大応生・環境生物科、[2]京大院農・食品生物、[3]名大院・生物機構）

○Ayako Ishihara, Fumitada Tsuji, Masahiro Okada[1], Aya Nakagawa, Kazuma Murakami[2], Kazuhiro Irie[2], Kyoko Kanamaru[3], Youji Sakagami (Meidai, [1]Chubudai, [2]Kyodai)

【目的】枯草菌の生産するComXフェロモンはC末端付近にイソプレニル修飾されたトリプトファン残基を有している。イソプレニル修飾されるタンパク質の例としてシステイン残基のイソプレニル修飾が挙げられる。この翻訳後修飾はコンセンサス配列が明らかにされ、生物界に普遍的に存在することが示されている。一方で、トリプトファン残基のイソプレニル修飾はComXフェロモンが唯一の報告例であり、普遍性は明らかにされていない。本研究では、ComXフェロモン前駆体およびその修飾酵素ComQのイソプレニル修飾における重要配列を決定することにより、この翻訳後修飾の生物界における分布を検証することを目的とする。

【方法】

本研究では枯草菌のComXフェロモンのうち、ゲラニル修飾されるRO-E-2株由来のComXフェロモンに着目して行った。

1. まず、ComXフェロモン過剰生産大腸菌の培養上清をLC-MSで解析し、ComXフェロモンの検出を行った。その後、ComXフェロモン前駆体配列の一部を変異させ、その培養上清を解析し、ComXフェロモンの生合成量を算出した。この値を比較することにより重要配列の推定を目指した。
2. 辻らにより確立された*in vitro*酵素反応系を用いてComQの重要配列を決定することを目指した。具体的には、ComXフェロモン前駆体が結合すると推測したComQ中の配列を一部変異させ、酵素反応液をLC-MSで解析し、ゲラニル化活性を算出した。

【結果】

1. ComXフェロモン前駆体のN末端配列を除くとゲラニル修飾ペプチドを検出できないことが明らかとなった。また、トリプトファン残基が存在するC末端付近においてゲラニル修飾に重要な配列が存在していることが示唆された。
2. ComQ変異体を用いた*in vitro*酵素反応により、ComQの187番目のアスパラギン酸残基がゲラニル修飾に重要であることが示唆された。

$ComX_{RO\text{-}E\text{-}2}$, isoprenylation

講演番号：3A06a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ A校舎06会場

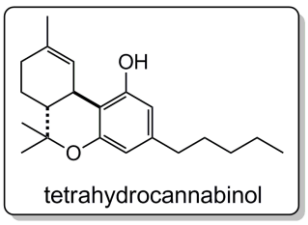
EST解析を基盤とするビベンジルカンナビノイド生合成遺伝子の探索

Exploring genes involved in bibenzyl cannabinoid biosynthesis based on EST analysis

○田浦　太志、兼目　裕充[1]、高橋　宏暢[1]、野路　征昭[1]、橋本　敏弘[1]、豊田　正夫[1]、浅川　義範[1]（九州大・薬、[1]徳島文理大・薬）

○ Futoshi Taura, Hiromichi Kenmoku[1], Hironobu Takahashi[1], Masaaki Noji[1], Toshihiro Hashimoto[1], Masao Toyota[1], Yoshinori Asakawa[1] (Kyushu University, [1]Tokushima Bunri University)

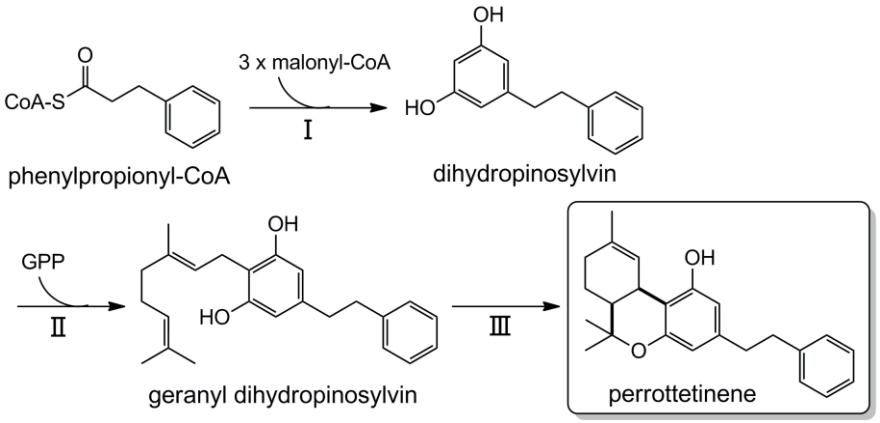
【目的】苔類ケビラゴケ科に属するオオケビラゴケ（*Radula perrottetii*）は、大麻のカンナビノイドtetrahydrocannabinol（右図）に構造が極めて類似したビベンジルカンナビノイドperrottetinene（下図）を含有することが知られている。本研究は次世代シークエンサーを用いたEST解析に基づきperrottetinene生合成経路の酵素遺伝子を初めて明らかにすることを目的とする。



【方法・結果】オオケビラゴケよりmRNAを抽出し、イルミナ社Genome Analyzer IIxによるmRNAショットガンシークエンスを行った。次いで得られた配列データについて各種ソフトウェアを用いたアセンブルを行うことでコンティグを作製し、これらをデータベースとするBLAST検索により、候補遺伝子を探索した。

即ち、perrottetineneが大麻のカンナビノイドと同様、Ⅲ型ポリケタイド合成酵素（Ⅰ）、芳香族プレニル転移酵素（Ⅱ）及び酸化閉環酵素（Ⅲ）の三種の酵素が関与する経路（下図）で生合成されると推測し、それぞれ既知酵素とホモロジーを示すコンティグを抽出した。

この結果、Ⅲ型ポリケタイド合成酵素の候補遺伝子を6種、芳香族プレニル転移酵素の候補遺伝子を8種、及び酸化閉環酵素の候補遺伝子として大麻のカンナビノイド合成酵素と相同性を持つ遺伝子4種を同定し、現在全長のクローニングを試みており、これら結果についてあわせて報告する。



cannabinoid, bibenzyl cannabinoid, biosynthesis

講演番号：3A06a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ A校舎06会場

紅藻ウラソゾ(*Laurencia nipponica*)由来のハロゲン化酵素の解析

Study on bromination enzyme from the red alga *Laurencia nipponica*

○金子 賢介、鷲尾 健司、森川 正章、沖野 龍文（北大院・環境）
○Kensuke Kaneko, Kenji Washio, Masaaki Morikawa, Tatsufumi Okino (Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University)

【目的】ソゾ(*Laurencia*)は世界各地の沿岸域に広く分布する紅藻類であり、これまでに 500 種類を越える二次代謝産物が報告されている。これらの化合物は、ウラソゾ(*L. nipponica*)が生産する環状エーテル laurencin のようにハロゲン(主に臭素)を多く含むことが特徴的である。臭素の導入と環状化反応はブロモペルオキシダーゼ(BPO)が触媒するとされているが、その情報は少ない。紅藻 *Corallina* 属のいくつかのサンゴモではバナジウム依存型 BPO(VBPO)をコードする遺伝子が単離され生化学的な解析がなされている。本研究ではソゾが生産する含臭素化合物の生合成のしくみを知るため、ウラソゾより VBPO の cDNA クローニングを行い、その酵素活性を調べた。

【方法】北海道忍路湾にて採取したウラソゾより cDNA を調製し、近縁海藻の VBPO 遺伝子の配列を参考に RACE-PCR 法により cDNA 断片を取得した。大腸菌内で組み換えタンパク質を発現して、可溶性画分を塩析後、陰イオン交換樹脂、ゲル濾過カラムにて精製した。ハロゲン化反応の標準基質であるモノクロロジメドン(MCD)を用いて精製酵素の活性を調べた。さらに天然化合物の前駆体に近いネロリドールを用いた臭素付加反応に供し、LC/MS により臭素付加産物を検出した。

【結果】cDNAクローニングの結果、配列の若干異なる二種類のcDNA断片(VBPO1, 2)を得た。それぞれの組み換えタンパク質は還元下SDS-PAGEで72kDa付近に泳動され、推定アミノ酸配列からの計算値(71.023, 71.127kDa)と同様な値を示した。VBPO1はDEAEカラムで、VBPO2はゲル濾過クロマトを併用することで精製された。MCDに対する反応はそれぞれ265, 34 U/mg protein程度の酵素活性を示した。ネロリドールに対してはVBPO1, 2ともに臭素付加化合物が検出された。検出された臭素付加化合物は、マススペクトルから、ミツデソゾ*L. okamurae*で報告のある天然化合物snyderolと一致した。以上により、VBPOがソゾ由来の含臭素化合物の生合成酵素であることが強く示唆された。

Laurencia, Bromoperoxidase, Brominated compounds

講演番号：3A06a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ A校舎06会場

ミドリサンゴ由来β-amyrin合成酵素F728残基の機能解析

Functional analysis of F728 residue involved in β-amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli,*

○増川　友夏里、橋本　一平、伊藤　遼介、仲野　千秋、佐藤　努、星野　力(新潟大院自然科学)
○Yukari Masukawa, Ippei Hashimoto, Ryosuke Ito ,Chiaki Nakano, Tsutomu Sato, Tsutomu Hoshino(Graduate School of Science and Technology, Niigata University)

【目的】β-amyrin合成酵素のF728は、トリテルペン環化酵素において高く保存されており、スクアレン−ホペン環化酵素(以下SHC)のF601に相当する。SHC F601残基は、カチオン/π相互作用により3環性及び4環性カチオン安定化に関与することが分かっている。[1] F728も同様の機能があるかどうか検討した。【方法】Quick change法により*Et*AS F728残基をA、H、L、V、W、Yに置換し、*S. cerevisiae* GIL77へ形質転換した。野生株と各変異株の酵素産物の変化を*in vivo*で解析した。【結果】H変異株の酵素産物を単離し図１に示す9個の産物（**1**～**9**）を同定した。β-amyrin生産量を野生株と比較すると、Y，A、H、W各変異株はそれぞれ75%, 0.73%、0.07%、2.74%であった。L、V変異株は活性が確認できなかった。Y変異株では高い活性を示したが、A変異株では著しく活性が低下した。この事は、カチオン/π相互作用を示唆する。W変異株は、β-amyrin生産量が非常に低下したが、Y変異株では見られない産物を約60%生産していた。W残基は、FやYと比較してサイズが非常に大きく他の残基の影響を受けて、カチオン/π相互作用のための適切な位置に配向されにくくなったためと考えられた。H変異株の主生成物は、NMRの構造解析によりgermnicolと決定した。H変異株の全生成物の約50.9%を占めた。その他は5環性産物が32.3%、4環性産物が11.3%、3環性産物が5.6%となった。これはHの塩基性(プロトン受容体) 、およびカチオン/π結合エネルギーの低さに起因する結果であると考えられる。以上より、F728残基の主な機能はSHC F601残基と同様にカチオン/π相互作用による、4環性中間体(dammarenyl cation)や5環性中間体カチオン(lupenyl cationやoleanyl cation)の安定化であると推測された。

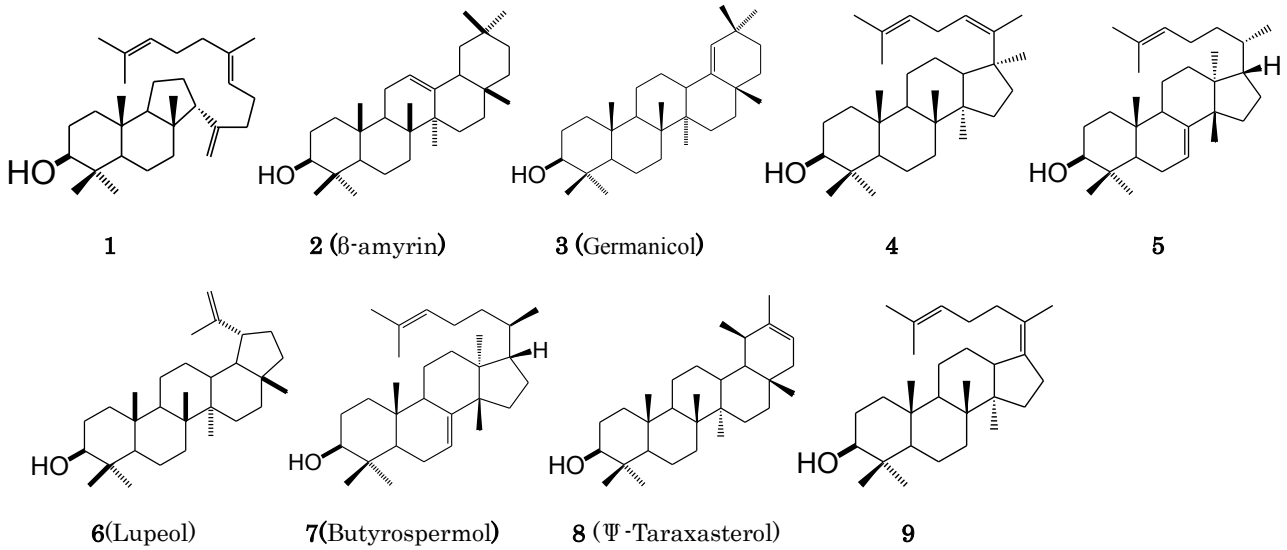


図1.　H変異株の酵素産物

1) *CHEM. COMMUN.*, 2002, 291–301.

β-amyrin, Triterpene, Oxidosqualene cyclase

講演番号：3A06a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ A校舎06会場

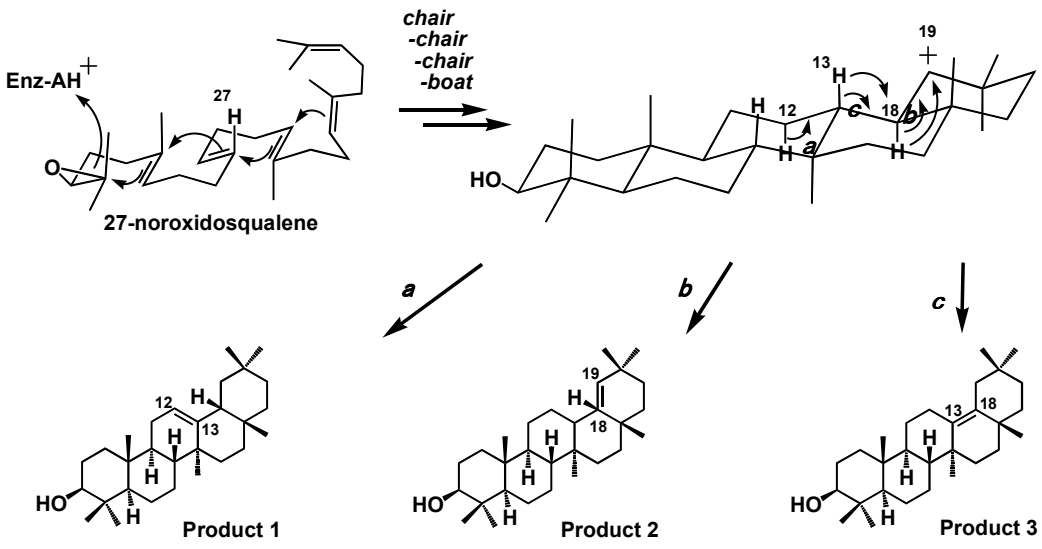
27-noroxidosqualene の β-アミリン合成酵素産物

Enzymatic products of 27-noroxidosqualene by β-amyrin synthase.

○山口　雄生、千葉　彬史、仲野千秋、佐藤　努、星野　力（新潟大院自然科学）
○Yuki Yamaguchi, Akifumi Chiba, Chiaki Nakano, Tsutomu Sato, Tsutomu Hoshino (Graduate school of Science and Technology, Niigata University)

「目的」オキシドスクワレン環化酵素（OSC)は、鎖状の 2,3-オキシドスクワレン(OXSQ)を基質として様々な環状トリテルペンへと環化する酵素群であり、生物界に広く分布している。OSC のラノステロール合成酵素やホペン合成酵素は、変異導入実験や基質アナログ実験等の研究が数多く報告されている。一方、植物に普遍的に存在する β-アミリン合成酵素(β-AS)の研究例は少ない。今回、OXSQ の 27-Me を欠損させた基質アナログ 27-ノルオキシドスクワレン(27-NorOXSQ)を用い、この β-AS の環化機構について、知見を得たので報告する。

「方法・結果」β-AS の基質アナログ 27-NorOXSQ を有機合成した。これを β-AS と酵素反応させ、GC-MS により、酵素産物を 5 個確認した。GC により、Product 1 と Product 2 と Product 3 が全酵素産物の 92.8%を占めていた。HPLC でこの主要産物 3 個を単離、NMR で構造を決定した。Product の構造から、Scheme 1 のような反応経路を推定した。なお、生成比率は、Product 1 ： Product 2 ： Product 3 = 4.0 ： 1.8 ： 1.0 だった。同定された Product は、本来の基質 OXSQ と同様の *chair-chair-chair-boat* 型の環化機構で生成したことから、27-Me の欠損は、環化のフォールディングにそれほど大きな影響を及ぼさないことが示唆された。環化率の観点からも全プロダクトの環化率 80.4%のうち、44.3%という大部分が β-アミリン相同体の Product 1 であったため、環化への影響が少ないことがうかがえた。また、二重結合の位置のみが異なった酵素産物が生成したが、これは、27-Me 欠損により、基質の正確なコンフォメーションが崩れ、脱プロトンの役割を持つアミノ酸が、Hα-12 ではなく、Hα-18 や Hα-13 に近づき、不正確に引き抜いてしまったためだとも考えられる。つまり、酵素は 27-Me を補足することにより、基質を正確にフォールディングしていることが示唆された。



Scheme 1. 27-NorOXSQ からの酵素産物と推定環化機構

Keyword1, Keyword2, Keyword3　β-amyrin, oxidosqualene, triterpene

講演番号:3A06a12
講演日時、会場:3月24日11:21～ A校舎06会場

好アルカリ性*Bacillus*属細菌由来の新規非環状セスタ・トリテルペンおよび新規テルペン合成酵素の同定

Identification of novel acyclic sester-, triterpene and terpene synthase from alkalophilic *Bacillus* species

佐藤 努、○山鹿 宏彰、鹿島 將志、中島 真美[1]、仲野 千秋、星野 力(新潟大自然科学・農応生化、[1]新潟大・機器分析センター)

Tsutomu Sato, ○Hiroaki Yamaga, Shoji Kashima, Mami Nakajima, Chiaki Nakano, Tsutomu Hoshino (Niigata University, [1] Center for Instrumental Analysis)

【目的】最近、枯草菌を含めた*Bacillus*属細菌に単環性と5環性C_{35}テルペンが存在することが分かってきている[1,2]。我々は、単環を形成するテルペン環化酵素（TS）が既知酵素の一次構造と類似性を持たない新型であることを明らかにし、C_{35}テルペンに対し新しい分類名「セスクアテルペン」を命名した[1)]。更に、*B. megaterium*の5環性セスクアテルペンを形成するテルペン環化酵素が、生体内においてC_{30}のスクアレンも基質とする二機能性酵素であることも証明している[2)]。*Bacillus*属細菌にはユニークなテルペン生合成経路が未だに潜んでいる可能性があり、今回は好アルカリ性*Bacillus*属をターゲットに研究を行った。【結果】３種類の好アルカリ性*Bacillus*属細菌（*B. clausii*, *B. halodurans*, *B. pseudofirmus*）は、ゲノム内にTSホモログを持っているにも関わらず、環状セスクアテルペンを生産しないことが分かった。一方で、デヒドロスクアレンに似たマススペクトルの化合物とそれよりも分子量の小さい類似化合物が検出された。*B. clausii*にはスクアレン合成酵素ホモログが存在しないことから、我々は「TSホモログが新規テルペンを生合成している」と予想し実験を行った。*B. clausii*を30 L培養し、２つの化合物を単離・構造決定したところ、head-to-tail型非環状の新規セスタ（**1**）及びトリテルペン（**2**）であった。好アルカリ性の*B. alcalophilus*はデヒドロスクアレンを生産することが報告されているが、我々が再実験したところ、デヒドロスクアレンはなく今回発見した**1**と**2**が検出された。現在、他8種の好アルカリ性*Bacillus*属における生産性を解析中であるが、類似構造を持つ非環状セスクアテルペンと予想されるピークも検出されている。更に、TSホモログが**1**と**2**の生合成に寄与していることを証明するため、*B. clausii*由来TSホモログの*in vitro*酵素反応を行うことにした。TSの基質を生合成すると予想されるヘプタプレニルニリン酸合成酵素（Hep）ホモログおよびTSホモログをpColdTFにクローニングし、大腸菌発現系から各々精製酵素を得た。^{14}C-IPPを用いた反応によって、HepホモログはC_{25}とC_{30}のポリプレニルニリン酸合成酵素であることを証明できた。そのC_{25}とC_{30}基質をTSホモログと反応させたところ、**1**と**2**が生成した。したがって、TSホモログが二機能性セスタ/トリテルペン合成酵素であることを証明できた。本研究により、TSホモログはC_{35}だけでなく様々なテルペン類の合成酵素のファミリーであることが判明するとともに、セスタテルペン合成酵素を初めて同定できた。1) T. Sato et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 9734-9737 (2011). 2) T. Sato et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 17540-17543 (2011).

terpenoid, terpene synthase, alkalophilic *Bacillus* species

講演番号：3A06a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ A校舎06会場

チャ*Camellia sinensis*の花における安定同位体標識L-フェニルアラニンからアセトフェノン、1-フェニルエタノールへの代謝変換経路の解析

Characterization of L-phenylalanine metabolism to acetophenone and 1-phenylethanol in the flowers of *Camellia sinensis* using stable isotope labeling

○DONG Fang, YANG Ziyin, BALDERMANN Susanne, 大西利幸, 渡辺修治 (静大)
○Fang DONG, Ziyin YANG, Susanne BALDERMANN, Toshiyuki OHNISHI, Naoharu WATANABE (Shizuoka Univ.)

【目的】アセトフェノン（AP）と 1-フェニルエタノール（1PE）はチャ *Camellia sinensis* の花に蓄積される主要香気成分である。多くの植物香気成分の生合成経路の解明研究は進んでいるが AP と 1PE の生合成経路は未解明であった。本研究においては、チャ花における L-フェニルアラニン(L-Phe)の AP と 1PE への変換経路を検討した。
【方法】安定同位体標識L-Phe(L-[$^{2}H_{8}$]PheとL-[$^{13}C_{9}$]Phe)の水溶液を、*C. sinensis* var. Yabukitaの花弁展開期に投与後、内在揮発性成分はhexane: ethyl acetate (1:1)によって抽出後、これをGC-MSにより分析した。不揮発性成分はmethanol/chloroform/waterによって抽出、上層濃縮乾固後、MSTFA誘導体としてGC-MS分析に供した。また、phenylalanine ammonia-lyase (PAL)特異的阻害剤2-aminoindane-2-phosphonic acid (AIP)のL-PheからAP、1PE生成に対する効果を検討した。
【結果】L-[$^{2}H_{8}$]Pheを投与した切り花において、[$^{2}H_{5}$]/[$^{2}H_{6}$]APおよび、[$^{2}H_{5}$]/[$^{2}H_{6}$]-1PEが検出された。同時に、仮想代謝中間体である[$^{2}H_{6}$]/[$^{2}H_{7}$]cinnamic acid (CA)、[$^{2}H_{7}$]phenylpyruvic acid (PPA)、[$^{2}H_{7}$]phenyllactic acid (PAA)も検出した。同様に、L-[$^{13}C_{9}$]Pheの投与では [$^{13}C_{8}$]AP、[$^{13}C_{8}$]-1PE、[$^{13}C_{9}$]CA、[$^{13}C_{9}$]PPA、[$^{13}C_{9}$]PAAを検出した。L-[$^{2}H_{8}$]Pheの投与実験では中間体において^{2}HとHが一部交換し、[$^{2}H_{5}$]/[$^{2}H_{6}$]AP、[$^{2}H_{5}$]/[$^{2}H_{6}$]-1PEの比率が大きくなることも確認した。したがって、[$^{2}H_{6}$]AP、[$^{2}H_{6}$]-1PEを与える経路が主要であると推定した。また、AIP(PAL特異的阻害剤)の投与により、同位体標識APと1PEの生成が顕著に抑制された。これらの結果に基づいて、チャ花では、APと1PEは、L-Phe からCA、3-ヒドロキシ-3-フェニルプロピオン酸（HPPA）、3-オキソ-3-フェニルプロピオン酸（OPPA）を経由して生成するものと推定した[1)]。L-PheからPPA、PAA、CA、HPPAとOPPAを通してAPと1PEに生成する経路の可能性については検討段階である。
謝辞: 本研究は、日本学術振興会の外国人特別研究員研究助成(To: ZY, ID NO. P10101)により実施された。AIP は Prof. J. Zon(Wroclaw University of Technology, Poland)に分与いただいた。
[1)] Dong, F. *et al*., *J. Plant Physiol.* in press.

Acetophenone, *Camellia sinensis*, 1-Phenylethanol

講演番号：3A06a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ A校舎06会場

強遮光処理条件下で栽培された白葉化茶の代謝物変動評価

Characterization of volatile and non-volatile metabolites in etiolated leaves of tea (*Camellia sinensis*) plants under a direct and thick shade

○友村 美穂[1]、楊子銀[2]、小林 栄人[3]、勝野 剛[2,3]、淺沼 俊倫[4]、藤森 玉輝[5]、石川 貴正[5]、望月 一男[6]、渡瀬 隆也[6]、中村 順行[3]、渡辺 修治[1,2] ([1] 静岡大学農学部, [2] 静岡大学創造科学技術大学院, [3] 静岡県農林技術研究所茶業研究センター, [4] 財団法人しずおか産業創造機構, [5] ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社, [6] 静岡県工業技術センター)

○Miho Tomomura,[1] Ziyin Yang,[2] Eiji Kobayashi,[3] Tsuyoshi Katsuno,[2,3] Toshimichi Asanuma,[4] Tamaki Fujimori,[5] Takamasa Ishikawa,[5] Kazuo Mochizuki,[6] Takaya Watase,[6] Yoriyuki Nakamura,[3] Naoharu Watanabe [1,2] ([1] Faculty of Agriculture Shizuoka University, [2] Graduate School of Science and Technology Shizuoka University, [3] Shizuoka Prefectural Research Institute of Agriculture and Forestry Tea Research Center, [4] The Shizuoka Organization for Creation of Industries, [5] Biomarker & Molecular Diagnostics Human Metabolome Technologies Inc., [6] Industrial Research Institute of Shizuoka Prefecture)

【目的】チャの香りは、チャの品質と特徴に影響する重要な要因の１つである。玉露とは煎茶の一種であるが、栽培段階で遮光処理を行うことで特徴的な香りが生じる。玉露では製造工程で揮発性成分内生量が増加することが報告されている。
本研究では強遮光条件下で栽培した新鮮葉における揮発性成分と代謝物の変動を評価することを目的とした。
【方法】静岡県茶業試験場において露地栽培されているやぶきた茶一番茶 (4月-5月) を、3週間厚いカバーで覆うことによる強遮光処理条件と非遮光処理条件で栽培したチャ葉を用いた。
香気成分は Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) により、代謝物は、Ultra performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (UPLC-TOFMS) 、Capillary Electrophoresis-time of flight mass spectrometry (CE-TOFMS) 、High performance liquid chromatography (HPLC) を用いて分析した。
【結果】強遮光処理を施すことによって、チャ葉は黄色化し、白葉化チャが得られた。非遮光処理条件で栽培したチャ葉に比べて、強遮光処理条件では香気成分、代謝物において著しい量的、質的相違が認められた。
すなわち、①揮発性フェニルプロパノイド/ベンゼノイド内生量の増加が顕著であった。②揮発性フェニルプロパノイド/ベンゼノイドの上流代謝物である解糖系およびペントースリン酸経路由来のリン酸代謝物とシキミ酸は減少した。③揮発性フェニルプロパノイド/ベンゼノイドの前駆体であるL-フェニルアラニンを含む多くのアミノ酸内生量は、増加した。
これらの結果より、強遮光処理によって、チャ葉中の芳香族アミノ酸プールとその下流の代謝が大きくなることが示唆された。

shaded tea,volatile, metabolite

講演番号：3A06a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ A校舎06会場

バラ香気成分 2-phenylethanol 生合成経路を変化させる要因と中間体解析

Analyses of intermediate and physiological and environmental factors related to the biosynthetic pathway of rose scent compound 2-phenylethanol

○神田桃代、平田拓[1]、石田晴香[2]、大西利幸[3]、渡辺修治[1]（静岡大農、[1]静岡大創科技院、[2]静岡大院農、[3]静岡大 GRL）

○Momoyo Kanda, Hiroshi Hirata[1], Haruka Ishida[2], Toshiyuki Ohnishi[3], Naoharu Watanabe[1] (Shizuoka Univ., [1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [3]Division of Young Research Leaders, Shizuoka Univ.)

【目的】2-Phenylethanol (2PE) はバラの香りを特徴づける重要な香気成分であり、L-[$^2H_8$]phenylalanine (L-[$^2H_8$]Phe) から、その α 位の水素を保持したまま[$^2H_8$]phenylacetaldehyde ([$^2H_8$]PAld) を介して [$^2H_8$]-2PE として生合成される（1-3）。最近、バラ花弁から調製したプロトプラストに L-[$^2H_8$]Phe を投与すると、11月から4月頃の間には無傷植物体と同様に [$^2H_8$]-2PE が生成されるが、5月から10月頃の間には [$^2H_7$]-2PE が主要な生成物として確認された。このことより PAld の前駆体として phenylpyruvic acid (PPA) を経由する時期特異的新規経路が想定された(4)。そこで本研究では、L-[$^2H_8$]Phe から、推定中間体 [^2H_n, n=6-7]PPA への変換を確認するとともに、季節における [^2H_n, n=6-7]PPA 変換活性を比較した。さらに、2PE 生成に影響する外部要因を調べるため、プロトプラストに外部刺激を与えて、[^2H_n, n=6-8]-2PE アイソトポローグ生成に与える影響を精査した。

【方法・結果】プロトプラストに L-[$^2H_8$]Phe を投与して、30 ℃で24 時間 インキュベートした。GC-MS, LC-MS 解析の結果、L-[$^2H_8$]Phe から [^2H_n, n=6-7]PPA と [$^2H_7$]-2PE を主要なアイソトポローグとする [^2H_n, n=6-8]-2PE への変換を確認した。また同様の条件で11月から4月、5月から10月の2つの季節から採取したバラ花弁から調製したプロトプラストにおける [^2H_n, n=6-7]PPA 変換活性を比較したところ、5月から10月期のプロトプラストで有意に高い変換活性が認められた。以上から、5月から10月期のバラでは新規生合成経路を亢進させる要因があると考えられた。そこで、季節によって変化すると考えられる外部環境として、温度（高温、低温）、酸素濃度（酸素欠乏）、塩濃度（高塩、低塩）を変化させ、[^2H_n, n=6-8]-2PE 生成量を GC-MS で評価した。その結果、夏期のバラでは温度ストレス、特に高温ストレスが生合成経路を変化させる要因であることが示唆されたが、同時に細胞生存率も低下していた。そこで、外部環境による 2PE 生成への季節差を検討するため、冬期のバラを用いて、同ストレスへの応答を精査する。

1) Hayashi, S. *et al. Tetrahedron,* **60**, 7005-7013 (2004).
2) Sakai, M. *et al. Biosci. Biotech. Biochem.*, **71**, 2408-2419 (2007).
3) Chen, X. *et al. J. Plant Physiol.*, **168**, 88-95 (2011).
4) Hirata, H. et al., *J. Plant Physiol*. (In Press)

2-phenylethanol, phenylpyruvic acid

講演番号：3A06p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ A校舎06会場

花芽誘導物質 LDS1 生合成経路の解明

Revealing biosynthetic pathway of flower inducing compound LDS1

○河橋 辰哉、村田 有明[1]、大西 利幸[2]、渡辺 修治[1] (静大院・農、[1]静大院・創造、[2]静大・GRL)
○Tatsuya Kawahashi, Ariaki Murata[1], Toshiyuki Ohnishi[2], Naoharu Watanabe[1] (Grad. School of Agric., Shizuoka Univ., [1]Grad. School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Division of Young Research Leaders, Shizuoka Univ.)

【目的】植物が栄養成長から生殖成長へ転換する現象は花成と呼ばれ、植物にとって次世代に子孫を残すための重要な現象である。一方、花成を制御する技術は農業・園芸の分野において大変重要かつ有益である。アオウキクサ (*Lemna paucicostata*) は花芽誘導活性試験が短期間で行えることから、花成研究に古くから用いられてきた。発表者らは乾燥処理を施したアオウキクサから (11*E*,15*Z*)-9,13-dihydroxy-10-oxooctadeca-11,15-dienoic acid (LDS1) を花芽誘導物質として単離・構造決定した (Refm 天然物)。LDS1 は乾燥処理時に内生量が増加する (12*Z*,15*Z*)-9-hydroxy-10-oxooctadeca-12,15-dienoic acid (KODA) の 13 位が酸化された構造であった。本研究では、アオウキクサにおいて KODA から LDS1 への変換を試み、LDS1 の生合成に関する知見を得ることを目的とした。また、既知の KODA 代謝経路である β-酸化経路、α-ketol 構造から diol 構造への還元経路と LDS1 生合成経路との関係について明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】LDS1 は KODA の 13 位に水酸基が結合し、12 位二重結合が 11 位に転位した構造を有する α-リノレン酸由来のオキシリピンである。加えて、乾燥処理時の LDS1 内生量は KODA に伴って増加することから、LDS1 は KODA を前駆体として生成することが示唆された。乾燥処理を施したアオウキクサに減圧湿潤法により [1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18-$^{13}C_{18}$] KODA ([U-^{13}C]KODA) を投与し、代謝物を LC-MS/MS 分析に供した。その結果、[U-^{13}C]LDS1 が LDS1 と同一保持時間に検出され、その MS^2 スペクトルにおいて LDS1 に特徴的なフラグメントパターンが検出されたことから [U-^{13}C]LDS1 を同定した。以上の事実は LDS1 が KODA を直接の前駆体として生成されることを示している。一方、非乾燥状態のアオウキクサに同様の方法を用いて KODA を投与すると、既知の代謝経路によって KODA の β-酸化体および α-ketol の還元体のみが検出され、LDS1 は生成しなかった。β-酸化体および α-ketol の還元体はアオウキクサに対して花芽誘導活性を示さないことから、既知の KODA 代謝経路は不要な KODA を代謝する不活性化経路であると考えられた。さらに、乾燥処理後のアオウキクサから粗酵素溶液を調製し、基質として [U-^{13}C]KODA を用いて酵素反応後、生成物を LC-MS/MS 分析に供した結果、[U-^{13}C]LDS1 が検出された。以上の結果から、LDS1 は KODA を前駆体とし、乾燥処理時にのみ活性を示す酵素によって生成されることが明らかとなった。

Oxylipin, KODA, Flower inducing

講演番号：3A06p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ A校舎06会場

オオイタドリの誘導抵抗反応におけるアミノ酸由来ニトリルの生合成

Induced nitrile biosynthesis from amino acid in the giant knotweed

○野下 浩二、阿部 誠、田母神 繁（秋県大・生資科）
○Koji Noge, Makoto Abe, Shigeru Tamogami (Akita Prefectural University)

【目的】昆虫食害に対する植物の防御反応のひとつとして、昆虫の食害を受けた植物葉がテルペンなど特有の揮発成分を誘導的に生成・放出すること、この揮発成分に天敵が誘引されることが知られている。これまでにマメコガネに食害されたオオイタドリ葉が、オシメンなどのテルペン類に加え、昆虫食害で誘導される揮発成分としては珍しいフェニルアセトニトリル（PheCN）を生成･放出することを見出した。また、PheCN 生成誘導がジャスモン酸メチル（MeJA）処理によって再現されることを明らかにした。植物のニトリルは、青酸配糖体やアルカロイドなど様々な植物二次代謝産物の生合成中間体として知られているが、その生合成は未解明の部分も多い。そこで、オオイタドリにおける PheCN 生合成経路を解明するために、化学構造の類似から PheCN がアミノ酸のフェニルアラニン（Phe）から生合成されると予想し、(1) 重水素標識した Phe が PheCN に取り込まれるか、(2) Phe 生合成を阻害するグリホサート処理により PheCN の生産が阻害されるか、(3) 昆虫食害や MeJA 処理により Phe 生成が誘導されるかを調べた。
【方法】重水素標識された Phe をオオイタドリ葉に取り込ませるために、切り取った葉の葉柄を重水素標識された Phe 水溶液に差し、25 °C、明条件下で静置した。これに、MeJA を暴露し、葉から放出される揮発成分を GC-MS で経時的に分析した。同様にして、オオイタドリ葉にグリホサートならびにグリホサートと重水素標識された Phe、対照として蒸留水を取り込ませ、MeJA で誘導をかけた場合の揮発成分の分析も行った。また、MeJA 処理によるオオイタドリ葉中のアミノ酸組成の経時的変動を以下の方法で調べた。揮発成分を分析した後のオオイタドリ葉を 0.1 M 塩酸中で破砕・抽出し、陽イオン交換系の固相抽出により、アミノ酸を含む塩基性化合物画分を得た。これをエタノール中でクロロギ酸エチルにより誘導体化し、GC-MS により定性・定量分析した。
【結果】オオイタドリ葉に重水素標識した Phe を与え、MeJA で処理すると、重水素標識された PheCN が生成した。一方、グリホサート処理した場合、MeJA による PheCN 生成誘導は阻害されたが、グリホサートとともに外生の Phe を与え、MeJA 処理した場合、PheCN の生成が確認できた。以上の結果から、オオイタドリにおいて PheCN は Phe から生合成されること、MeJA はその代謝系を活性化することを明らかにした。また、葉中のアミノ酸組成分析の結果、オオイタドリ葉中には通常 Phe は存在しないが、昆虫食害や MeJA 処理により、PheCN の前駆体である Phe が誘導的に生合成されることを見出した。グリホサート処理し、MeJA を暴露した場合、Phe の生成が認められなかったことから、MeJA はシキミ酸経路の上流を活性化する、すなわち Phe が de novo 合成されることが示唆された。

Fallopia sachalinensis, Methyl jasmonate, amino acid metabolism

講演番号：3A06p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ A校舎06会場

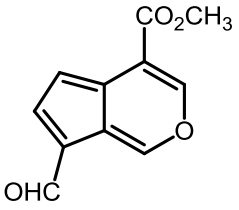
クチナシにおけるイリドイドcerbinalの傷害誘導とその生合成経路

The biosynthetic pathway of cerbinal in *Gardenia jasminoides*

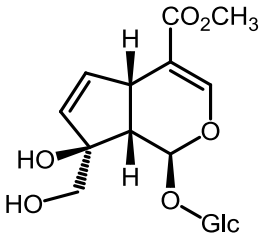
○内藤 裕彬、網干 貴子、吉永 直子、小野 肇、西田 律夫、森 直樹（京大院農・応用生命）
○Hiroaki Naito, Takako Aboshi, Naoko Yoshinaga, Hajime Ono, Ritsuo Nishida, Naoki Mori (Kyoto Univ.)

【目的】蒸留水中でホモジナイズしたクチナシ(*Gardenia jasminoides*)の葉を一晩置いた後にアセトニトリルで抽出すると、イリドイドの一種 cerbinal [1]が得られる。加熱処理した葉を用いると、ほとんど検出されないので、[1] は植物体内に前駆体として蓄積されており、傷害ストレスをきっかけとする酵素反応によって生成すると考えられる。しかし、これまでその生合成経路は不明であった。本研究では、傷害応答に関与するジャスモン酸処理による[1]の誘導とその生合成経路を調べた。

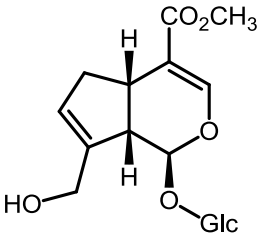
【方法と結果】[1]の生成と傷害応答の関連を検証するため、葉片をジャスモン酸水溶液(1 mM)に24時間処理した。ジャスモン酸処理時において[1]の生成量が増加し、[1]の生成が植物の傷害応答によるものであると示唆された。次に、葉抽出物中のイリドイド関連化合物を、LC/MS、GC/MSを用いて分析した。その結果、若葉からイリドイド配糖体である gardenoside [2]と geniposide [3]、古葉からは[2]を検出した。古葉からも[1]が生成するので、前駆体候補は[3]ではなく[2]であると仮定した。葉のホモジナイズ前後における [2]の量と[1]の量を比較したところ、前者の減少に伴い後者の増加を確認した。また、葉片を[2]水溶液(40 mM)に一晩静置後、[1]の生成量を測定したところ、[2]を加えない葉と比べ生成量が増加した。以上から、[1]の前駆体は[2]であると考えられる。



Cerbinal [1]



Gardenoside [2]



Geniposide [3]

Gardenia jasminoides, iridoid, cerbinal

講演番号：3A06p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ A校舎06会場

イネ *sl* 変異体に感染したごま葉枯病菌によるインドール-3-酢酸の生産

Production of indole-3-acetic acid by *Bipolaris oryzae* in rice *sl* mutant

○深水 愛理沙、石原 亨[1]、宮川 恒[2]、中島 廣光[1]、若狭 暁[3]（鳥取大院・農、[1]鳥取大・農、[2]京都大院・農、[3]東農大・応生科）

○Arisa Fukami, Atsushi Ishihara[1], Hishashi Miyagawa[2], Hiromitsu Nakajima[1], Kyo Wakasa[3] (Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [1]Fac. Agric., Tottori Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Fac. App. Bio., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】イネは病原菌の感染を受けると、抵抗反応の一部としてセロトニンを生成する。しかし、トリプタミンからセロトニンを合成できない*sl*変異体がごま葉枯病菌（*Bipolaris oryzae*）の感染を受けると、セロトニンの代わりにトリプタミンを蓄積する。さらに、トリプタミンに加えインドール-3-酢酸（IAA）も高濃度で蓄積することが見出された。本研究では、*B. oryzae*が感染した*sl*変異体におけるIAA蓄積のしくみを解明することを目的とした。

【方法】12 日間生育させたイネの第3葉に病原菌の胞子懸濁液を載せることで接種とした。同様の方法で塩化銅やトリプタミンの処理を行った。IAAを定量する場合は、葉の80%アセトン抽出物をSep-Pak C18カートリッジで分画して、LC-MS/MSのマルチプルリアクションモニタリング（MRM）モードで分析した。*B. oryzae*によるトリプタミンやセロトニンの代謝を調べるためには、液体培地で培養した*B. oryzae*にトリプタミンやセロトニンを投与して、一定時間後に培地中に蓄積したIAAまたは5-ヒドロキシIAAをLC-MS/MSまたはHPLCを用いて分析した。

【結果】*sl*変異体に*B. oryzae*を接種してIAAの蓄積量を調べた。IAAの蓄積量は、*B. oryzae*の接種によって、コントロールのおよそ20000倍に増加した。次に、他の病原菌の感染によってもIAAの蓄積が生じるのか検討した。*B. sorokiniana*の接種は*B. oryzae*と同様に高濃度のIAAの蓄積を引き起こしたが、*Magnaporthe grisea*を接種した場合にはIAAはほとんど増加しなかった。また、IAAの前駆物質であるトリプタミンや、イネに対してエリシター活性をもつ塩化銅を処理してもIAAの蓄積量はほとんど変化しなかった。さらに、トリプタミンの存在下で*B. oryzae*を培養したところ、培地中にIAAとインドール-3-エタノールが蓄積してくることがわかった。以上の結果から、*sl*変異体に高濃度のIAAが蓄積するのは、*B. oryzae*がトリプタミンを代謝したためと推定された。

次に、*B. oryzae*によるトリプタミンからIAAへの変換の意義を考察するために、トリプタミンとセロトニンが*B. oryzae*の生育に与える影響を調べた。その結果、トリプタミンもセロトニンも高濃度では*B. oryzae*の生育を著しく抑制することがわかった。さらに、*B. oryzae*はセロトニンを5-ヒドロキシIAAに変換した。したがって、*B. oryzae*によるトリプタミンやセロトニンの対応するカルボン酸への変換は、毒性を持つインドールアミン類を代謝するためであると推定された。

indole-3-acetic acid, *Bipolaris oryzae*, rice

講演番号:3A06p06
講演日時、会場:3月24日14:44～ A校舎06会場

ソルガムにおける5-deoxystrigolの酸化的代謝の解析

Oxidation of 5-deoxystrigol in sorghum

○本並　宜子[1]、中嶌　瞳[1,2]、上野　琴巳[1]、水谷　正治[1]、滝川　浩郷[1,2]、杉本　幸裕[1,2]（[1]神戸大院・農、[2] JST/JICA, SATREPS）

○Noriko Motonami, Hitomi Nakashima, Kotomi Ueno, Masaharu Mizutani, Hirosato Takikawa, Yukihiro Sugimoto ([1]Grad. School Agric. Sci., Kobe Univ., [2]JST/JICA SATREPS)

【目的】ストライゴラクトンは根寄生植物種子の発芽刺激物質として様々な植物の根滲出液から単離同定されている。ソルガム（*Sorghum bicolor*）の根滲出液より見出されているストライゴラクトンはsorgomolとsorgolactoneであり、これらは5-deoxystrigolを前駆体として、酸化と脱炭酸により生合成されると推測できる。本研究ではsorgomolを高生産するソルガムを材料として、安定同位体で標識した5-deoxystrigolの投与を行い、その酸化代謝物について検討した。

【方法】スーダンおよび日本で収集したソルガム29品種（NM01-29）を40%Long Ashton水耕液で水耕栽培し、1週間毎に水耕液を回収した。回収した水耕液を根寄生植物*S. hermonthica*に対する発芽試験に供し、ストライゴラクトン高生産品種を選抜した。各高生産品種の水耕液から根滲出物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製後LC-MS分析を行い、生産されるストライゴラクトンを同定した。Sorgomol高生産品種として選抜されたNM24を低リン酸条件下で水耕栽培し、根滲出物を活性炭に吸着させた。活性炭をアセトンに浸漬し、アセトン留去後の残渣からsorgomolを酢酸エチルで抽出した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製をした後、キラルカラムクロマトグラフィーに供して挙動を標品と比較することによりsorgomolの絶対立体配置を確認した。

代謝実験では、NM24をLong Ashton水耕液で14日間栽培した後、水道水に置換し(±)-[6’-D]-5-deoxystrigolを投与した。また、代謝変換における基質の立体特異性を調べるため、(±)-[6’-D]-2’-*epi*-5-deoxystrigolも同様に投与した。24時間後、水耕液からストライゴラクトンを酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製後、LC-MS分析を行った。

【結果】発芽刺激物を高生産するソルガムとしてNM24を選抜し、主たるストライゴラクトンとして(+)-sorgomolを同定した。NM24に(±)-[6’-D]-5-deoxystrigolを投与した結果、ラベル体を投与しなかった場合と比較してsorgomolの同位体パターンに顕著な違いが認められた。その違いは分子量が1大きいsorgomolが共存していると考えることで合理的に説明できた。一方、(±)-[6’-D]-2’-*epi*-5-deoxystrigolを投与した結果、新たな代謝産物の生成が確認された。そのLC-MS/MSにおける挙動は分子量が1大きい[6’-D]-2’-*epi*-sorgomolと一致した。以上のことから、NM24はC-2’位の立体配置に関係なく、5-deoxystrigolの9位の炭素を水酸化することが確認された。現在、5-deoxystrigolの4種の立体異性体を基質として酸化反応の立体特異性について詳細に解析している。

Strigolactone, biosynthesis, sorgomol

講演番号：3A06p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ A校舎06会場

キイロショウジョウバエ幼虫の脂肪酸 - アミノ酸縮合物(FACs)生合成におけるアミノ酸選択性

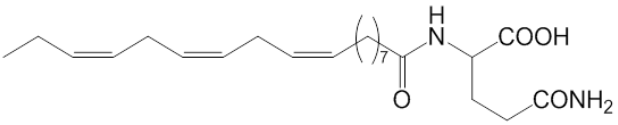
Amino acids selectivity of FACs biosynthesis in *Drosophila melanogaster* larvae

○吉田 哲也、吉永 直子、網干 貴子、福井 昌夫[1]、西田 律夫、森 直樹（京大院農・応用生命、[1]京大院農・応用生物）

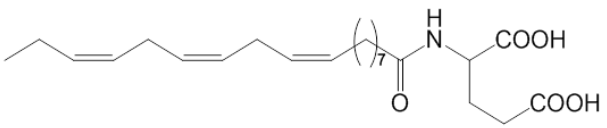
○Tetsuya Yoshida, Naoko Yoshinaga, Takako Aboshi, Masao Fukui, Ritsuo Nishida, Naoki Mori (Kyoto Univ.)

【目的】ある種の鱗翅目幼虫に食害されたトウモロコシやタバコは特有の揮発成分を放出する。幼虫の天敵である寄生蜂はこの揮発成分を利用して寄主を発見する。これは天敵が介在する植物の間接防御反応と位置付けられている。この植物に揮発成分を放出させるエリシターとして、昆虫の唾液から fatty acid-amino acid conjugates (FACs) が同定された。FACsは昆虫に不利に働く一方、グルタミン部分が幼虫の窒素代謝の効率化に役立っていると考えられている。我々はアミノ酸部分がグルタミン酸であるFACsを直翅目コオロギや双翅目キイロショウジョウバエから同定した。キイロショウジョウバエの腸管粗酵素抽出液を用いて、FACsのin vitro生合成を行うと、グルタミンタイプ及びグルタミン酸タイプのFACsが生合成された。しかし、キイロショウジョウバエはグルタミン酸タイプのFACsのみを持つ。このようにin vitroとin vivoで異なるアミノ酸部位のFACsを生合成する理由を解明するため、FACsのアミノ酸部分を決定する要因を調べた。

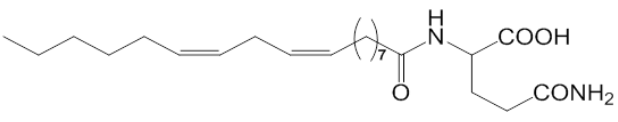
【方法と結果】まず、FACsの分解酵素に着目した。調製した腸管粗酵素抽出液とFACsをインキュベートし、FACsが分解されて生成する脂肪酸量をLCMSで経時的に測定した。さらにLineweaver-Burk plotを用いて分解酵素活性を比較したが、グルタミンタイプおよびグルタミン酸タイプのFACs間で分解活性に大きな差は見られなかった。次に腸管組織中のアミノ酸を分析したところ、ショウジョウバエはグルタミン酸を高濃度で蓄積していることを確認した。一方で、グルタミンタイプのFACsを持つハスモンヨトウの腸管組織を調べると、高濃度のグルタミンが確認できた。以上の結果から、昆虫において腸管組織中のアミノ酸組成が異なるアミノ酸部位のFACsを生合成する要因の一つであることが示唆された。



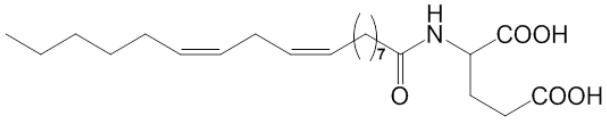
N-Linolenoyl-L-glutamine ((18:3)-グルタミン)



N-Linolenoyl-L-glutamic acid ((18:3)-グルタミン酸)



N-Linoleoyl-L-glutamine ((18:2)-グルタミン)



N-Linoleoyl-L-glutamic acid ((18:2)-グルタミン酸)

Insect-produced elicitors, Insect-plant interactions, Fatty acid-Amino acid Conjugates

講演番号：3A06p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ A校舎06会場

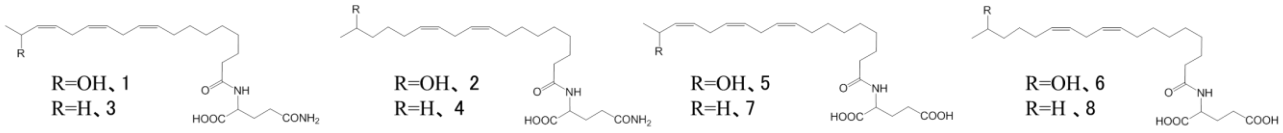
昆虫種間における volicitin 類縁体生合成能の比較

Comparision of biosynthetic activity of volicitin analogues among some insect species

○森田 沙代、内藤 裕彬、吉田 哲也、網干 貴子、吉永 直子、小野 肇、西田 律夫、森 直樹（京大院農・応用生命）

○Sayo Morita，Hiroaki Naito，Tetsuya Yoshida，Takako Aboshi，Naoko Yoshinaga，Hajime Ono，Rituo Nishida，Naoki Mori (Kyoto University)

【背景・目的】トウモロコシなどの植物がシロイチモジヨトウ幼虫に食害を受けると、揮発性成分を放出し、幼虫の天敵である寄生蜂はこの揮発性成分を利用し寄主を発見する（Alborn et al., 1997)。この防御応答は、幼虫の唾液に含まれるvolicitin [*N*-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutamin]が傷口に入ることで引き起こされる。Volicitin には8種の類縁体があり、いずれも脂肪酸とアミノ酸の縮合物である。アミノ酸部分については、グルタミン型(1、2、3、4)とグルタミン酸型(5、6、7、8)のみが知られている(図1)。何種かの昆虫について、保有する volicitin 類縁体の種類が調べられており、その組成は種によって異なる。例えば、ハスモンヨトウ、アワヨトウはグルタミン型のみを持ち、カイコはどちらも持たない(表1)。これまで、鱗翅目を用いた in vitro 生合成試験において、グルタミンしか縮合されないことが報告されている。一方、直翅目コオロギではグルタミン酸の縮合が報告され、グルタミン酸型の生合成経路が明らかになっている。この違いが見られる理由と生理的意義を解明するにあたって、生合成メカニズムを明らかにすることを目的とする。



1:Volicitin、2:*N*-(17-hydroxylinoleoyl)-L-glutamine、3:*N*-linolenoyl-L-glutamine、4:*N*-linoleoyl-L-glutamine
5: *N*-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutamic acid 、6: *N*-(17-hydroxylinoleoyl)-L-glutamic acid、7:*N*-linolenoyl-L-glutamic acid、8:*N*-linoleoyl-L-glutamic acid

図1 Volicitin 類縁体の構造式

【方法・結果】ハスモンヨトウ、アワヨトウ、カイコの幼虫の腸管から粗酵素抽出液を調製し、リノール酸ナトリウムおよびグルタミンまたはグルタミン酸とインキュベートした。その結果、3種の幼虫いずれもがグルタミンに対して高い縮合活性を示し、グルタミン酸に対してもわずかではあるが縮合活性を示した。粗酵素抽出液を用いてリノール酸ナトリウム及びグリシン、アラニン、スレオニン、アスパラギンの縮合アッセイを行った結果、これらのアミノ酸と縮合した volicitin 類縁体を保有しないにもかかわらず、いずれのアミノ酸に対しても縮合活性が見られた。以上の結果から昆虫の種類による生合成能を比較し、さらに様々な昆虫の縮合活性について追究した。

			1,2	3,4	5,6	7,8
鱗翅目	ヤガ科	ハスモンヨトウ	○	○	×	×
		アワヨトウ	○	○	×	×
	スズメガ科	オオスカシバ	○	○	×	×
		タバコスズメガ	○	○	○	○
	カイコガ科	カイコ	×	×	×	×
双翅目	ショウジョウバエ科	キイロショウジョウバエ	○	○	○	○
直翅目	コオロギ科	タイワンエンマコオロギ	○	○	○	○

表1 各種昆虫の保有するvolicitin類縁体
（番号は図1に対応）

FACs, insect, in vitro biosynthesis

講演番号：3A06p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ A校舎06会場

鱗翅目幼虫の腸管内におけるヒドロキシ脂肪酸

Hydroxy fatty acids in the gut of lepidopteran larvae

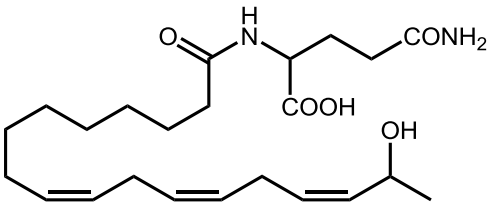
○村上 真一郎、網干 貴子[1]、吉永 直子[1]、小野 肇[1]、西田 律夫[1]、森 直樹[1]（京大農・応用生命、[1]京大院農・応用生命）

○Shinichiro Murakami , Takako Aboshi[1] , Naoko Yoshinaga[1] , Hajime Ono[1] , Ritsuo Nishida[1] , Naoki Mori[1] (Kyoto Univ., [1]Kyoto Univ. Grad. Sch.)

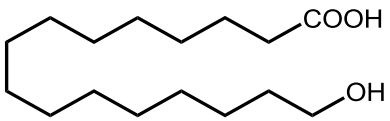
【目的】トウモロコシやタバコが鱗翅目幼虫の食害を受けたとき全身から揮発成分を放出し，寄生蜂はその香りを寄主認識の手がかりとする。この反応のきっかけとなるのが幼虫の吐き出し液中に含まれる volicitin [*N*-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutamine] である。Volicitin は幼虫腸管内で植物由来の linolenic acid と glutamine より生合成され，その後 17-hydroxylinolenic acidに分解されるが、その代謝経路については分かっていない。本研究では鱗翅目幼虫に含まれるヒドロキシ脂肪酸について分析を行った。

【方法と結果】ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* とカイコ *Bombyx mori* 幼虫の腸管内容物及びそれぞれの人工飼料（インセクタ、シルクメイト）の acetonitrile/water (1/1) 抽出物を LC/MS で分析した。ハスモンヨトウからは 17-hydroxylinolenic acid 及び volicitin の他に、hydroxylinoleic acid、 hydroxyoleic acid、 hydroxypalmitic acid に相当するピークが検出された。カイコからは volicitin は検出されなかったが、上記のヒドロキシ脂肪酸に相当するピークが検出された。同様のピークが人工飼料でも検出された。

また、リン脂質や中性脂質からはヒドロキシ脂肪酸は検出されなかった。一方、ハスモンヨトウ、カイコそれぞれの腸管内容物を脱脂後 sodium methoxide で処理すると hydroxylpalmitic acid を主成分とするヒドロキシ脂肪酸が生じた。人工飼料を処理すると、同じヒドロキシ脂肪酸のピークが検出された。ヒドロキシ基の位置を決定するためこれらを BSTFA で誘導体化し GC/MS で分析した。標品と保持時間、フラグメントパターンが一致したため、 16-hydroxypalmitic acid と同定した。鱗翅目幼虫体内において linolenic acid は glutamine と縮合して17位が水酸化されるが、脱脂残渣中の脂肪酸成分は同様の代謝を受けていないと考えられる。



Volicitin



16-Hydroxypalmitic acid

Hydroxyfatty acid, volicitin, *Spodoptera litura*

講演番号：3A06p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ A校舎06会場

タイトル　ホウレンソウケナガコナダニの脂質代謝

Title　Lipid metabolism of the Acarid mite, *Tyrophagus similis*

○網干 貴子[1], 本田 善之[2], 天野 洋[1], 森 直樹[1]（1 京大・農, 2 山口農総技）

○Takako Aboshi, Yoshiyuki Honda, Hiroshi Amano, Naoki Mori（1 Kyoto Univ., 2 Yamaguchi Tec. Cent. Agri. Fore.）

【目的】

近年，有機質資材を多用した畑においてコナダニ類が爆発的に増えており，ホウレンソウなどに甚大な被害が出ている．コナダニ類の発生をコントロールするために繁殖に関与する化学的因子の研究が行われているが，栄養代謝の研究はほとんど行われていない．一方，ダニの飼育においては脂質が重要な役割を示すことが知られている．そこで本研究では，ホウレンソウ加害の主要種であるホウレンソウケナガコナダニ *T. similis* の脂質代謝経路の解析を行った．

【方法・結果】

ホウレンソウケナガコナダニとその餌である乾燥酵母の脂質を Bligh-Dyer 法で抽出し，メタノールに転溶後，LCMS-IT-TOF で分析した．ホウレンソウケナガコナダニからは，主要なリン脂質として phosphatidylcholine（18:1-18:2，18:2-18:2），phosphatidylethanolamine（18:0-18:2）が検出された．一方，乾燥酵母からは PC（16:0-16:1）や PE（16:0-16:1）など飽和脂肪酸や二重結合が一つのアシル基のリン脂質が主要であり、多価不飽和脂肪酸を含むリン脂質は検出されなかった．なお，各リン脂質の同定には，精密質量と MS/MS により生じるプロダクトイオンを用いた．

乾燥酵母に含まれる遊離脂肪酸を分析したところ，16:0，16:1，18:0，18:1，18:2 の脂肪酸が検出された．ダニから検出されたリン脂質の多価不飽和脂肪酸部分は乾燥酵母に含まれる遊離脂肪酸に由来すると推測し，リノレン酸（18:3）を添加した乾燥酵母（5%）でダニを 3 日飼育したところ，ダニから PC（18:3-18:3）が検出された．ホウレンソウケナガコナダニは多価不飽和脂肪酸を積極的にリン脂質に取り込んでいると示唆された．

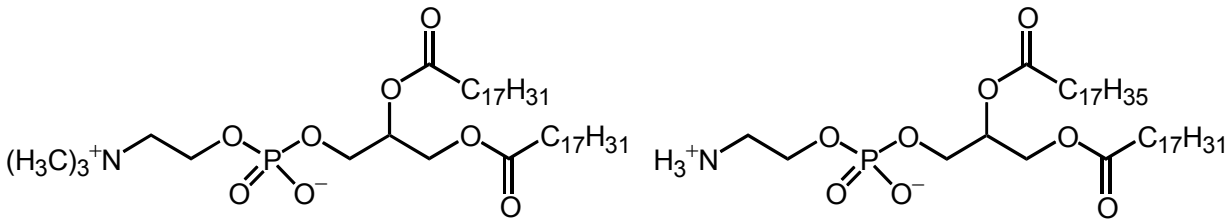


図 PC（18:2-18:2）と PE（18:0-18:2）の構造

Keyword1 Tyrophagus similis, Keyword2 phospholipid, Keyword3 unsaturated fatty acid

講演番号：3A06p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ A校舎06会場

沖縄産シリケンイモリ(*Cynops ensicauda popei*)の新規テトロドトキシン類縁体の単離・構造決定、及びイモリとフグの毒組成比較

Isolation and the structures of the new tetrodotoxin analogs from the Okinawan newt, *Cynops ensicauda popei,* and comparison of toxin composition between newt and puffer fish

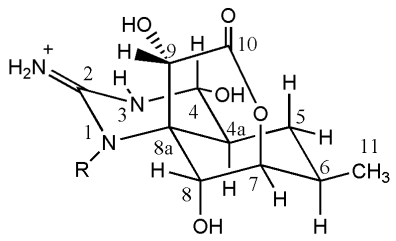
○工藤雄大、此木敬一、長由扶子、安元健[1]、山下まり（東北大・院農、[1]食品分セ）

○Yuta Kudo, Keiichi Konoki, Yuko Cho, Takeshi Yasumoto[1], and Mari Yotsu-Yamashita （Tohoku Univ, [1]Japan Food Research Laboratories）

【目的】テトロドトキシン (TTX)は多様な生物が持つ強力な神経毒である。TTXには多くの類縁体が存在し、イモリは6-*epi*TTXを多く持つ。TTX類縁体は、TTXの起源や生合成経路を解明する手掛かりになると思われる。今回HILIC-ESI-MS (Hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry)を用いて、沖縄産のシリケンイモリ (*Cynops ensicauda popei*)の抽出物を精査したところ、新たな類縁体と思われる化合物が数種検出されたため、これらの新規TTX類縁体の単離・構造決定を行った。またイモリと海洋生物におけるTTX類縁体の相違点を明らかにするため、イモリとフグのTTX類縁体の組成を比較し、考察を行った。

【方法】*C. e. popei* (170 g)を0.2 M 酢酸で加熱抽出し、活性炭カラムで粗精製し、LC-MSを用いて未知のTTX類縁体を探索した。未知成分4種 (**1**, **2**, **3**, **4**)を弱酸性陽イオン交換カラムBio-Rex 70 (Bio-Rad)、HITACHI GEL #3011-C、ゲル濾過カラムTSK gel G1000PW (Tosoh)で精製し、約0.35 mg(**1**), 0.25 mg (**2**), 0.06 mg (**3**), 1.2 mg (**4**)を得た。これら4成分の分子式を高分解能FAB-MSより決定し、NMRにて構造解析した。また*C. e. popei*全体、コモンフグ (*Fugu poecilonotus)*卵巣の粗精製物に含まれる各TTX類縁体をLC/MS (SIM, MRM)を用いて定性・定量分析した。

【結果】高分解能FAB-MSより**1**, **2**, **3**, **4**の分子式をそれぞれ、$C_{11}H_{17}O_5N_3$、$C_{11}H_{15}O_4N_3$、$C_{11}H_{17}O_6N_3$、$C_{11}H_{15}O_5N_3$と決定した。各種NMRデータの比較、及び1D NOESYでH8/H9の相関が見られたことなどから、**1**を8-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX（下図）、**2**をその4,9-anhydro体、**3**を1-hydroxy-8-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX (下図)、**4**をその4,4a-anhydro体と構造決定した。TTXの8-*epi*体の報告は今までない。今回、イモリから見つかった8-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX型のTTX類縁体はフグでは検出されず、逆にフグ卵巣に大量に存在する5,6,11-trideoxyTTXはイモリから検出されなかった。我々は5,6,11-trideoxyTTXからの酸化反応によりTTXが生成されると予想している。しかしイモリに8-*epi*TTXは極微量しか含まれていないことが^{1}H-^{1}H COSYより推定されたことから、**1**はほとんどTTX型に変換されないと考えられる。



1 R=H :8-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX
3 R=OH:1-hydroxy-8-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX

tetrodotoxin, newt, puffer fish

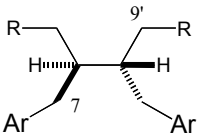
講演番号：3A06p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ A校舎06会場

7,9'-エポキシリグナンであるラリシレジノールの9位誘導体の植物生長阻害活性

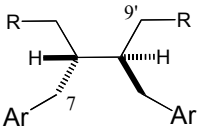
Plant growth inhibitory activity of 9-derivatives of 7,9'-epoxylignane

○熊本光子、西脇寿、首藤義博、山内聡（愛大・農）
○Mitsuko Kumamoto, Hisashi Nishiwaki, Yoshihiro Shuto, Satoshi Yamauchi (Aidai)

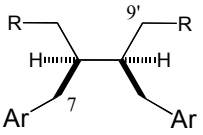
【目的】ブタン型リグナンであるdihydroguaiaretic acidの３つの立体異性体**1-3**およびブタンジオール型リグナンであるsecoisolariciresinolの３つの立体異性体**4-6**のうち、**1**と**3**の1 mMでのシバ根の生長率が30-50%であった。また、7,9'-エポキシリグナンであるラリシレジノールの天然体である(7*R*,8*S*,8'*S*)体 (**7**)および(7*S*,8*S*,8'*R*)体**8**が1 mMでシバの根に対して約50%の生長率を示した。今回は、ラリシレジノールの低濃度での活性、および9位の誘導体の活性を調べることを目的とした。



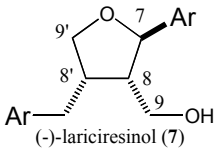
R = H: (-)-dihydroguaiaretic acid (**1**)
R = OH: (-)-secoisolariciresinol (**4**)



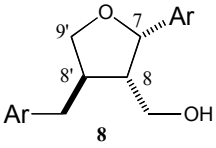
R = H: (+)-dihydroguaiaretic acid (**2**)
R = OH: (+)-secoisolariciresinol (**5**)



R = H: *meso*-dihydroguaiaretic acid (**3**)
R = OH: *meso*-secoisolariciresinol (**6**)



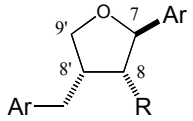
(-)-lariciresinol (**7**)



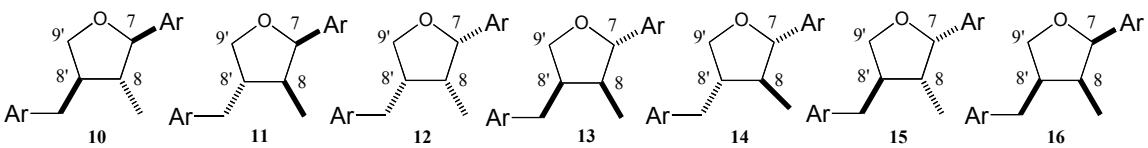
8

Ar = 4-hydroxy-3-methoxyphenyl

【方法・結果】ラリシレジノールのすべての立体異性体の低濃度でのシバの根に対する生長率を調べたところ、1 mMで生長阻害活性を示した(7*R*,8*S*,8'*S*)体 (**7**)および(7*S*,8*S*,8'*R*)体 **8**が0.1-100 μmolでコントロールとの優位差はないものの生長促進の傾向を示した。次に、9位の誘導体の合成を行った。すべてのラリシレジノール立体異性体のフェノール性水酸基をベンジル基で保護した化合物に対して、9位の水酸基をメシル化した後、Super-hydride還元、脱ベンジル化を行い9-dehydroxy体**9-16**を得、活性を比較した。その結果、天然の(-)-ラリシレジノールと同じ立体構造である**9**が1 mMでのシバの根に対する生長率がコントロールの9%、レタスの根に対しては60%であり、全立体異性体の中で最も高い活性を示した。そこで、他の誘導体の立体構造は(7*R*,8*S*,8'*S*)体に固定した。水酸基のメチル化、アセチル化によって**17**, **18**を得た。また、メシル化に続くNaCNとの反応を利用して**19**を得た。さらに、アルデヒドへ酸化した後、Wittig反応を利用して**20**を調整し、ジメチルアミンとの反応、還元を利用して**21**を得た。**17-20**は1 mMでシバの根の生長率が30-50%であった。ジメチルアミン体**21**はシバに対しては全く活性を示さなかったが、レタスの根の生長を1 mMで54%に抑制した。これまでの結果から、(-)-ラリシレジノールの9位の誘導体では、9-dehydroxy体 **9**が最も高い活性を示した。



9: R = CH_3 **17**: R =CH_2 OCH_3
18: R = CH_2OAc **19**: R = CN
20: R = CH_2CH_3 **21**: R = $CH_2N(CH_3)_2$



10 **11** **12** **13** **14** **15** **16**

Ar = 4-hydroxy-3-methoxyphenyl

Lignan, Lariciresinol, Epoxylignane

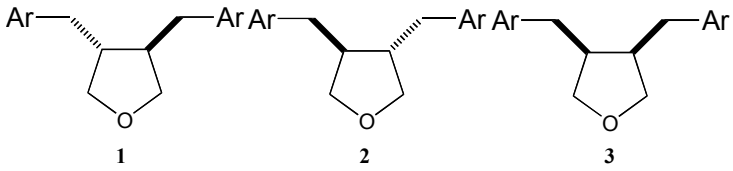
講演番号：3A06p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ A校舎06会場

7,7'-エポキシリグナンの立体構造と植物生長阻害活性

Relationship between stereochemistry of 7,7'-epoxylignane and plant growth inhibitory activity

○中山矩美子、熊本光子、西脇寿、首藤義博、山内聡（愛大・農）
○ Kumiko Nakayama, Mitsuko Kumamoto, Hisashi Nishiwaki, Yoshihiro Shuto, Satoshi Yamauchi (Aidai)

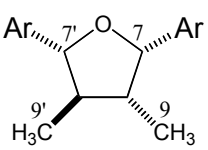
【目的】これまでに、３置換テトラヒドロフラン型リグナンの立体構造と植物生長阻害活性との関係を明らかにした。本研究ではテトラヒドロフラン環構造が活性に与える影響を示し、４置換テトラヒドロフラン型リグナン、すなわち7,7'-エポキシリグナンの一つである(-)-及び(+)-verrucosin (**4**)及び(**10**)の植物生長阻害活性と、立体構造が活性に与える影響を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】まず、テトラヒドロフラン環が活性に与える影響を調べるために、２置換テトラヒドロフラン型リグナンである9,9'-エポキシリグナンの３つの立体異性体**1-3**の植物生長阻害活性を調べたが活性は観察されなかった。



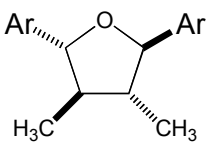
1 **2** **3**

Ar = 4-hydroxy-3-methoxyphenyl

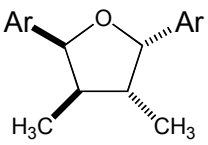
次に、４置換テトラヒドロフラン型リグナンである7,7'-エポキシリグナンのすべての立体異性体の合成を行い、活性を調べた。立体の構築のために、Evansの*syn*アルドール縮合、立体選択的S_N1分子内エーテル化、ヘミアセタールへの水素添加、共役オレフィンへのヒドロボレーション等を利用した。9,9'-ジメトキシ体および9,9'-ジオール体には目立った活性は観察されなかったが、9および9'位に置換基を持たない**4-13**のうちverrucosinの両鏡像異性体**4**と**10**は、シバの根に対する生長率がそれぞれ17%, 2%で、レタスの根に対する生長率はそれぞれ6%, 69%であり、他の立体異性体と比べて活性が高かった。以上の結果、および前演者の３置換テトラヒドロフラン型リグナンの活性研究から、植物生長阻害活性には、疎水性のアルキル基を持つ３または４置換テトラヒドロフラン環が重要であることが示唆された。



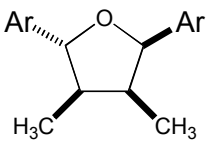
(-)-verrucosin (**4**)



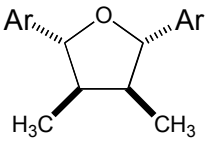
(-)-**5**



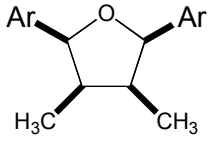
(-)-saucernetin diol (**6**)



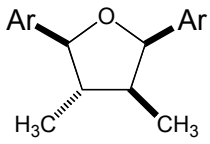
7



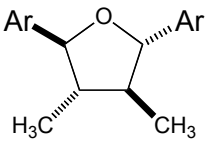
nectandrin B (**8**)



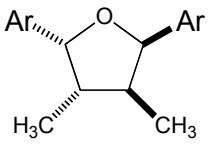
9



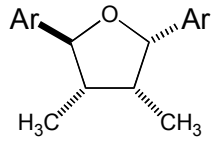
(+)-verrucosin (**10**)



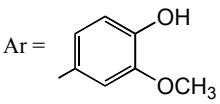
(+)-fragransin A2 (**11**)



(+)-**12**



13



Lignan, Verrucosin, Epoxylignane

講演番号：3A06p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ A校舎06会場

確実なペプチド配列解析を目指したESI-MS/MSにおけるイオン系列分離法の開発研究

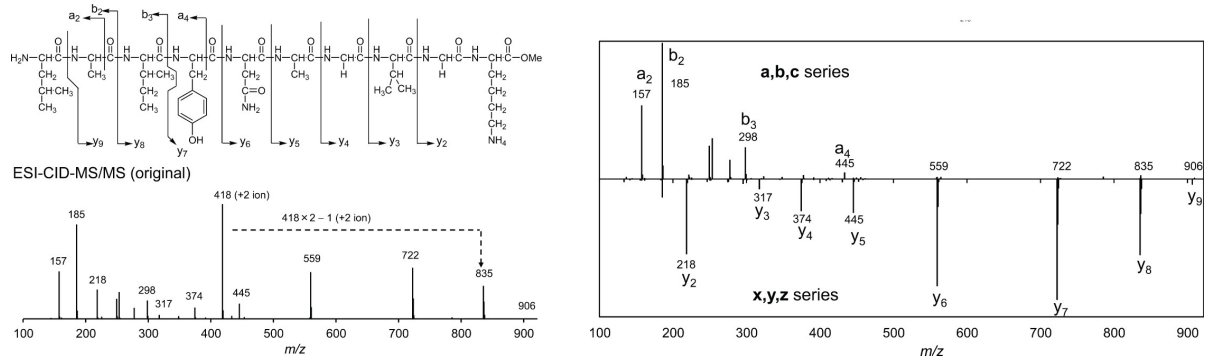
Selection of abc/xyz ions in the ESI-MS/MS of peptides

○金丸 沙樹・坂元 君年・紺野 勝弘[1]・橋本 勝（富山大・和漢研[1]、弘前大・農学生命）

○Saki kanamaru, Kimitoshi Sakamoto, Katsuhiro Konno,[1] Masaru Hashimoto (Institute of Natural Medicine, University of Toyama[1], Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University)

【目的】近年、質量分析装置の発展は著しい。CID-MS/MS法はペプチドの配列解析に広く利用されている。しかし、MS/MS解析では観測した多くのプロダクトイオンから必要なフラッグメントイオンの抽出、またイオンの演繹的帰属は困難であり、実際には遺伝子情報やインフォマティック技術の併用により帰属精度を高めている。従って、非天然アミノ酸を含むペプチド性天然物の構造決定では必ずしも精度が高いとは言えない。報告者らは、*N*末端側（a,b,cイオン）、および*C*末端側（x,y,zイオン）を区別して観測する方法の開発を行った。

【方法･結果】質量差を有する二種のラベル基を導入し、MS/MSスペクトルを比較すれば、ラベル基を含むイオンではその質量差を維持して観測されるが、ラベル基を含まないイオンは同一質量に観測されるはずである。導入する二つのラベル基によるペプチド全体のMS/MSスペクトルにおける挙動変化を最小にすること、また簡便なラベル基の導入を目的に*C*末端にメチルおよび重メチルエステルを導入したisotopomerを利用することにした。ラベル基の導入はメタノールあるいは重メタノール溶媒中、酸触媒により効率よく行うことができた。重メタノールを溶媒に用いた場合、アミドプロトンも重水素に置換されるが、LCMSでの分離過程でプロトンへの再置換が起こり、後処理を行わない場合でも十分な品質で目的のMS/MSスペクトルが得られた。得られた二つのisotopomer MS/MSスペクトルについて、①直接差スペクトル、および②重水素ラベルisotopomerのスペクトルについて質量を3 u減じた後に差スペクトルとすることにより、①a,b,cフラッグメントに由来するイオン、②x,y,zフラッグメントに由来するイオンを効果的に消去することができ、その後の加工により両フラッグメントを区別して表現することができた（下図参照）。



メタノール/重メタノール混合液を用いることで一回の測定で解析することができるため、オンライン化も可能となる。実際に試みたところ、ターゲットイオン選択幅を調整することにより、同様なスペクトルが得られることが判明した。

ESI-CID-MS/MS, peptide sequence, new analytical method

講演番号：3A06p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ A校舎06会場

酵素リパーゼの鏡像体選択性の機構解明に向けた大規模生体分子量子化学計算

Large-scale biomolecular quantum chemical calculations toward elucidating the mechanism of lipase enantioselectivity

○矢城 陽一朗[1,2]、守屋 陽輔[2]、今川 敦[2,3]、木村 崇知[3]、亀澤 誠[3]、直島 好伸[1,2]
（[1]岡山理大・自然科学研、[2]岡山理大院・総合情報、[3]甲南化工）
○Yoichiro Yagi[1,2], Yosuke Moriya[2], Atsushi Imagawa[2,3], Takatomo Kimura[3], Makoto Kamezawa[3], Yoshinobu Naoshima[1,2] ([1]Institute of Natural Science, Okayama University of Science, [2]Graduate School of Informatics, Okayama University of Science, [3]Konan Chemical Industry Co., Ltd)

【目的】我々は、酵素リパーゼと第２級アルコール系エステルの複合体に対して、分子動力学計算やフラグメント分子軌道（FMO）法による量子化学計算などの生体分子化学計算の手法を使って、酵素リパーゼの鏡像体選択性をある程度正確に予測し得る可能性を見出してきた。本研究は、上述の生体分子化学計算により、有機合成で多用されている酵素リパーゼの一つである *Burkholderia cepacia* Lipase（BCL）の第２級アルコール系エステルに対する鏡像体選択性やその大小の明確な予測，ならびにBCLの鏡像体認識機構の解明を目的としている。
【方法と結果】先ず、Protein Data BankからBCLのX線解析構造（PDB code : 1HQD）をダウンロードし、BCLの活性中心であるSER87付近に、コンピュータ上で構築した基質エステルをドッキングさせ、BCLと基質の複合体構造を構築した。ついで、生体分子計算ソフトウェアAMBERを用いて複合体の周囲8Åに水分子を配置し、エネルギー極小化計算で構造を調整した後、2000psにわたる分子動力学計算を行った。引き続いて，分子動力学計算で得られた500ps、1000ps、1500ps、および2000psにおける計4種の複合体構造それぞれについて、周囲の水分子を除去した後、MP2/6-31GレベルでのFMOによる複合体全体の量子化学計算を実施した。

FMO計算で算出した基質エステルとBCLのアミノ酸残基との相互作用エネルギーの解析から、選択性が高い芳香族エステルの(*R*)-体は、計算した４種の複合体全てにおいて、BCLのHIS286と強く相互作用していることを見出した。さらに、HIS286以外にも、基質の種類によってTHR18やGLY19、ASP264、TYR29、LEU287など、それぞれの(*R*)-体と作用する特有のアミノ酸残基が存在することが判明した。それに対して(*S*)-体では、(*R*)-体と強く相互作用しているアミノ酸残基との相互作用は、非常に弱いか、ほとんどみられなかった。すなわち、選択性が高い芳香族エステルの(*R*)-体と(*S*)-体では、相互作用している酵素BCLのアミノ酸残基が違っていることが認められ、相互作用のパターンが異なっていることが明確となった。これらのことから、HIS286などのアミノ酸残基が、BCLの鏡像体認識に関与していると考えられる。一方、選択性の低い脂肪族エステルの(*R*)-体と(*S*)-体では、HIS286を含むBCLの共通したアミノ酸残基と弱く相互作用していることが観察され、また、相互作用パターンが比較的似ていることが明らかとなった。これらの結果は、酵素リパーゼの鏡像体認識機構の解明の手掛かりとなり、且つ活性部位を含んだ酵素全体の電子状態計算や酵素反応の遷移状態計算を試行する際に有用な情報となることが期待できる。

Quantum chemical calculation, Lipase, Enantioselectivity

講演番号：3A06p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ A校舎06会場

植物フラボノイドのDNAポリメラーゼ／DNAトポイソメラーゼ阻害活性とヒトがん細胞増殖への影響

Effect of plant flavonoids on human cancer cell growth suppression based on DNA polymerase and topoisomerase inhibition

○塩見 一明[1]、栗山 磯子[1]、吉田 弘美[1,2]、水品 善之[1,2]（[1]神戸学院大栄養・栄養、[2]神戸学院大・LSC）

○Kazuaki Shiomi[1], Isoko Kuriyama[1], Hiromi Yoshida[1,2], Yoshiyuki Mizushina[1,2] ([1]Kobe-Gakuin Univ., Dept. of Nutr. Sci., [2]Kobe-Gakuin Univ., LSC)

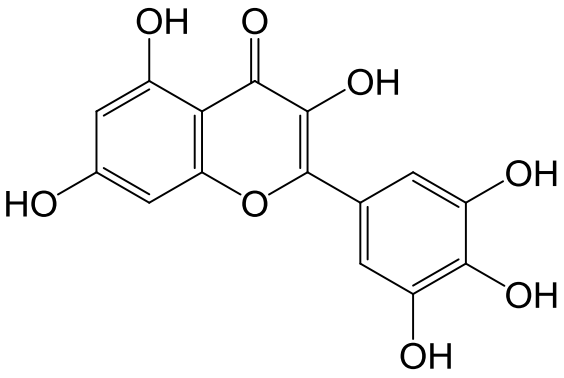
【目的】ポリフェノールの一種であるフラボノイドは、野菜や果物など植物系食品素材に存在する。フラボンもしくはフラバノンを母核とするフラボノイド類に注目して、哺乳類のDNA合成酵素（DNAポリメラーゼ、pol）とDNAのねじれを巻き戻すDNAトポイソメラーゼ（topo）に対する阻害活性を調査することで、フラボノイドの生理活性と健康機能性の探索を行った。

【方法】14種類のフラボノイド類は、Sigma-Aldrich社などの市販品（全て98%以上の純度）を使用した。polは精製酵素を準備して、*in vitro*の活性測定を実施した[1]。topoは常法によりNicking/Catalytic 活性を測定した。ヒト大腸がん細胞（HCT116 cells）増殖抑制活性とヒト正常細胞（皮膚上皮線維芽細胞：Human Dermal Fibroblasts）はWST-1法で測定した。細胞周期はヨウ化プロピジウム（PI）で細胞核を染色後、フローサイトメーターで解析した。

【結果】14種類のフラボノイド類（200μM）において、哺乳類polを阻害したのは、水酸基を有するものであり、その中で最も強い阻害活性を示したのは水酸基の数が最多（６つ）のミリセチン【図１】であった。フラボノイドの配糖体よりもアグリコンの方がpolを強く阻害した。

ミリセチンは、調査した全ての哺乳類pol分子種を阻害したが、最も強く阻害したのはDNA修復型のpolκであった。DNA複製型のpolαとDNA修復型のpolκの阻害様式は鋳型DNAに対して「拮抗型」、ヌクレオチドに対して「非拮抗型」であった。一方、DNA修復型のpolβに対する阻害様式は鋳型DNAに対して「非拮抗型」、ヌクレオチドに対して「拮抗型」であった。本物質のpolβ阻害活性は、DNAに作用するドキソルビシン（Dox）や臭化エチジウム（EtBr）との併用効果が見られた。しかし、polαとpolκについては併用効果はなかった。ミリセチンはヒトtopo Iを阻害せず、ヒトtopo IIのみを阻害した。また、pol、topo以外のDNA代謝系酵素を阻害しなかった。

ミリセチンは、ヒト大腸がん細胞の増殖を抑制し、細胞周期をG2/M期で停止した。一方、ヒト正常細胞の増殖には影響しなかった。ミリセチンはtopo II阻害活性に基づいたがん細胞増殖抑制効果が期待できる。



【図１】ミリセチン

[1] 特許第3821867号、発明者：水品善之他

Flavonoids, Myricetin, Anti-cancer activity

講演番号：3A06p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ A校舎06会場

フロフラボノイド類の合成及び前骨髄性白血病細胞HL-60増殖抑制活性

Synthesis of furoflavonoids and their antiproliferative activity on HL-60

○齋藤裕介[1]、川井悟[1]、常盤野哲生[2]、吉澤結子[2]（[1]東電大理工、[2]秋田県大生資科）
○Yusuke Saito[1], Satoru Kawaii[1], Tokiwano Tetuo[2], Yuko Yoshizawa[2]
（[1] Tokyo Denki Univ., [2] Akita Pref. Univ.）

【目的】マメ科植物である*Pongamia glabra*が生産するglaboneや*Lonchocarpus montanus*に含まれるlanceolatine Bをはじめとして、天然資源中にはフラボン骨格A環にフラン環が縮合したフロフラボノイド類が数多く存在する。これらは抗がん作用や抗菌作用など興味深い生理活性を有することが報告されており、縮合したフラン環がフラボノイドの生物活性にどのような影響を及ぼしているか興味が持たれている。しかし、いずれも微量にしか存在しないためその生理活性に対する知見は十分とは言い難い。そこで本研究ではフラボン骨格のA環にフラン環を導入したフロフラボノイド類を中心とした系統的合成を進めている。これらの生物活性を比較することでフラン環の縮合位置、およびその他の含酸素官能基の種類や結合位置が生物活性にどのような影響を及ぼすかを検証し、フロフラボノイド類における構造活性相関に関する知見を得ることを目的としている。生物活性は前骨髄性白血病細胞HL-60増殖抑制を指標とした。

【方法】フラボノイドにフラン環を導入するため、ジヒドロキシアセトフェノン類を出発物質としてBschlerのインドール合成に類似の環化反応を経ることで*ortho*-ヒドロキシアセチルベンゾフラン類を合成した。このベンゾフラン骨格の2･3位無置換体合成にはブロモアセトアルデヒドジエチルアセタールを、2･3位置換体合成にはα-ハロケトン類を反応物に用いて合成した。また上記の方法では結合位置の違いにより異性体を生じ、全行程収率の低下と置換する官能基により異性体の単離が困難となるためメチル基による環化制限を行い、選択的に環化した*ortho*-ヒドロキシアセチルベンゾフラン類も合成した。このようにして得られた*ortho*-ヒドロキシアセチルベンゾフラン類を用いて、ベンズアルデヒド類と塩基性条件下でのClaisen-Schmidt縮合反応によりフロカルコンを合成し、その後ヨウ素環化反応によりフロフラボンを合成した。合成したフロフラボノイド類の生物活性は、がん細胞に対する増殖抑制活性により評価した。

【結果】本研究ではフラン環縮合位置、フラン環に置換する官能基の種類、およびフラボノイド骨格C環の構造改変を組み合わせることで、約40種のフロフラボノイド類を合成した。それぞれの化合物に対し増殖抑制試験を行ったところ、フラボン骨格A環の6-7位にフラン環を導入することで増殖抑制活性が増強される傾向が認められた。また、カルコン骨格にフラン環を導入することで活性が増強されたことより、フラボン骨格およびカルコン骨格A環に導入されたフラン環の重要性が示唆された。

Furoflavonoid, Benzofuran, HL-60

講演番号：3A06p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ A校舎06会場

アザフラボノイド類の合成とその増殖抑制活性

Synthesis of Azaflavonoids and their antiproliferative activity

○檜山 昂彦[1]、遠藤 功太郎[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2]
（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）
○Takahiko Hiyama[1]、Koutaro Endo[1]、Satoru Kawaii[1]、Tetuo Tokiwano[2]、Yuko Yoshizawa[2]
（[1] Tokyo Denki Univ., [2] Akita Pref. Univ.）

【目的】分子中の原子を別の原子に置換すると、分子の形状や電子密度，双極子モーメントなどの物理化学的性質が変化するため、生物活性が増強されたり、新たな活性が発現することがある。例えば、フラボンのC環エーテル酸素原子が窒素原子で置換されたアザフラボンは、がん細胞の微小管合成を阻害することが報告されている。また、*Orixa japonica Thunberg* などに含有されているアザフラボノイドには、殺虫作用・抗菌作用・抗酸化作用などの生物活性が報告されている。近年、フラボノイドの生理作用や作用機序の研究が盛んに行われているが、アザフラボノイドは天然資源中には微量にしか存在せず、構造とその生物活性に関する詳しい研究が行われているとは言い難い。そこで本研究ではアザフラボン類およびアザフラバノン類の系統的合成を行い、それらの生物活性を通常のフラボン類やフラバノン類と比較することにより、原子置換による生物活性への影響について検討した。
【方法】アニリン類の菅沢反応により*ortho*位をアセチル化して2'-アミノアセトフェノン類とした後、Claisen- Schmidt縮合反応によりカルコン中間体を調製した。これを環化することでアザフラバノン骨格を構築した。一方、アニリン類とベンゾイルエチルアセタート類の脱水縮合反応によりβ-エナミン中間体とし、これを環化することでアザフラボン骨格を構築した。合成したアザフラボノイド類の生物活性は、がん細胞に対する増殖抑制活性により評価した。
【結果】合成した 50 数種のアザフラボノイドについて HL60 増殖抑制活性を調べたところ、フラボノイドに比べ 100 倍以上の増殖抑制活性を示すものが得られた。このとき、濃度依存性のない領域を与えるアザフラボノイド類も認められた。アザフラボノイド類による HL60 増殖抑制の作用機序についての知見を得るために、フローサイトメーターによる細胞周期測定を行ったところ、SubG1 領域の増加が顕著であり、アポトーシス誘導の可能性が示唆された。なお同じ条件下では通常のフラボノイド類には SubG1 領域の増加は認められなかった。
　また、多くのアザフラボノイド類はエストロゲンレセプター・アンドロゲンレセプターなどの成長ホルモン受容体を有する前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対して顕著な増殖抑制活性を示すものの、このような受容体を持たない急性リンパ芽球性白血病細胞 Jurkat には相対的に弱い活性しか示さなかったことから、アザフラボノイド類はこのような成長ホルモン受容体を標的にしている可能性が考えられる。

Azaflavonoid, Sugasawa reaction, antiproliferation

講演番号：3A06p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ A校舎06会場

タイトル　AGE形成阻害剤のスクリーニング系に関する研究

Title　Study on screening system of the AGE inhibitor

○三橋 進也、　　大馨、重冨 顕吾、生方 信（北大・院農・応生科）

○Shinya Mitsuhashi, Daxin Li, Kengo Shigetomi, Makoto Ubukata (Hokkaido Univ., Grad. Sch. Agr., Div. Appl. Biosci.)

近年，世界中において糖尿病患者数は増加の一途を辿り，これに伴って腎症や網膜症などの糖尿病合併症　患人口も増加していることは，医学的にも社会的にも大きな問題となっている。糖尿病合併症には、不可逆的・非酵素的な機構で進行するタンパク質の糖化反応が関　している。

糖化反応は還元糖などのアルデヒド基とタンパク質のアミノ基がシッフ塩基を形成することから始まり、続いてアマドリ転移、そして酸化・脱水・縮合などの反応が起こっていく。グルコースの他にもアルデヒド基を持つメチルグリオキサールなどがタンパク質の糖化修飾に関与する。そして糖化反応は最終的に終末糖化産物AGE（advanced glycation endproducts）を生成する。これらのAGE形成に伴って、タンパク質は変性・失活し糖尿病合併症を引き起こす。したがって、AGE形成阻害剤の発見が非常に有益な応　へ繋がると期待され、多くの研究グループによってAGE形成阻害剤の探索がなされた結果、アミノグアニジンなどの活性物質が見出されている。しかし残念ながら、　床薬として使　されるまで開発が進んだAGE形成阻害剤は存在しない。

現在のところ、AGE形成阻害剤の作　機序としては、1）生成したAGEまたはAGE前駆体の分解、2）アルデヒド基の捕捉、3）抗酸化作　、4）2価金属のキレートが考えられている。このうち、3）および4）はAGE生成における酸化反応を　制していると考えられているが、詳細は不明である。

本研究では牛血清アルブミン(BSA)の糖化度を、蛍光強度を指標として測定し、各種2価金属やキレーターの作　を調べた。また、フラボノイドのAGE形成阻害を測定し、阻害機構の考察を行った。

Inhibitor, AGE, Assay

講演番号：3A06p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ A校舎06会場

タイトル　ヒト肺線癌抑制における Nitidine 経口摂取の有用性に関する研究

Studies on the antitumor effect of oral administration of Nitidine on human adenocarcinoma bearing nude mouse

○平良 直幸、岩崎 公典、屋 宏典 (琉大・熱生研)

○Naoyuki Taira, Hironori Iwasaki,Hirosuke Oku(Univ.Ryukyu.TBRC)

【目的】当研究室ではこれまでに、植物アルカロイドの一種であるNitidine（NTD）の腹腔内投与による抗腫瘍効果をマウスを用いて明らかにしている。NTDは沖縄で伝統的に利用されてきた薬草茶のサルカケミカンに含まれる成分であることから、経口摂取による抗腫瘍効果も期待される。本研究では、NTDを含むサルカケミカン粗抽出物をマウスに定常的に経口摂取することで、NTDの抗腫瘍効果を評価し、食品成分としてのNTD摂取の有用性を明らかにすることを目的とした。

【方法】サルカケミカン粉末を 10 倍量のエタノールで抽出し、分配クロマトにより酢酸エチル画分を得た。同画分をシリカゲルクロマトグラフィーに供し、NTD を含むサルカケミカン粗抽出物を得た。BALB/cSIc-*nu/nu* マウス(♂)を、Normal(Nor)群、Control(Cnt)群および NTD 群の 3 群に分けた。Nor 群および Cnt 群には通常食を、NTD 群にはサルカケミカン粗抽出物を加えた実験食を試験終了まで 1 日 4g ずつ給餌した。サルカケミカン粗抽出物を加えた実験食は飼料 4g 中に NTD が 1mg 含まれるように調整した。飼育一週間後、Cnt 群および NTD 群にヒト肺腺がん細胞(1×10^6 cells)を皮内移植した。その後二週間の腫瘍面積を経時的に測定することで、NTD 経口摂取による抗腫瘍効果を検討した。また、試験終了時に血液および腫瘍組織を回収し、NTD 検出実験を行った。

【結果】腫瘍移植後 9 日目から NTD 群で腫瘍面積の抑制が認められ、15 日目では顕著に差が表れた(Cnt 群：$19.5\pm10.0mm^2$　NTD 群：$8.15\pm3.36mm^2$,$p<0.01$)。実験期間中、異常行動（歩行異常や痙攣）や体質（排泄物の性状等）の劣化は認められず、血中の GPT および GOT に差は認められなかった。また、NTD 群の血中 NTD 濃度は検出限界以下だったが、腫瘍組織内から NTD が検出できた。

【考察】　今回の結果から、NTD を 1mg を含むサルカケミカン粗抽出物の定常的な経口摂取は、マウスに移植したヒト肺腺がん細胞の抑制において有効であることが示された。過去の実験では精製 NTD を 0.1mg/day で腹腔内投与することで抗腫瘍効果を明らかにしているが、今回の NTD 経口投与試験では 10 倍量の投与でほぼ同様の結果が得られた。、NTD 群の腫瘍組織から NTD が検出できたことから、サルカケミカン粗抽出物中の NTD が腫瘍組織内に蓄積し、抗腫瘍効果を示したと考えられた。NTD は柑橘系の植物から検出されることが報告されており、今後は医薬品としての応用に加えて、NTD 含有成分の機能性食品としての利用も期待できると考えられる。

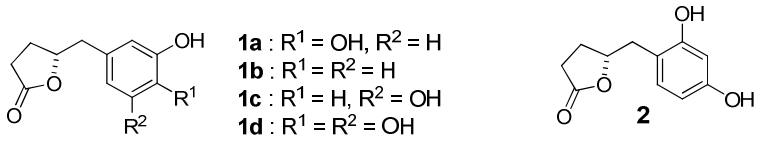
Nitidine, alkaloid, antitumor effect

講演番号：3A07a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ A校舎07会場

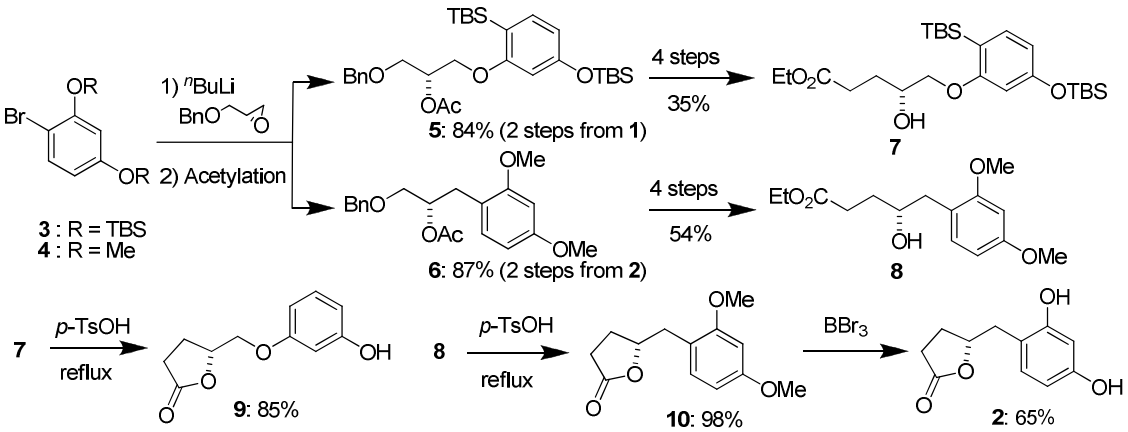
タイトル　カテキン代謝物の合成：5-(2,4-Dihydroxyphenyl)-γ-valerolactone の合成
Title　Synthesis of catechin metabolite 5-(2,4-Dihydroxyphenyl)- γ-valerolactone

○成瀬 俊一、濱田 昌弘、岸本 崇生、中島 範行（富山県大工）
○Shunichi Naruse, Masahiro Hamada, Takao Kishimoto, Noriyuki Nakajima (Toyama Prefectural University)

【目的】茶カテキンは抗酸化作用、抗ガン作用、抗アレルギー作用など、さまざまな生理活性を有することで知られている。カテキン類は腸管での腸内細菌での代謝を経て、γ-ラクトン代謝物へと変換されるが、この代謝物にもカテキンと同様に抗ガン作用があること、水酸基の数や置換位置の違いにより活性の強弱があることが報告されている[1]。そこで当研究室では系統的なラクトン代謝物の合成を開始した。すでに合成を完了した天然型ラクトン誘導体 **1a-d** に加え、今回、2,4-ジヒドロキシフェニルγ-バレロラクトン **2** の合成を行った。



【方法】まず、4-bromoresorcinol の 2 つの水酸基を TBS 基で保護した **3** をリチオ化し、benzyl (*S*)-glycidyl ether とカップリングさせた。しかし目的とするカップリング体は得られず、**5** と予想される転位化合物を得た。そこで、1,3 位の水酸基の保護基を Me 基に変換した **4** とカップリング反応し、目的とする **6** を得ることができた。**6** を既知の合成経路[2] に従い、6 工程 47%でγ-ラクトン前駆体である **8** へと変換し、ラクトン化、続く脱 Me 化により 2 工程 64%で目的物 **2** の合成を達成した。また、**5** を同様の経路に従い反応を進めたところ、**7** を経て **9** を 5 工程 30%で合成した。



【結果】目的物であるγ-バレロラクトン**2**の合成を9工程28%で達成した。

1)　Joseph E. Rice *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 873-876.
2)　Noriyuki Nakajima *et al. Synthesis* **2010**, *9*, 1512-1520.

Keyword1: tea catechin, Keyword2: stereocontrolled synthesis

講演番号：3A07a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ A校舎07会場

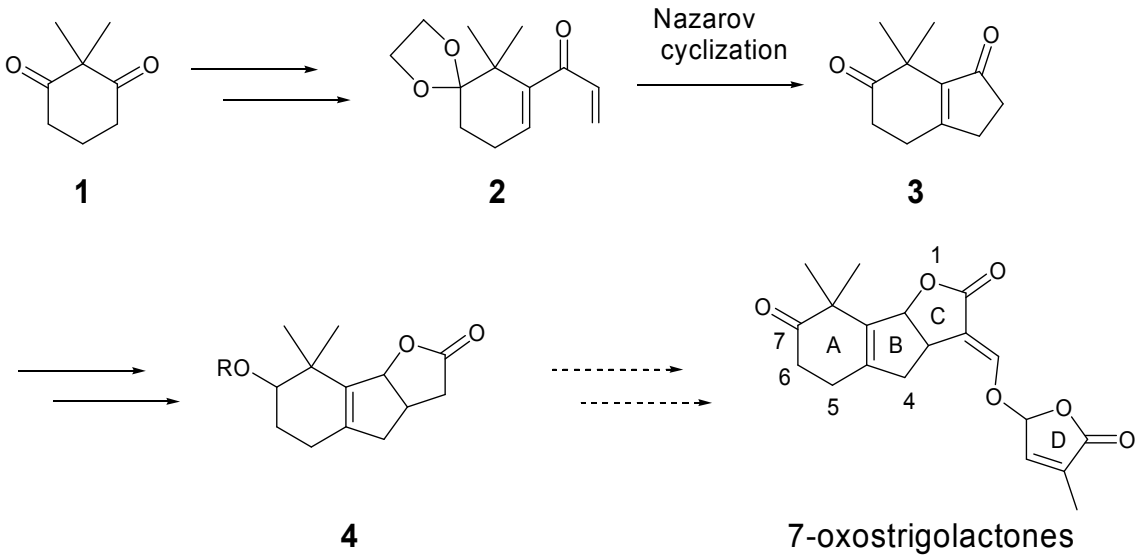
7位が酸素化されたStrigolactone類の合成研究

Synthetic studies on 7-oxygenated strigolactones

○田中 政志、久世 雅樹、滝川 浩郷（神戸大院・農）
○Masashi Tanaka, Masaki Kuse, Hirosato Takikawa (Kobe univ.)

【目的】Strigolactone類は、根寄生植物種子に対する発芽刺激活性や、植物地上部の分岐抑制活性などを有する化合物群である。本研究では、A環部の7位が酸素化されたStrigolactone類の合成を目的とした。

【方法・結果】2,2-dimethyl-1,3-cyclohexanedione（**1**）を出発原料として、Shapiro 反応、Grignard反応を経てジエノン（**2**）を調製し、Nazarov環化を行うことでB環を構築しエノン（**3**）を得た。**3** に酢酸単位の導入を行いC 環を構築し、ラクトン（**4**）の合成に成功した。現在、各工程の条件最適化およびD環の導入を検討中である。



strigolactone, Nazarov cyclization, synthesis

講演番号：3A07a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ A校舎07会場

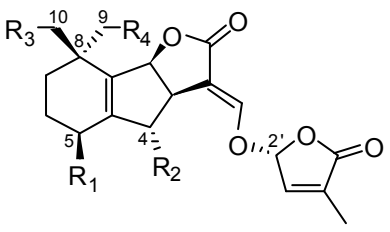
5-デオキシストリゴールメトキシ誘導体の合成とAM菌菌糸分岐誘導活性

Synthesis and hyphal branching-inducing activity of methoxy-5-deoxystrigol derivatives

○佐渡　愛香，山田　明宏[1]，秋山　康紀[1]，林　英雄[1]（阪府大・生命環境，[1]阪府大院・生命環境）
○Aika Sado, Akihiro Yamada, Kohki Akiyama, Hideo Hayashi (Osaka Prefecture Univ.)

【目的】ストリゴラクトン（strigolactone, SL）は植物においてアーバスキュラー菌根菌（arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌）や根寄生雑草との相互作用における根圏情報物質として作用するのみならず，地上部の枝分かれを制御する内生ホルモンとしても働くアポカロテノイドである。これまでに 5-デオキシストリゴール(**1**)やモノヒドロキシ SL であるストリゴール，そのアセチル誘導体である酢酸ストリギルを含む十数種の SL が天然から単離・同定されている。しかしながら，植物二次代謝産物に一般に見られるような水酸基がメチル化された *O*-メチル誘導体の報告例はない。最近，LC-MS/MS 解析によってイネが 5-デオキシストリゴールのメトキシ誘導体を生産していることが確認されたものの，その生産量は極めて少なく，単離・同定には到っていない。そこで本研究では有機合成化学的アプローチによってイネの 5-デオキシストリゴールメトキシ誘導体を同定することを目的として，既知モノヒドロキシ SL であるストリゴール，オロバンコール，ソルゴモールの *O*-メチル誘導体の合成を行うと共に，それらの AM 菌に対する菌糸分岐誘導活性の評価を行う。

【方法および結果】5-オキソ三環性ラクトンを出発原料として，Luche還元および酸化銀とヨードメタンを用いたPurdie法による*O*-メチル化を含む4段階の反応により5-*O*-メチルストリゴール(**2**)を合成した。同様の方法でメチル化を行い，4α-ヒドロキシ三環性ラクトンから3段階の反応により4-*O*-メチルオロバンコール(**3**)を合成した。2-メチルシクロヘキサノンへのブロモメチルメチルエーテルとナトリウムアミドを用いたメトキシメチル基の導入によるA環部分の構築から始まる8段階の反応により9-*O*-メチルソルゴモール(**4**)を合成した。三環性ラクトン合成の過程で得られた8-エピ三環性ラクトンについても同様に反応を行い，10-*O*-メチル-8-エピソルゴモール(**5**)を合成した。**2**～**5**はそれぞれ2’位に関する2つのエピマー混合物として得られるため，それぞれシリカHPLCで分取精製した。現在，これらの化合物について，AM菌に対する菌糸分岐誘導活性を評価すると共に，イネ根分泌物に含まれる5-デオキシストリゴールメトキシ誘導体と一致するものが存在するか否かをGC-MS分析によって調べている。



5-Deoxystrigol (**1**); R_1=H, R_2=H, R_3=H, R_4=H
5-*O*-Methylstrigol (**2**); R_1=OCH_3, R_2=H, R_3=H, R_4=H
4-*O*-Methylorobanchol (**3**); R_1=H, R_2=OCH_3, R_3=H, R_4=H
9-*O*-Methylsorgomol (**4**); R_1=H, R_2=H, R_3=OCH_3, R_4=H
10-*O*-Methyl-8-episorgomol (**5**); R_1=H, R_2=H, R_3= H, R_4= OCH_3

strigolactone, rice, arbuscular mycorrhizal fungi

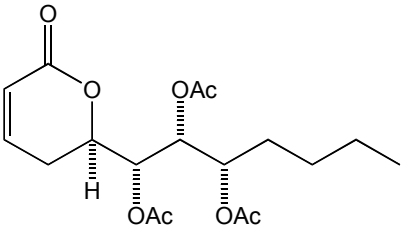
講演番号：3A07a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ A校舎07会場

Boronolideの両鏡像異性体の合成と植物生長阻害活性

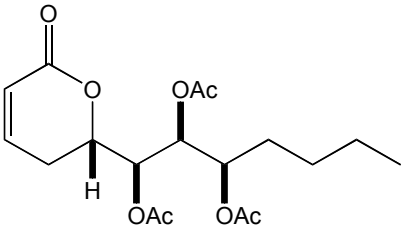
Syntheses of both enantiomers of boronolide and their plant growth inhibitory activity

○西村大樹、礒崎泰好、西脇寿、首藤義博、山内聡（愛大・農）
○Hiroki Nishimura, Yasuyoshi Isozaki, Hisashi Nishiwaki, Yoshihiro Shuto, Satoshi Yamauchi (Aidai)

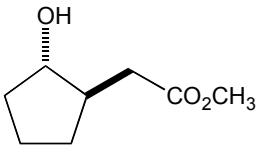
【目的】(+)-boronolide (**1**)は、不斉炭素を４個持つ５、６−ジヒドロ−α−ピロンポリアセトキシ化合物である。いくつかの合成法の報告があるが生物活性に関しては未知であったため、両鏡像異性体の合成研究を始め、酵母還元によって得られるシクロヘキサノール誘導体**2**から(+)-(**1**)の合成を既に達成した。本研究では、(+)-(**1**)の植物に対する活性を調べ、さらに、酵母還元によって**2**と同時に得られる**3**を出発化合物として、(-)-(**1**)の合成を試みたので発表する。



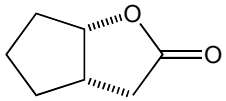
(+)-boronolide (**1**)



(-)-boronolide (**1**)

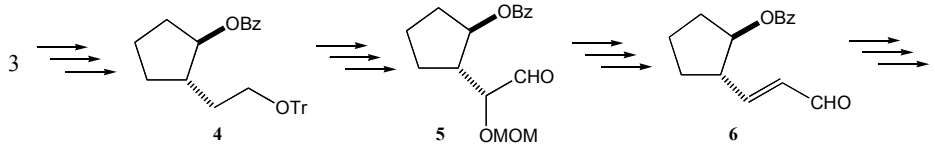


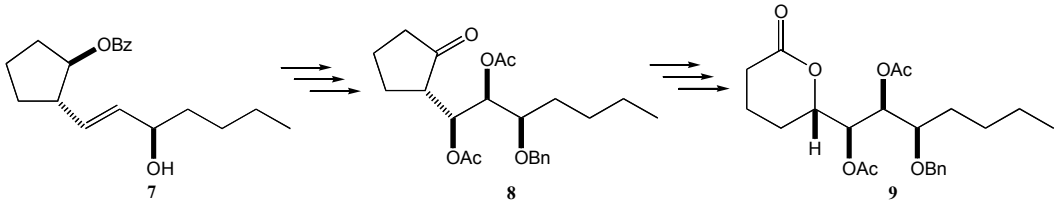
2



3

【方法・結果】(+)-(**1**)の1 mMでのシバの根に対する生長率は約50%だった。次に、(-)-(**1**)の合成を行った。酵母還元生成物**3**を還元後、一級水酸基の保護、2級水酸基のメシル化を行った。次に、benzoic acidのナトリウム塩との反応を行い、立体反転を伴うエステル化によって**4**を得た。さらに、一級水酸基の脱保護、アルデヒドへの酸化、TIPSエノールエーテル化を行った後、オスミウム酸化によるα-ヒドロキシ化等により、アルデヒド**5**とした。このアルデヒドに対して$CH_3OCH_2Ph_3PCl$を用いたWittig反応、酸処理を行って増炭したアルデヒド**6**へ導いた後、ブチルリチウムとの反応により**7**を得た。目的の立体はマイナー生成物であったため、光延法により水酸基の立体反転を行った。また、立体構造は、ケトンへの酸化の後、(*S*)-MeCBSを用いた還元生成物と比較することによって推定した。次に、水酸基の保護の後、ADmix-αとの反応を行い新たに２つの立体を構築した後、水酸基の保護、脱シリル化、酸化によりシクロヘキサノン誘導体**8**へ導いた。続いて、立体保持であるBaeyer-Villiger酸化によりラクトン環**9**を得、今後(-)-(**1**)へ導く予定である。





Boronolide, Plant growth regulation, 5,6-Dihydro-α-pyron

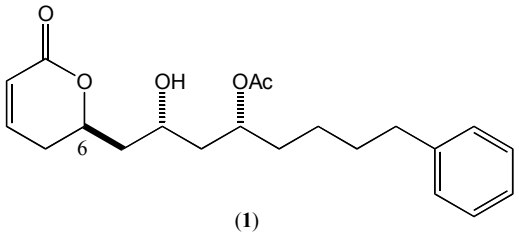
講演番号：3A07a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ A校舎07会場

抗かび活性を有する５、６−ジヒドローα−ピロン化合物の全立体異性体の合成

Syntheses of all stereoisomers of antifungal component, 6-substituted 5,6-dihydro-α-pyrone compounds

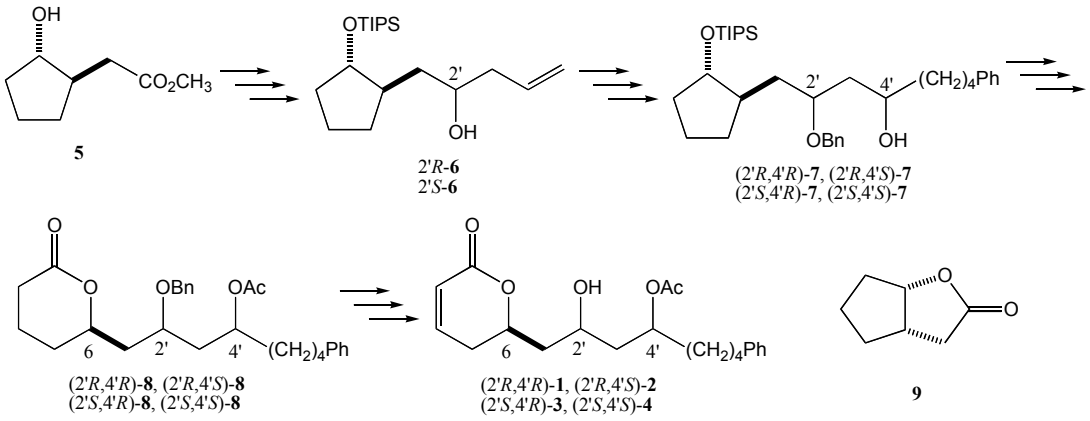
○礒崎泰好、西村大樹、秋山浩一、西脇寿、山内聡（愛大・農、愛大・総科支セ）
○Yasuyoshi Isozaki, Hiroki Nishimura, Koichi Akiyama, Nishiwaki Hisashi, Satoshi Yamauchi (Aidai)

【目的】６位に4-acetoxy-2-hydroxy-8-phenyloctyl基を有する５、６−ジヒドローα−ピロン化合物 (**1**) は、薬草から単離され、抗かび活性を有すると報告されているが、構造と活性との関係は不明である。この化合物には８個の立体異性体が考えられため、まず、立体構造が活性に与える影響を明らかにすることを目的として、全立体異性体の合成を計画した。



(**1**)

【方法・結果】酵母還元によって得られるシクロペンタノール誘導体**5**の水酸基をTIPS基で保護した後、エステルをアルデヒドへ変換しさらにallyl化によりアルコール**6**を得た。allyl-Grignard試薬を用いると分離可能な２つの立体が得られ、(-)-$(IPC)_2$Ballyl、(+)-$(IPC)_2$Ballylを用いると立体選択的にそれぞれ一方の立体を得ることができ、Mosher法により立体構造を決定した。次に、水酸基をベンジル基で保護した後MCPBAによりエポキシドとし、さらに有機銅試薬を用いることによりアルキル化を行いアルコール**7**へ導いた。立体異性体の分離後、水酸基のアセチル化、脱シリル化、酸化、さらに得られたシクロヘキサノン誘導体に対するBaeyer-Villiger酸化を行い６位の立体を保持したまま６員環ラクトン**8**を得た。続いて、$(PhSeO)_2O$との反応、DDQを用いた脱ベンジル化により６位に置換基を有する５、６−ジヒドローα−ピロン化合物の４つの立体異性体**1-4**を合成した。現在、酵母還元によって**5**と同時に得られる**9**を用いて鏡像異性体の合成を行っている。**1**, **3**, **4**は、いずれも植物病原性かびである*Alternaria alternata*および*Colletotrichum lagenarium*の生長を0.5 mMで50-60%に抑制した。



5,6-Dihydro-α-pyrone, Yeast reduction, Antifungal activity

講演番号：3A07a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ A校舎07会場

ラジカル環化反応を用いたサンタロール誘導体の合成研究

Synthetic study on the derivative of Santalol based on radical cyclization

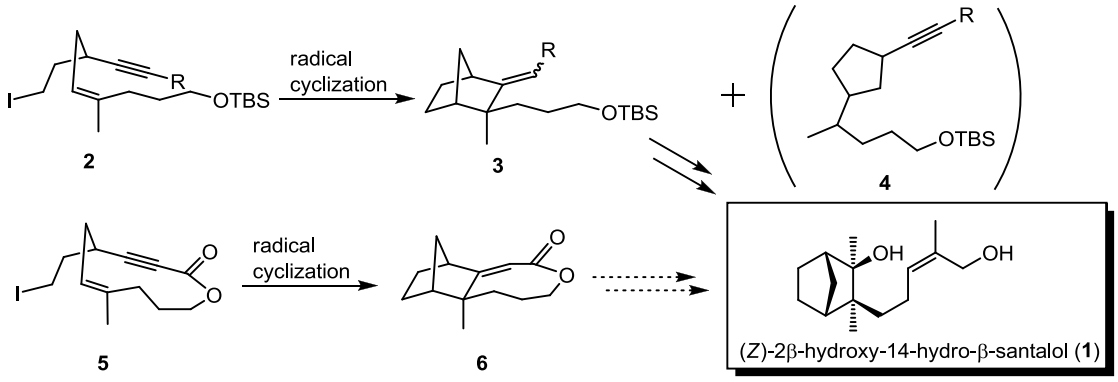
○山田　慎也、石神　健、渡邉秀典　（東大院農生科・応生化）
○Shinya Yamada, Ken Ishigami, Hidenori Watanabe(the University of Tokyo)

【目的】(*Z*)-2β-hydroxy-14-hydro-β-santalol(**1**)はビャクダンの一種*Santalum album* L.から単離されたセスキテルペンであり、抗ピロリ菌活性を有するなどその活性に非常に大きな興味がもたれている化合物である。我々は、この化合物の絶対立体配置の決定と生物活性試験への供与を目的として、合成研究に取り掛かった。

【方法と結果】骨格構築法の確立を目的として、まずはラセミ体での合成の検討を行った。我々は標的化合物の特徴的骨格であるBicyclo[2.2.1]heptane骨格を、鎖状のエンイン化合物(**2**)に対する連続的なラジカル環化反応によって一挙に構築する合成計画を立案し、合成を行った。日本農芸化学会2010年度大会において、ラジカル環化反応を用いて望む骨格有する化合物(**3**)を得たことを報告した。その後官能基変換を行い、標的化合物(**1**)の全合成を達成した。

しかし、鍵反応であるラジカル環化反応の収率、および立体選択性に課題を残す結果となった。１段階目の環化で反応が停止し生じたシクロペンタン誘導体(**4**)が多く得られたことから、立体障害などの影響で連続的な環化が進行しにくい可能性が考えられた。そこで、環化前駆体の官能基や保護基による立体障害の影響を検討したが、収率を大きく改善することはできなかった。

また、1段階目の環化後に生じるシクロペンタン環の側鎖がトランス配座を取ると、２段階目の環化の反応点が接近できず1段階目の環化で反応が停止する可能性も考察された。そこで我々は２段階目の環化を促進するために、ラクトン環によって側鎖を固定した環化前駆体(**5**)を調製し、その化合物に対して連続的なラジカル環化反応を試みたところ、望みのBicyclo[2.2.1]heptane骨格を有する化合物(**6**)を高い収率で得ることに成功した。現在は得られた化合物から天然物(**1**)への変換を検討している。



(*Z*)-2β-hydroxy-14-hydro-β-santalol , anti-*Helicobacter pylori*., radical cyclization

講演番号：3A07a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ A校舎07会場

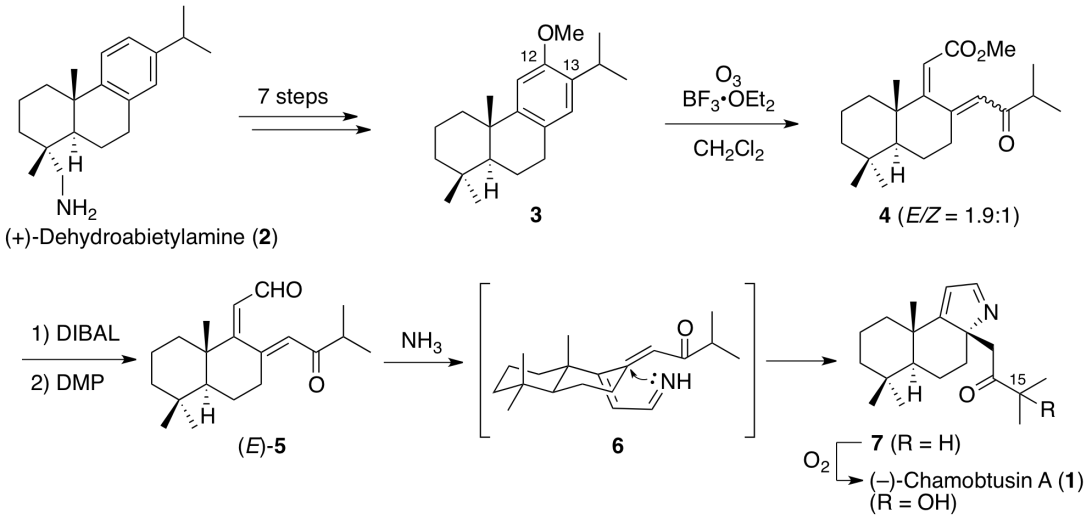
生合成仮説に基づく(-)-Chamobtusin Aの合成

Synthesis of (-)-chamobtusin A based on a presumed biosynthetic pathway

○森 直紀、葛谷 一馬、石神 健、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○Naoki Mori, Kazuma Kuzuya, Ken Ishigami, Hidenori Watanabe (The University of Tokyo)

【目的】Chamobtusin A(**1**)は2007年、Tanらによりヒノキ科植物*Chamaecyparis obtusa* cv. tetragonから単離・構造決定されたジテルペンアルカロイドである。本化合物の2*H*-ピロール環を有するユニークな構造は有機合成化学的に大変興味深い。2010年、我々はイミンの分子内アザマイケル環化反応を鍵反応とする(±)-chamobtusin *A*の初の全合成を達成し、昨年度の本大会においてその研究成果を発表した。また、2011年には青柳らにより、不飽和ニトリルへのアザマイケル付加反応を用いた(±)-chamobtusin Aの全合成も報告されている。一方で、chamobtusin Aの光学活性体合成の報告は未だ無く、本研究では、生合成仮説に基づいた化学変換による光学活性なchamobtusin Aの合成を目的とする。

【方法と結果】我々はchamobtusin A(**1**)がアビエタンジテルペノイドから生合成されているという仮説を立て、市販の光学活性な(+)-デヒドロアビエチルアミン(**2**)を出発原料に選定した。**2**より脱アミノ化（3工程）とメチルエーテル部の導入（4工程）を経て、**3**へと導いた。**3**に対して三フッ化ホウ素存在下オゾン酸化を行うと、C12-C13結合が選択的に開裂し、**4**を*EZ*混合物として得ることができた。**4**を混合物のままDIBAL還元と続くDess-Martin酸化に付すと(*E*)-**5**が得られた。(*E*)-**5**にアンモニアを作用させると、**6**に示したようにイミン形成と続く立体選択的アザマイケル付加反応が進行し、chamobtusin A の2*H*-ピロール環を構築することができた。最後に、空気酸化によって**7**の15位にヒドロキシ基を導入し、目的物へと導いた。(+)-デヒドロアビエチルアミン(**2**)より全12工程、総収率3.1%で(-)-chamobtusin Aの合成を達成した。



Chamobtusin A, diterpene, alkaloid

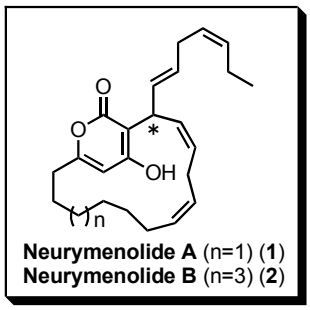
講演番号：3A07a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ A校舎07会場

MRSAやVREFに対して抗菌活性を示すneurymenolide類の合成研究

Synthetic study on antibacterial neurymenolides

○桜井　なつ樹、渡邉　秀典（東大院農生科・応生化）
○Natsuki Sakurai, Hidenori Watanabe (The University of Tokyo)

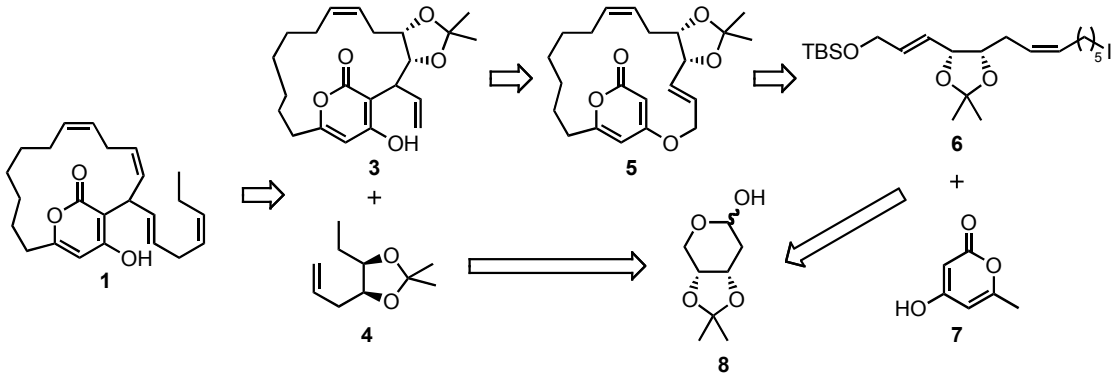
【目的】



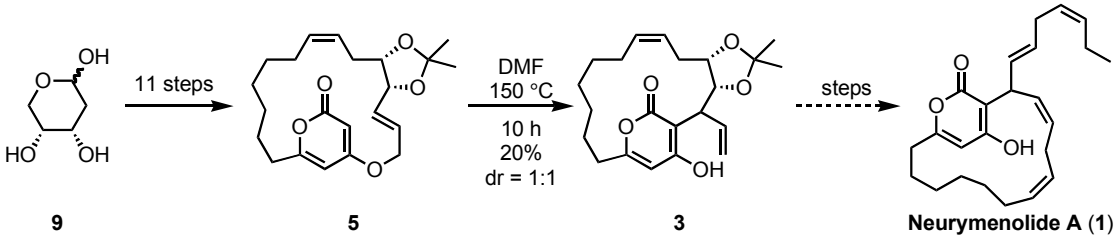
Neurymenolide類は、2009年に*Neurymenia*属の紅藻より単離されたα-pyrone構造を有するマクロライドである。これらの化合物は、α-pyrone環のβ位とε位が12ないし14炭素で連結した大変ユニークな構造を有しており、また、活性として、MRSAやVREFなどの薬剤耐性菌に対する抗菌活性が報告されていることから、新たなマクロライド系抗生物質のデザインテンプレートとして大きく期待できる化合物である。しかしながら、本化合物の全合成は未だ達成されておらず、天然物の絶対立体配置も決定されていない。以上のような背景から我々は、絶対立体配置の決定、及びそれらの活性評価を目的として、neurymenolide類の不斉合成研究に着手した。

【方法と結果】

我々は、問題となる環状構造を構築する方法としてクライゼン転位反応を鍵反応とする合成計画を立案した(Scheme 1)。その結果、neurymenolide類の大員環骨格を有する**3**の合成に成功したので、ここに報告する(Scheme 2)。現在、**1**の全合成へ向けて実験を進めているところである。



Scheme 1. Synthetic Plan



Scheme 2. Preparation for **3**

neurymenolides, α-pyrone, Claisen rearrangement

講演番号：3A07a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ A校舎07会場

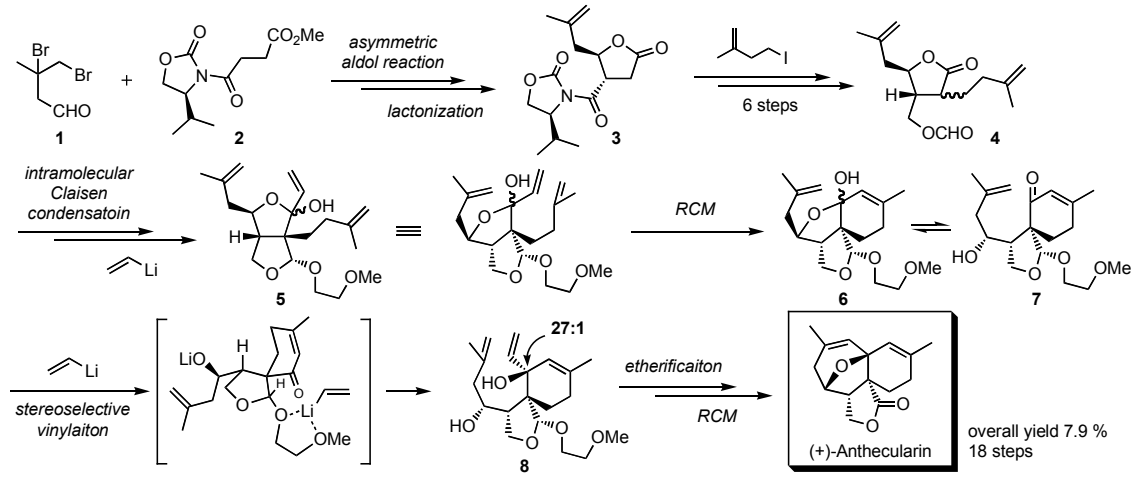
(+)-Anthecularin の不斉全合成

Asymmetric total synthesis of (+)-Anthecularin

○ 小倉　由資、岡田　笑子、石神　健、渡邉　秀典（東大院農生科・応生化）
○ Yusuke Ogura、Shoko Okada、Ken Ishigami、Hidenori Watanabe
(The University of Tokyo)

[目的]　Anthecularin は 2007 年、Karioti らによってキク科ローマカミツレ属の *Anthemis auriculata* から単離・構造決定された、抗マラリア原虫活性を有するセスキテルペンである [1]。本化合物は特徴的な官能基に乏しいにもかかわらず、オキサビシクロ[3.2.1]オクテン環にシクロヘキセン環とブチロラクトン環が縮環し、4 連続不斉炭素を形成しており、これらの不斉炭素を無駄なく構築しながら antheculairn の不斉合成を行うことは挑戦的であると言える。我々はエーテル環の立体化学を高度に制御しながら、この新規骨格を有する anthecularin の不斉合成を行うことにした。

[方法・結果]　実際の合成を Scheme 1 に示す。まずジブロモアルデヒド **1** と不斉補助基を有するエステル **2** との不斉アルドール反応によってラクトン **3** を調製し、続いて側鎖導入を含む 6 工程によってホルメート **4** へと導いた。次に、分子内 Claisen 縮合を行ってからビニルリチウムを作用させ、閉環メタセシスによってシクロヘキセノン **7** を得た。このケトンにビニルリチウムを作用させると高立体選択的にビニル基が導入されたジオール **8** が得られたので、架橋エーテルの構築と閉環メタセシスを行って(+)-Anthecularin の不斉全合成を達成した。



< Scheme 1. Total synthesis of (+)-Anthecularin >

anthecularin, antimalarial, sesquiterpene lactone

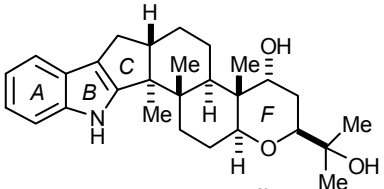
講演番号：3A07a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ A校舎07会場

分裂期キネシン KSP (Eg5) 阻害剤 terpendole E の誘導体合成

Synthetic Studies of Terpendole E Derivatives, Eg5 Inhibitor

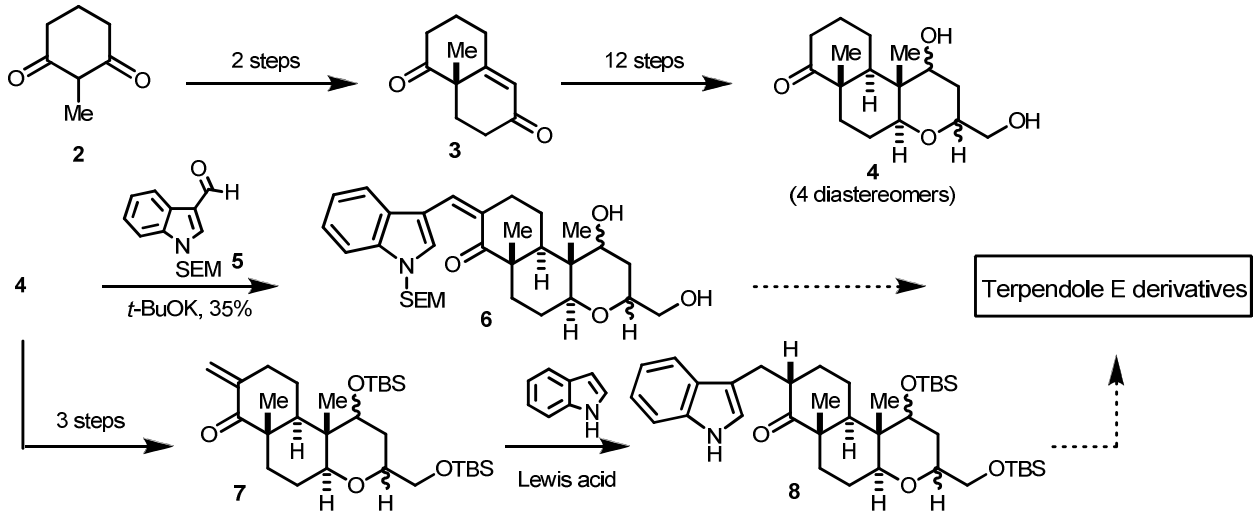
○大澤 誠也[1,2]、清水 猛[1]、本山 高幸[1]、福島 有佳子[1]、川谷 誠[1]、柴 隆一[2]、長田 裕之[1]
(理研基幹研・ケミカルバイオロジー[1]、東電大院工・物質工[2])
○Seiya Osawa[1,2], Takeshi Shimizu[1], Takayuki Motoyama[1], Yukako Fukushima[1], Makoto Kawatani[1], Ryuichi Shiba[2], Hiroyuki Osada[1]
(Chem. Biol., RIKEN ASI[1], Mat. Sci. Eng., Tokyo Denki Univ.[2])

【目的】動物細胞の mitotic kinesin KSP (Eg5) に阻害活性を有する terpendole E (**1**) は、抗がん剤への応用が期待される化合物である。キネシン Eg5 は分裂期特異的に働くモータータンパク質であり、近年抗がん剤のターゲットタンパク質として注目されている。そこで本研究では、**1** の構造活性相関の解明、活性の増強を目的に誘導体の合成研究を行った。



Terpendole E (**1**)

【方法・結果】まず、市販の 2-methyl-1,3-cyclohexanedione (**2**) から Wieland-Miescher ketone (**3**) を経由して 14 行程で、**1** の D,E,F 環に相応する 4 種類の三環性化合物の合成を行った。また、三環性化合物へのインドールユニットの導入には、indole-3-carboxaldehyde **5** を用いて検討を行った。しかし、エノラートを用いるインドールユニットの導入では、収率の向上が行なえず、基質の分解が見られた。そこで、Lewis 酸条件下 α,β-不飽和ケトン **7** への indole の 1,4－付加反応によって収率良く目的の化合物を得た。現在、目的の terpendole E 誘導体の合成を行っている。



Terpendole E, Eg5 inhibitor, indole-terpene

講演番号：3A07a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ A校舎07会場

Paspalicineおよびpaspalinineの合成研究

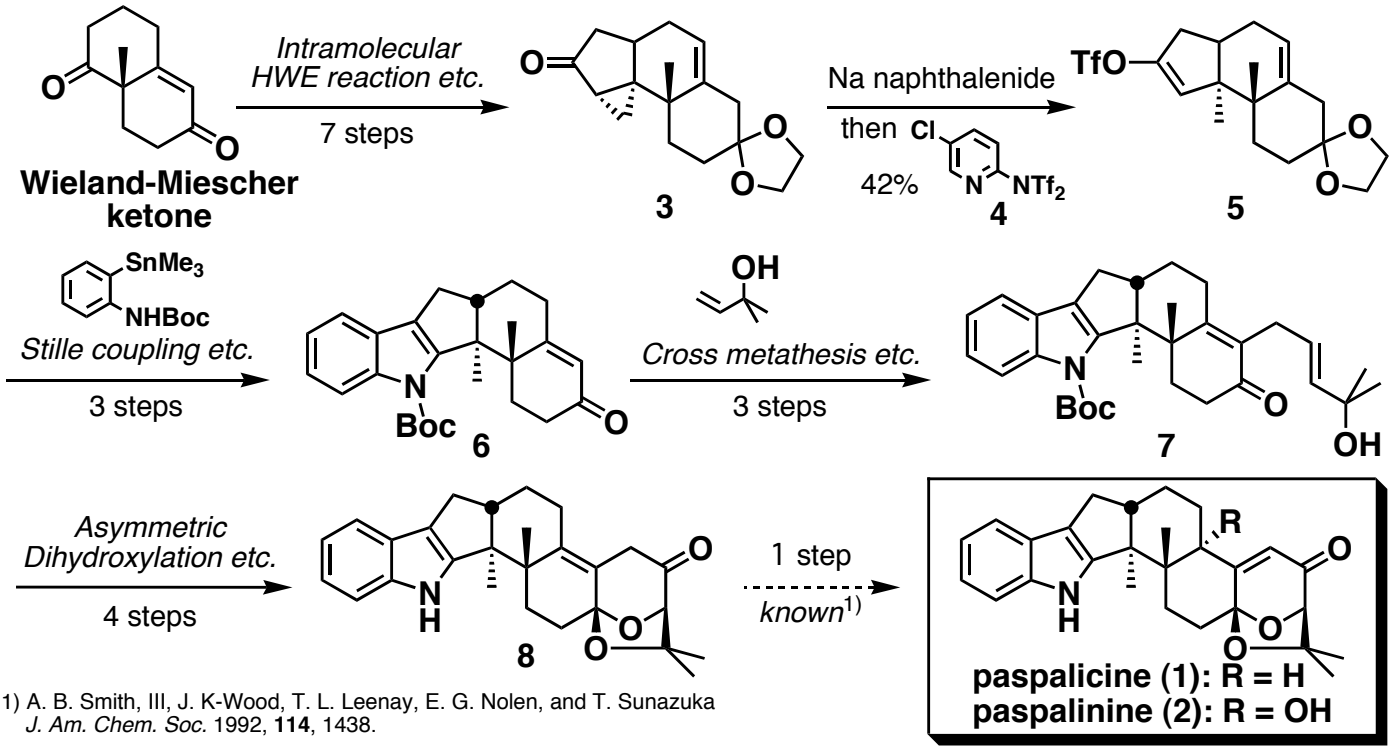
Synthetic Studies of Paspalicine and Paspalinine

○榎本賢、森田暁、桑原重文（東北大院農・生物産業創成）

○Masaru Enomoto, Akira Morita, Shigefumi Kuwahara (Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

【目的】paspalicine（１）およびpaspalinine（２）は麦角菌の一種である*Claviceps paspali*より単離、構造決定された特異な環構造を有するインドールジテルペンである。１および２は家畜麦角病の原因物質であるとともに作物害虫に対する摂食阻害活性を有することから、合成中間体を含めた本化合物の生物活性評価による構造活性相関研究は生物生産向上の点からも非常に有益であると考えられる。そこで、生物活性評価に向けた本化合物の効率的な全合成を目的として合成研究を行った。

【方法・結果】Wieland-Miescherケトンより７工程の変換で得られるケトン３をナトリウムナフタレニドで還元した後に、生じたエノラートを４で捕捉することによりone-potでエノールトリフレート５を得た。続くStilleカップリングを含む３工程の変換によりインドール部位を構築して６へと導き、クロスメタセッシス等により増炭して７を合成した。さらに不斉ジヒドロキシ化等により分子内アセタール構造を構築して８を合成した。８から１および１から２への変換はすでに知られていることから、１および２の形式合成を達成したことになるが、現在はより効率的な経路を確立すべく、合成終盤の化合物から別経路による１および２への変換を検討している。



1) A. B. Smith, III, J. K-Wood, T. L. Leenay, E. G. Nolen, and T. Sunazuka *J. Am. Chem. Soc.* 1992, **114**, 1438.

indole alkaloid, insecticidal activity, natural product

講演番号：3A07a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ A校舎07会場

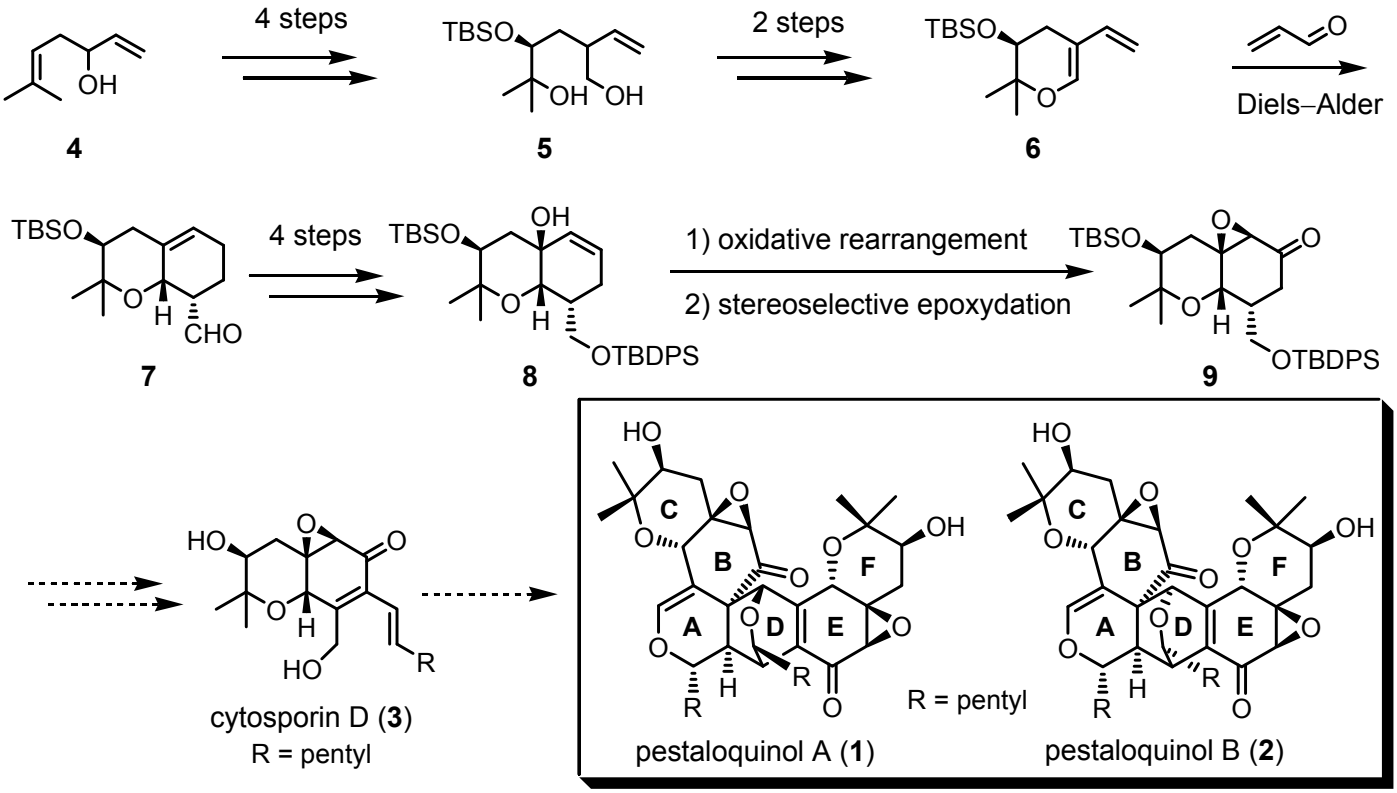
Pestaloquinol A 及び B の合成研究

Synthetic Study on Pestaloquinols A and B

○陰山真将、桑原重文（東北大院農・生物産業創成）
○Masayuki Kageyama, Shigefumi Kuwahara (Tohoku University)

【目的】Pestaloquinol A (**1**)及びB (**2**)は2011年G. Dingらにより植物内生菌*Pestalotiopsis* sp. から単離・構造決定された9つの環を有するプレニル化ヘプタケチドダイマーである[1)]。同菌よりそのモノマーと考えられているCytosporin D (**3**)も単離されており、**1**及び**2**は**3**のアリル位ヒドロキシ基の酸化に続く、電子環状反応およびDiels–Alder反応を経て生合成されると推定されている[1)]。本研究においては、**3**を合成中間体と定め、推定生合成経路を立証するとともに、**1**及び**2**の全合成達成を目的とする。

【方法と結果】既知化合物 **4** より Sharpless 不斉ジヒドロキシル化を含む 4 工程でジオール **5** とし、第 1 級ヒドロキシ基の酸化による環化、脱水を経てジエン **6** へと導いた。その後アクロレインとの Diels–Alder 反応により 2 環性化合物 **7** を合成した。得られた **7** を 4 工程でアリルアルコール **8** へと変換し、酸化的転位反応と立体選択的エポキシ化反応を行うことでエポキシケトン **9** へと導いた。**9** からは数工程の変換によりモノマー**3** へと導けるものと考えている。



1) G. Ding *et al*. *J. Nat. Prod*. **2011**, *74*, 286.

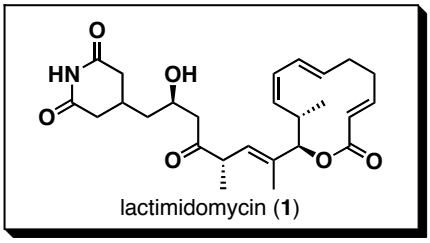
total synthesis, pestaloquinol, cytosporin D

講演番号：3A07a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ A校舎07会場

Lactimidomycinの全合成研究

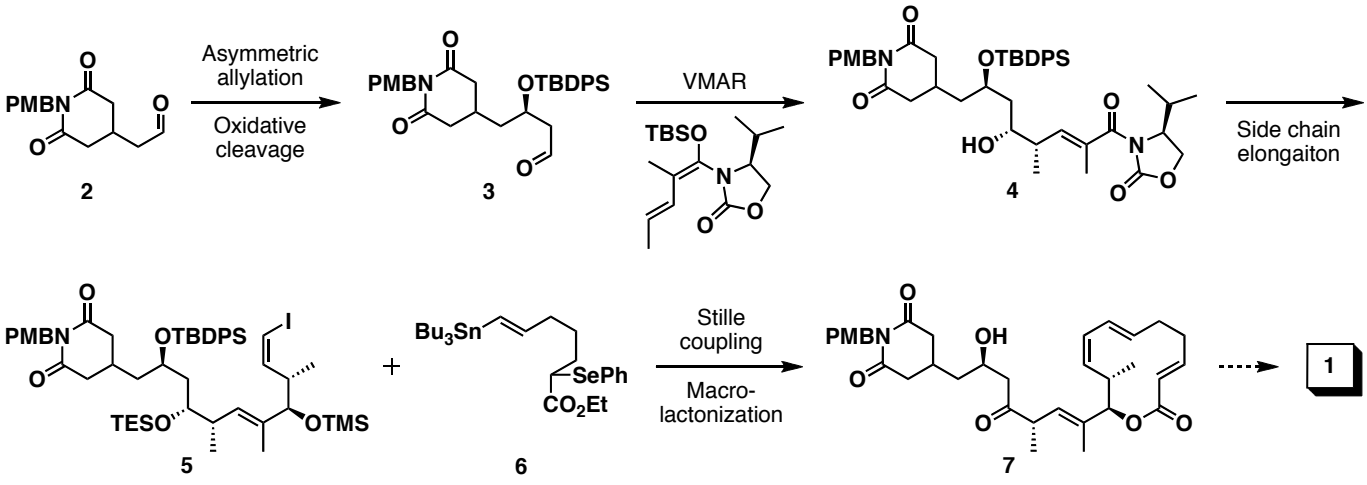
Synthetic Studies on Lactimidomycin

○永沢 友裕、桑原 重文（東北大院農・生物産業創成）
○Tomohiro Nagasawa, Shigefumi Kuwahara (Tohoku University)



【目的】Lactimidomycin (1)は1992年Sugawaraらによって放線菌 *Streptomyces amphibiosporus* R310-104より単離・構造決定されたグルタルイミド系マクロライドであり、各種癌細胞に対して強力な細胞毒性を示す[1]。また、ヒト由来癌細胞MDA-MB-231に対してIC_{50} 0.6 nMという極低濃度でその転移を阻害することから新規抗癌剤リード化合物として期待される[2]。本研究では1の全合成および構造活性相関の解明を目的とした。

【方法・結果】文献既知化合物より数工程の変換で導いたアルデヒド2に対し、不斉アリル化反応と続くオゾン分解によって3を得た。3をN,O-ケテンアセタールを用いるMukaiyama型遠隔不斉誘導反応に付すことで連続不斉中心を一挙に構築した後、不斉アルドール反応、Wittig反応等側鎖の伸長と官能基変換を経てビニルヨージド5とした。5と別途調製したビニルスズフラグメント6とをStilleカップリングによって連結し、エステルの加水分解とマクロラクトン化反応、保護基の脱着により全炭素骨格を有する7を合成することに成功した。現在lactimidomycin (1)への変換を検討している。



1) Sugawara, K.; Nishiyama, Y.; Toda, S.; Komiyama, N.; Hatori, M.; Moriyama, T.; Sawada, Y.; Kamei, H.; Konishi, M.; Oki, T. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1433.
2) Ju, J.; Rajski, S. R.; Lim, S.-K.; Seo, J.-W.; Peters, N. R.; Hoffmann, F. M.; Shen, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1370.

lactimidomycin, cytotoxicity, cell migration inhibitor

講演番号：3A07a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ A校舎07会場

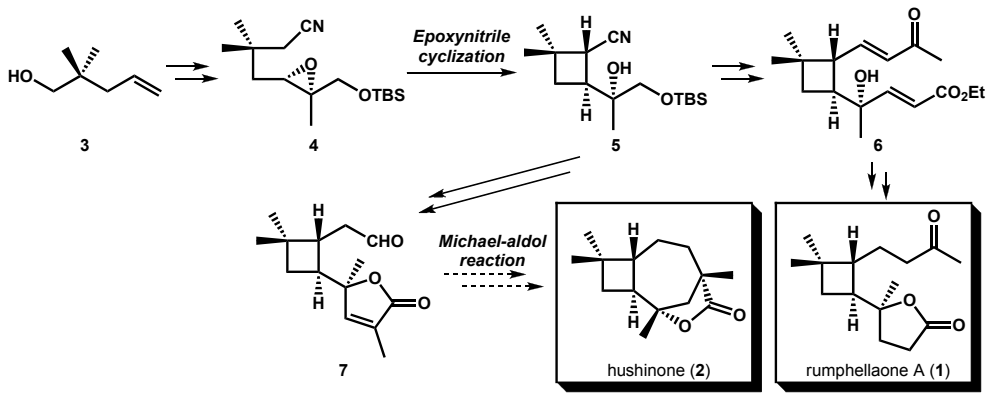
Rumphellaone AおよびHushinoneの合成研究

Synthetic studies on Rumphellaone A and Hushinone

○廣川 高史、桑原 重文（東北大院農・生物産業創成）
○Takafumi Hirokawa, Shigefumi Kuwahara (Tohoku University)

【目的】Rumphellaone A (**1**)はサンゴ*Rumphella antipathies*より単離・構造決定された4,5-*seco*-caryophyllane骨格を有するセスキテルペンであり、T細胞性リンパ芽球性白血病細胞CCRF-CEMに対して中程度の細胞毒性を有することが報告されている（IC_{50} = 12.6 μg/ml）[1]。また、hushinone (**2**)はカバノキ*Betula* sp.の芽の精油成分より単離・構造決定されたカリオフィレン類縁体であり[2]、新規な三環性ラクトン構造を有している。
本研究ではカリオフィレン類縁体に特徴的な四員環部分の効率的合成法を確立し、その方法論を用いてrumphellaone AおよびhushinoneのAの初の全合成を達成することを目的とした。

【方法・結果】既知のアルコール**3**を出発原料とし、Sharpless不斉エポキシ化を含む数工程の変換によって光学活性な**4**を合成した。続いてStorkらの方法[3]を用いることにより、四員環を有する**5**を高収率かつ高立体選択的に得ることができた。各側鎖を伸長して**6**へと導いた後、二重結合の水素添加と続く分子内ラクトン化によって**1**の初の全合成を16工程、総収率5.1%で達成した。一方、先の合成中間体**5**から7工程で不飽和ラクトン**7**を合成した。現在この基質に対してリチウムチオラートを用いたマイケル-アルドール反応[4]による七員環の構築を検討している。



1) Chung, H.-M. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6025-6027.
2) Klika, D. K. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2627-2635.
3) Stork, G.; Cohen, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5270-5272.
4) Ono, M. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6979-6982.

caryophyllene, sesquiterpenoid, epoxy-nitrile cyclization

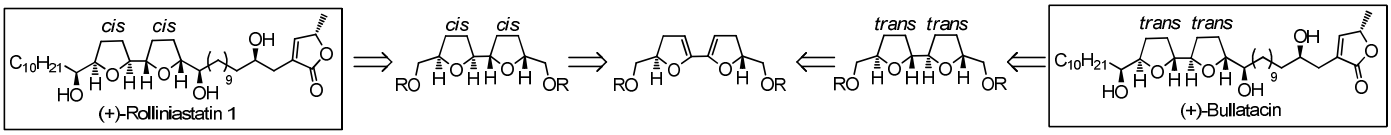
講演番号：3A07p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ A校舎07会場

アセトゲニン類におけるbis-THF骨格の立体選択的構築法の開発

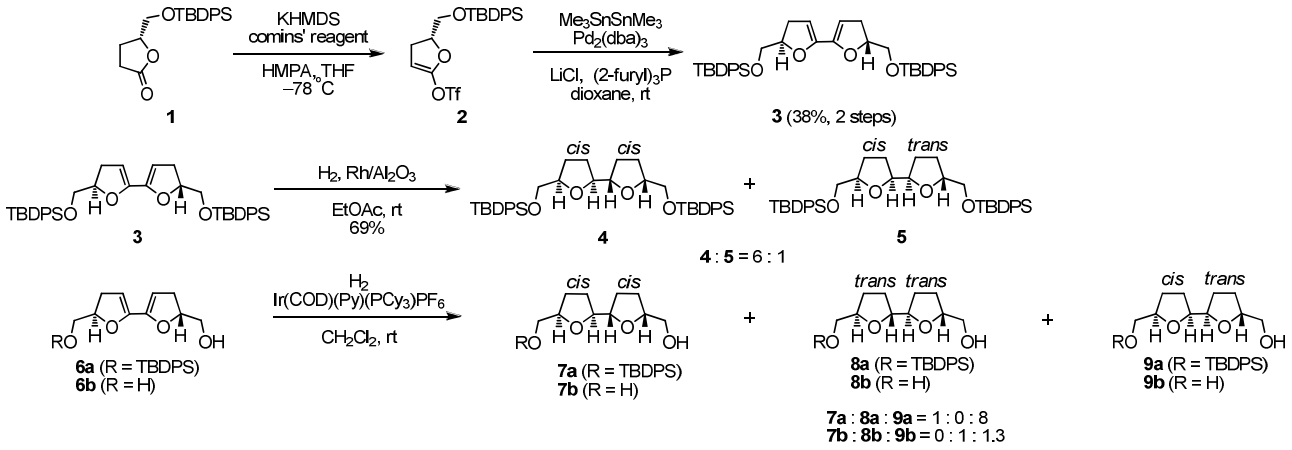
Stereoselective syntheses of bis-tetrahydrofuran cores in acetogenins

○古田　亜希子、渡邉　秀典（東大院農生科・応生化）
○Akiko Furuta, Hidenori Watanabe (The University of Tokyo)

【目的】bis-THFアセトゲニン類は直結する二つのTHF環を基本骨格としており、THF環の立体化学や側鎖の違いにより多くの天然物が存在する。また、抗癌活性など種々の生物活性を有するため、合成研究が盛んに行われてきた。特に対称なTHF二量体を用いる合成法は、側鎖を後から導入することにより種々の類縁体合成が可能である。THF二量体の立体選択的な構築法としては、不斉金属触媒を用いた水酸基の分子内環化反応を用いる例などが知られている。そこで我々は、ジヒドロフラン二量体に対する接触水素化反応を用いた、新規なTHF二量体の構築法を確立することを目的に研究を行った。側鎖上の酸素官能基からの配位の有無により接触水素化の方向を制御することで、cis,cis型、trans,trans型及びcis,trans型THF二量体の作り分けが可能であると考えた。



【方法と結果】TBDPSオキシメチル基を有する光学活性なラクトン**1**をトリフラート**2**へと変換後、Pd触媒を用いてトリフラート**2**の二量化を行いジヒドロフラン二量体**3**とした。続いて、得られたジヒドロフラン二量体**3**に対して接触水素化反応を検討し、触媒や側鎖上のシリル基の有無による立体選択性の違いについて調べた。検討の結果、TBDPSオキシメチル基を有するジヒドロフラン二量体**3**に対してRh/Al_2O_3触媒を用いた接触水素化反応を行うと、cis,cis型THF二量体**4**とcis,trans体**5**が6:1の比で生成し、cis,cis体**4**が立体選択的に得られることを見出した。また、ヒドロキシメチル基を一つ又は二つ有するジヒドロフラン二量体**6a**及び**6b**に対してCrabtree触媒を用いた接触水素化反応を行ったところ、下図に示す様な比率でcis,cis体**7**、trans,trans体**8**及びcis,trans体**9**を与えることがわかった。現在、trans,trans体**8**を立体選択的に構築する手法を検討中である。



Acetogenin, tetrahydrofuran, stereoselective synthesis

講演番号：3A07p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ A校舎07会場

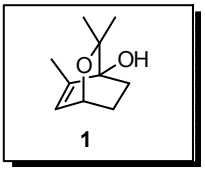
タイワンハッカより見出された新規モノテルペン化合物の合成による構造確認

Structural determination of the novel monoterpene compound isolated from *Mentha haplocalyx*

○小西 俊介[1,2]、渡邉 秀典[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]長谷川香料(株)）
○Shunsuke Konishi[1,2], Hidenori Watanabe[1] ([1]University of Tokyo, [2]T. Hasegawa Co.,Ltd.)

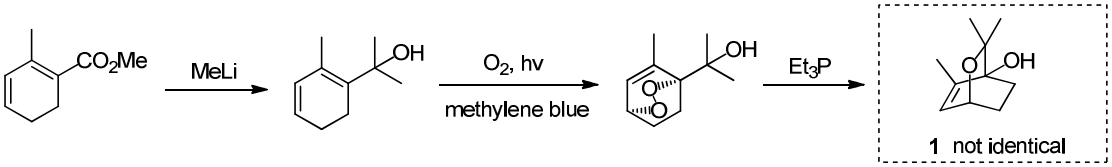
【目的】

2010年、B. Liuらによりタイワンハッカ*Mentha haplocalyx*中の新規モノテルペン化合物として**1**が単離報告されたが、そのユニークな構造に興味を惹かれ合成により構造確認を行うことにした。

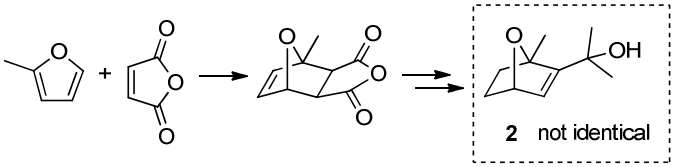


【方法と結果】

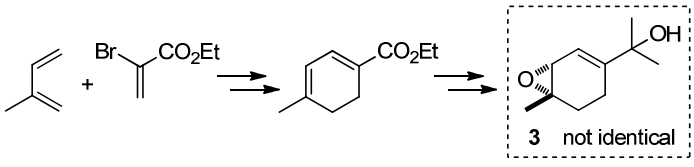
以下に示す合成法により化合物**1**の合成を行った。結果、合成した**1**のスペクトルデータは天然物のものと一致せず、その推定構造が誤っていることが判明した。



ではその真の構造は何であろうか。単離文献記載のNMRデータを基に考えうる構造を調査したところ、同じNMRデータを有する化合物として**2**及び**3**の単離報告例が見つかった。そこで化合物**2**及び**3**の合成による構造確認を行ったところ、両者とも推定構造が誤っていることが分かった。

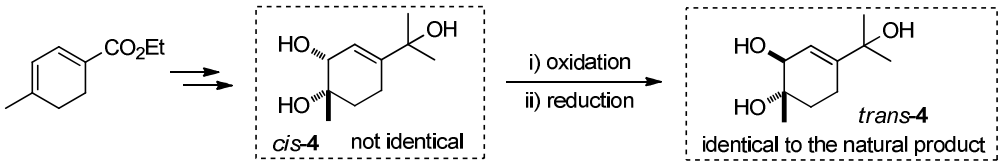


compound **2** : isolated from *Asiasarum sieboldii*



compound **3**: isolated from *Curcuma comosa*

ここで幸運なことに化合物**3**を合成した際の副生成物が求める天然物と一致することを見いだした。副生成物は極性の高さよりエポキシ環の開いたトリオール**4**と推測し文献検索したところ、同様のNMRデータを有する化合物*cis*-**4**の単離報告例が見つかった。よって*cis*-**4**の合成を行ったが天然物との一致が見られず、続いて*trans*-**4**に誘導したところ、天然物との一致が確認された。



compound *cis*-**4** : isolated from *Riella helicohylla* and *Protium heptaphyllum*
compound *trans*-**4** : novel compound

以上まとめると、今回我々は各種天然物から単離され異なる構造(**1**,**2**,**3**,*cis*-**4**)を提唱されていた化合物に対し、各推定構造が誤っていることを指摘し、その真の構造を*trans*-**4**と決定することが出来た。現在光学活性体の合成を行っているので併せて報告したい。

structural revision, synthesis, natural product

講演番号：3A07p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ A校舎07会場

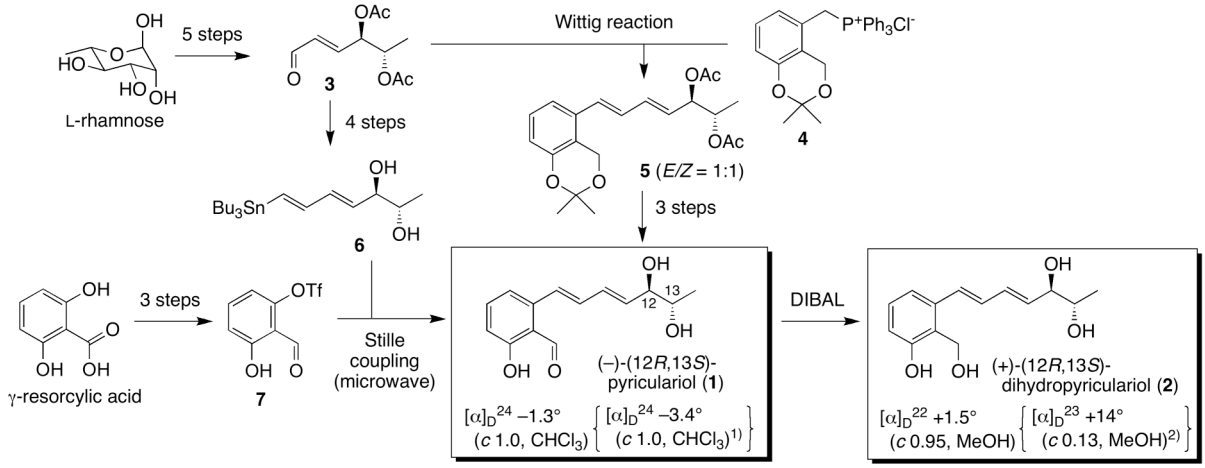
イネいもち病菌毒素ピリキュラリオールはラセミ体であった

Rice Blast Fungus produces pyriculariol as a racemate

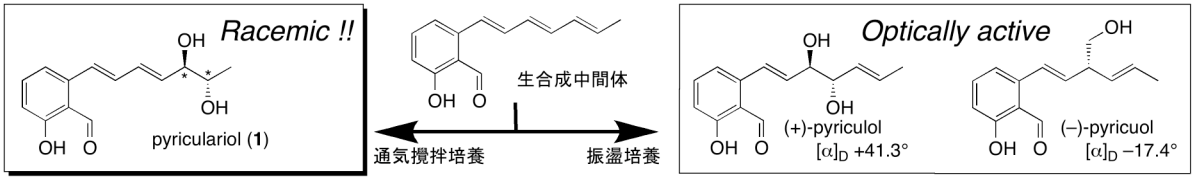
○清田 洋正、佐々木 郁香、長島 優太、田中 功二、兵藤 孝次、貫名 学[1]、桑原 重文
（東北大院農・生物産業創成、[1]山形大・農）
○Hiromasa, Kiyota, Ayaka, Sasaki, Yuta Nagashima, Koji Tanaka, Manabu Nukina,[1]
Shigefumi Kuwahara (Tohoku Univ., [1]Yamagata Univ.)

【目的】 Pyriculariol (**1**) と dihydropyriculariol (**2**) は、貫名らにより通気攪拌培養したイネいもち病菌*Magnaporthe grisea*から単離、構造決定された植物毒素である[1)]。絶対立体配置の決定を目的に全合成を行った。

【結果】 L-Rhamnoseから導いた**3**と**4**のWittig反応により骨格を構築し、**1**の合成を達成したが、中間体**5**の収率、*E*-選択性共に悪かったため、合成経路を変更した。**3**からビニルスズ**6**を調製し、アルデヒド**7**との電磁波照射Stille couplingにより、*E*-選択的に(–)-(12*R*,13*S*)-**1**を合成した[3)]。比旋光度の絶対値が小さいことからCD及びMTPAエステル化による分析を行ったところ、天然物はラセミ体であることが判明した。**2**の天然物もラセミ体であった。



菌の培養方法の違いにより、生産される化合物が異なるだけでなく、一方はラセミ体(**1**, **2**)、他方は光学活性体（pyriculolやpyricuol）という極めて興味深い事実が明らかとなった[4)]。



1）M. Nukina *et al.*, *Agri. Biol. Chem.* **1981**, 45, 2161. 2)貫名学, *天然有機化合物討論会要旨集* **1987**, *29*, 705. 3) A. Sasaki *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 4637. 4) *Idem*, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6276.

rice blast disease, phytotoxins, total synthesis

講演番号：3A07p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ A校舎07会場

タイトル　Maoecrystal Vの合成研究

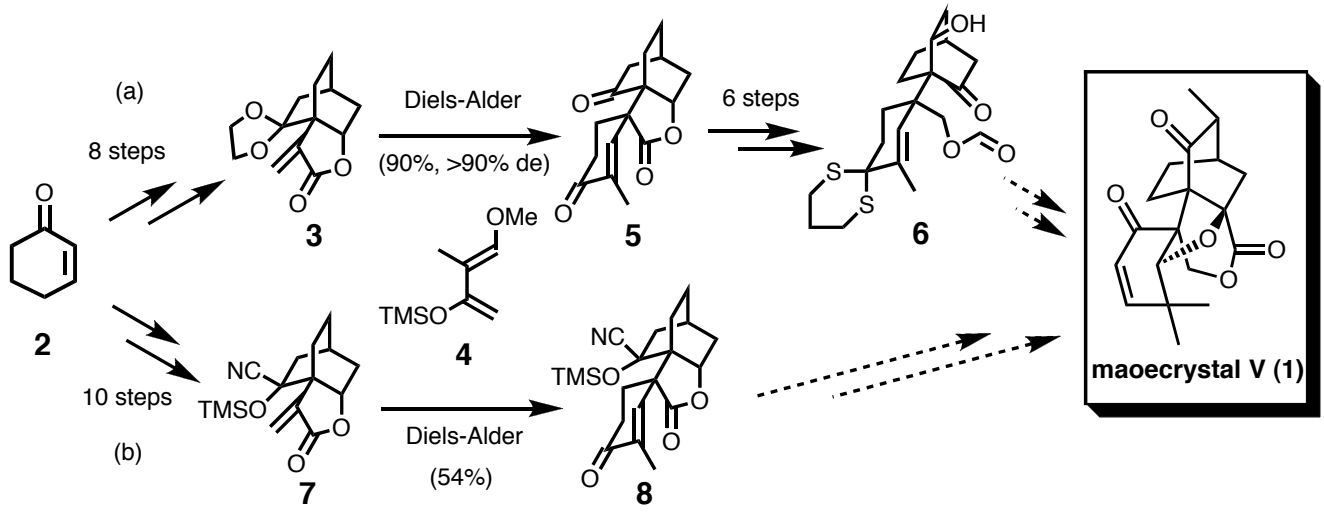
Title　Synthetic Studies toward Maoecrystal V

○小竹　正晃、　浅尾　洋樹、　佐々木　郁香、　島崎　泰治、　桑原　重文、　清田　洋正　（東北大院農・生物産業創成）

○Masaaki Kotake, Hiroki Asao, Ayaka Sasaki, Yasuharu Shimasaki, Shigefumi Kuwahara, Hiromasa Kiyota (Touhoku Univ.)

【目的】 Maoecrystal V (1) は、中国産薬用ハーブ*Isodon eriocalyx*から単離された新規な転位*ent*-kaurane骨格ジテルペノイドである。[1] HeLa細胞に対して選択的な細胞毒性（*cis*-platinの約50倍）を示すことから、有望な抗がん剤リード開発に繋がる全合成研究を進めている。

【結果】 経路 a では、2 を出発物質として、分子内アルドール反応を含む８工程でジエノフィル 3 を合成し、ジエン 4 と Diels-Alder 反応させることで高い収率及び立体選択性で 5 を得た。現在、5 より６工程進んだ 6 の合成を完了しており、ラジカル環化反応による６員環ラクトンの構築を検討している。経路 b では、2 から予め１炭素を導入したシアノヒドリン誘導体 7 を１０工程で合成し、4 との Diels-Alder 反応により 8 を得た。



1) S. H. Li *et al.*, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4327.

Keyword1:total synthesis, Keyword2:Diels-Alder reaction, Keyword3:intramolecular aldol reaction

講演番号：3A07p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ A校舎07会場

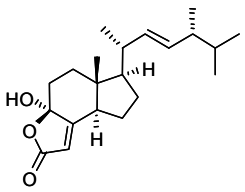
破骨細胞形成阻害活性を有するchaxine A の合成

Synthesis of osteoclast-forming suppressor chaxine A

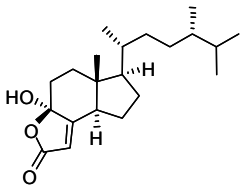
○籠原 裕磨、矢島 新、四海 圭祐、勝田 亮、額田 恭郎（東農大応生）
○Yuuma Kagohara, Arata Yajima, Keisuke Shikai, Ryo Katsuta, Tomoo Nukada (Tokyo University of Agriculture)

【目的】

Chaxine A は 2006 年、河岸らにより中国の食用キノコ *Agrocybe chaxingu* より単離され、構造が提唱されたステロイド様三環性化合物である [1]。本化合物は、マウスの TRAP 多核細胞を用いた生物試験において、破骨細胞分化因子 RANKL 存在下にもかかわらず、破骨細胞数の減少がみられた。このことから、chaxine A には破骨細胞形成を阻害する働きがあり、骨粗鬆に対する効果が期待される。しかし chaxine A の合成例はいまだ報告されておらず、我々は本化合物の顕著な生理活性に着目し合成研究を行った。また、それに伴いモデル化合物である demethylincisterol A_3 の合成も行ったので併せて報告する。



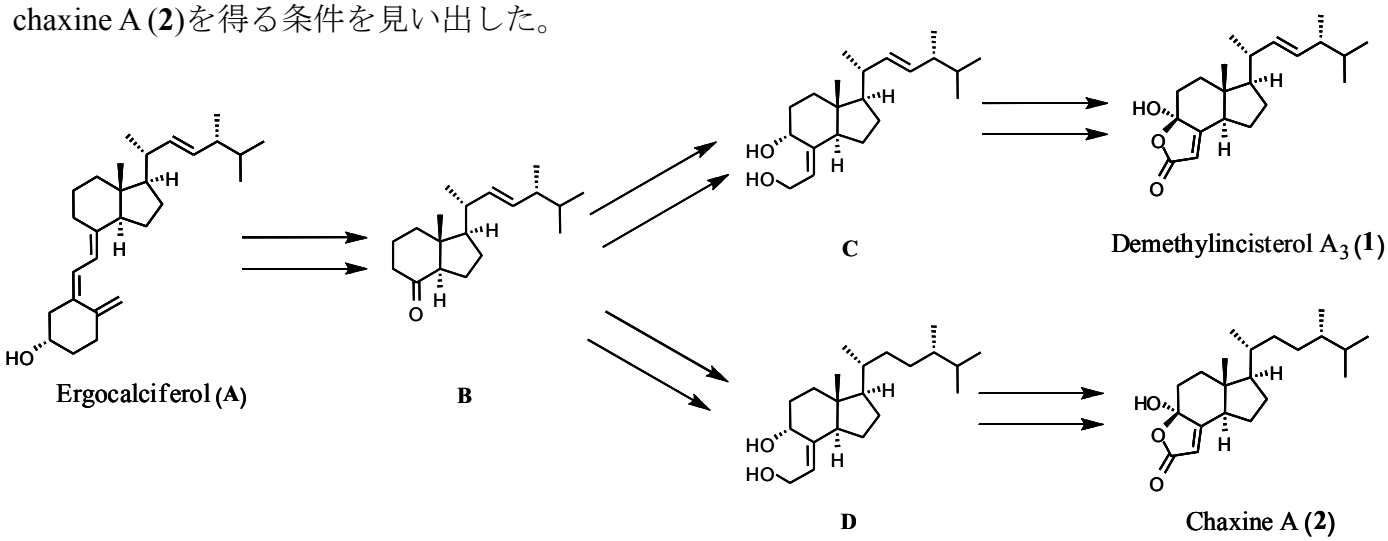
Demethylincisterol A_3 (**1**)



Chaxine A (**2**)

【方法及び結果】

Ergocalciferol (**A**)を出発原料として、得られたケトン **B** を共通中間体として用いた。分子内 Honer-Wadsworth-Emmons 反応(正宗法) を用いてブテノリドとし、続いて水素化ジイソブチルアルミニウムを用い 1,2-還元を行うことでジオール **C** まで誘導した。ジオール **C** の Jones 酸化により低収率であるが、モデル化合物である demethylincisterol A_3 (**1**)の合成に成功した。また、ケトン **B** より 8 工程にてジオール **D** まで誘導した後、酸化反応について検討したところ、収率良く chaxine A (**2**)を得る条件を見い出した。



Ergocalciferol (**A**)　　**B**　　**C**　　Demethylincisterol A_3 (**1**)

D　　Chaxine A (**2**)

1) Kawagishi, H.; Takuto, A.; Ogawa, T.; Masuda, K.; Yamaguchi, K.; Yazawa, K.; Takahashi, M. *Heterocycles* **2006**, *69*, 253-258.

Chaxine A, Demethylincisterol A_3, osteoclast-forming suppressor

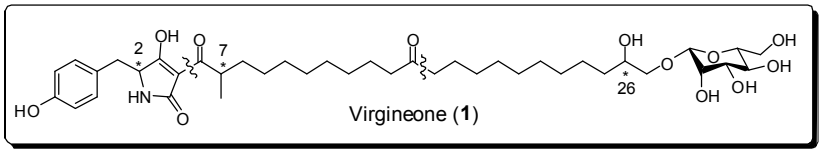
講演番号：3A07p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ A校舎07会場

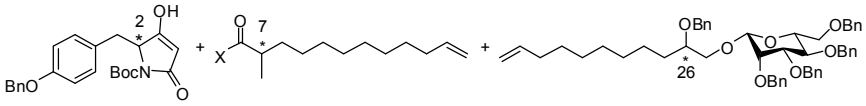
抗真菌活性を有するテトラミン酸誘導体virgineoneの合成研究

Synthetic studies of an antibacterium tetramic acid derivative virgineone

○伊田　千絵子、谷口　佳代子、矢島　新、勝田　亮、額田　恭郎（東農大応生）
○Chieko Ida, Kayoko Taniguchi, Arata Yajima, Ryo Katsuta, Tomoo Nukada (Tokyo University of Agriculture)

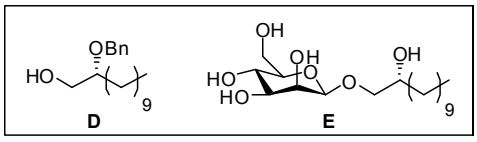
【序論】Virgineoneはキノコの一種*Lachnum virgineum*（和名：シロヒナノチャワンタケ）から単離され、チロシンから誘導されたと考えられるテトラミン酸骨格とβ-マンノシドを分子の両端に有するという、興味深い構造を有している。本化合物は*Candida* spp.と*Aspergillus fumigatus*に対し、抗真菌活性があり、新規薬剤としての活用が期待されている。しかし、virgineoneのC-2, C-7, C-26の立体化学は未決定であるため、合成化学的手法により決定することとした。

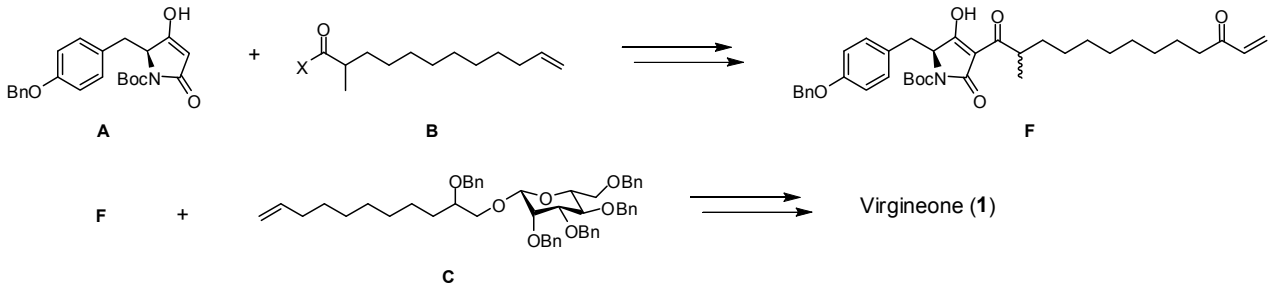




【方法・結果】テトラミン酸セグメント(**A**)、カルボン酸セグメント(**B**)、糖含有セグメント(**C**)の各セグメントの合成を行い、それぞれのカップリングによりvirgineoneが得られると考えた。合成に先立ち、C-2, C-7の相対立体配置、C-26と糖との相対立体配置を決定すべく合成研究に着手した。L-チロシンから５工程にてテトラミン酸セグメント(**A**)を合成し、カルボン酸セグメント(**B**)とのC-アシル化反応により3-アシルテトラミン酸誘導体を合成した。NMRスペクトルの解析により、virgineoneのカルボニルα-位のメチル基の立体化学について検討したところ、天然物はC-2もしくはC-7のエピマー混合物であるという知見が得られた。

次にC-26位の水酸基の立体化学について検討する為、モデル化合物(**D**)とマンノースから誘導した糖供与体とのカップリング体(**E**)を合成し、そのNMRスペクトルから天然物のC-26位の立体化学は*R*であると決定することができた。現在、各セグメントの合成、カップリングによりvirgineoneの全合成に取り組んでいる。





virgineone, tetramic acid, antibiotic

講演番号：3A07p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ A校舎07会場

疫病菌繁殖誘導ホルモンα2の合成と立体化学の決定及びα1の新規合成

Synthesis and absolute configuration of *Phytophthora* mating hormone α2 and novel synthesis of mating hormone α1

○矢島 新、戸田 皓、Shylaja D. Molli[1]、小鹿 一[1]、額田恭郎（東農大・応生、[1]名大院・生命農）

○Arata Yajima, Kou Toda, Shylaja D. Molli,[1] Makoto Ojika,[1] Tomoo Nukada (Tokyo Univ. of Agriculture, [1]Nagoya Univ.)

【目的】疫病菌(*Phytophthora*)はジャガイモやトマトなど様々な農作物に被害を及ぼす植物病原菌である。有性生殖を行う*Phytophthora*にはA1、A2の２種類の株が存在し、共に雌雄同体であり、A1株が放出してA2株に卵胞子形成を促進するホルモン用物質α1と、逆にA2株が放出してA1株に卵胞子形成を促進するホルモン様物質α2の存在が提唱されていた。筆者らは2008年にα1の可能な4種の立体異性体の全合成を達成し、それらの生物活性試験により天然物の絶対立体配置を決定した(Fig. 1)[1)]。最近、α2の平面構造が明らかにされた為[2)]、未だ不明である天然物の絶対立体配置の決定を目的として合成研究を行った。

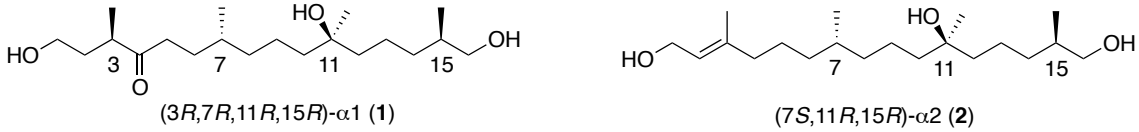


Fig. 1. Structures of *Phytophthora* mating hormones α1 and α2

【方法・結果】シトロネロールを出発原料として、スルホンカップリング、AD-mixによる不斉ジヒドロキシル化を鍵段階として、目的とする(7*S*,11*R*,15*R*)-α2の全合成を達成した。出発原料であるシトロネロールの鏡像体とAD-mixの組み合わせを変えることにより、(7*R*,11*R*,15*R*)- α2、(7*S*,11*S*,15*R*)-α2、(7*R*,11*S*,15*R*)- α2も合成した。

合成した４種の立体異性体の生物検定試験を行ったところ、(7*S*,11*R*,15*R*)- α2のみが天然物と同等の活性を有していることが明らかとなった。よって、天然のα2の絶対立体配置をα1と同様な7*S*,11*R*,15*R*と決定することができた。

上述のように既に筆者らはα1の不斉全合成により天然物の絶対立体配置を明らかとしているが、その合成では初期段階に於いて低収率の変換を含んでおり必ずしも効率的とは言えないものであった。そこで、α2の合成に用いた合成中間体よりα1を導く、より効率的な合成法の開発を検討したところ、スルホンカップリングを用いる方法によりα1を効率よく合成する新規合成法を確立することができた。

【引用文献】

1) Yajima, A. et al. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 235-238.

2) Ojika. M. et al. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 591-593.

Phytophthora, mating hormone, asymmetric synthesis

講演番号：3A07p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ A校舎07会場

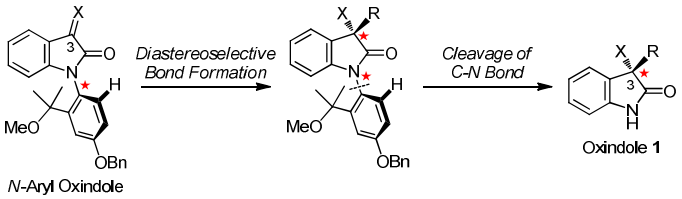
C-N軸性キラリティを利用した種々の3,3-二置換オキシインドール骨格の合成

Diastereoselective synthesis of 3,3-disubstituted oxindole from atropisomeric *N*-aryl oxindole

中崎　敦夫、○森　綾子、小林　進[1]、西川　俊夫（名大院生命農、[1]東理大薬）

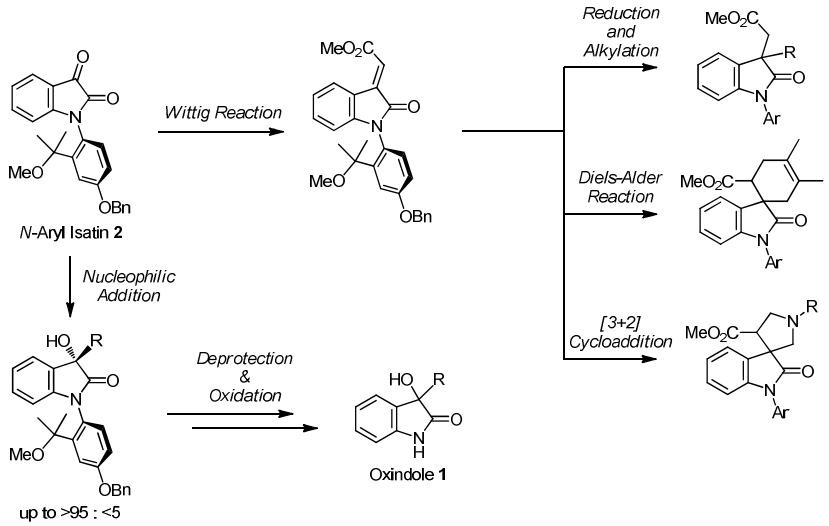
Atsuo Nakazaki, ○ Ayako Mori, Susumu Kobayashi[1], Toshio Nishikawa (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University; [1]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science)

【目的】3 位に不斉四置換炭素を有するオキシインドール骨格は生理活性を示す天然物に広く見受けられ、この骨格の構築法は現在までに種々開発されている。今回我々は、*N*-アリールオキシインドールの分子内軸性キラリティを利用して、オキシインドールの 3 位に不斉四置換炭素を構築する新たな立体制御法の開発を目指した(Scheme 1)。



Scheme 1

【方法・結果】共通前駆体として一置換*N*-アリールイサチン**2**を合成し、オキシインドールの3位に対してジアステレオ選択的な求核付加反応、アルキル化、Diels-Alder反応、[3+2]付加環化反応の検討を行った(Scheme 2)。その結果、ジアステレオ選択性は[3+2]付加環化反応では中程度であるが、求核付加反応、アルキル化、Diels-Alder反応では高いということが明らかとなった。続いて、アリール基の除去を行った。*N*-アリールオキシインドールの脱ベンジル化を行った後に酸化的切断を行うと、良好な収率でオキシインドール**1**が得られた。



Scheme 2

Oxindole, axial chirality, asymmetric synthesis

講演番号：3A07p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ A校舎07会場

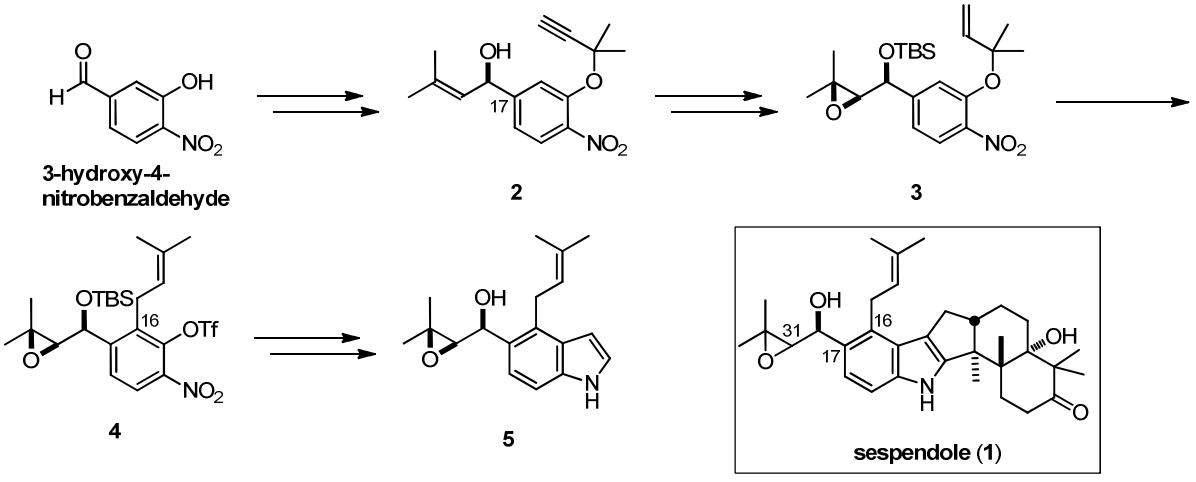
インドールアルカロイドSespendole芳香環部分の合成研究と立体化学の決定

Synthetic Studies on the Aromatic Segment of Sespendole and Stereochemical Assignment

○樋口恵子、Nopporn Thasana、安立昌篤、西川俊夫（名大院生命農）
○Keiko Higuchi, Nopporn Thasana, Masaatsu Adachi, Toshio Nishikawa (Nagoya University)

【目的】Sespendole(**1**)は、微生物の二次代謝産物として初めて単離されたインドールセスキテルペンである[1,2]。マクロファージの泡沫細胞化を抑制することが報告され[3]、動脈硬化抑制剤のシード化合物として期待されている。しかし、31位の絶対立体配置は決定されておらず、未だに全合成例はない。当研究室では、すでに**1**の右側に相当するテルペン部分の合成を報告している[4]。本研究では、31位の相対立体配置を決定することを目的とし、酸化度の異なる2つのイソプレニル基をもつ芳香環部分の合成を検討した。

【方法および結果】3-ヒドロキシ-4-ニトロベンズアルデヒドを出発原料として、**1**の17位に相当する位置にイソプレニル基を構築し、銅触媒を用いたプロパルギルエーテル化によってアリルアルコール**2**を合成した。イソプレニル基をMCPBAでエポキシ化し、*syn*のエポキシアルコールを立体選択的に合成した後、逆プレニルエーテル**3**のClaisen転位反応によって、16位にイソプレニル基を導入した。フェノールのトリフラート化によって**4**とした後、Stilleカップリング反応によってアセチレンを導入、ニトロ基の還元とCastro型の環化反応によりインドール**5**の合成に成功した。同様の手法により、**5**のジアステレオマーも合成し、両ジアステレオマー体と天然物の^{1}Hおよび^{13}C NMRスペクトルを比較した。その結果、両ジアステレオマー体における30-31位プロトン間のカップリング定数に大きな差は見られなかった。しかし、^{1}Hおよび^{13}C NMRの化学シフトに関して17位側鎖部分で顕著な差が見られ、特に*syn*体の化学シフト値が天然物と良い一致を示したことから、エポキシアルコールの相対立体配置は*syn*であると結論した[5]。



References 1) Tomoda, H. and Ōmura, S. *et al*. *Mycoscience* **2004**, *45*, 9. 2) Tomoda, H. and Ōmura, S. *et al*. *J. Antibiot.* **2006**, *59,* 338. 3) Tomoda, H. and Ōmura, S. *et al*. *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 93. 4) Sugino, K.; Nakazaki, A.; Isobe, M.; Nishikawa, T. *Synlett* **2011**, 647. 5) Adachi, M.; Higuchi, K.; Thasana, N.; Yamada, H.; Nishikawa, T. *Org. Lett.* **2011**, *in press*.

sespendole, structural elucidation, natural product synthesis

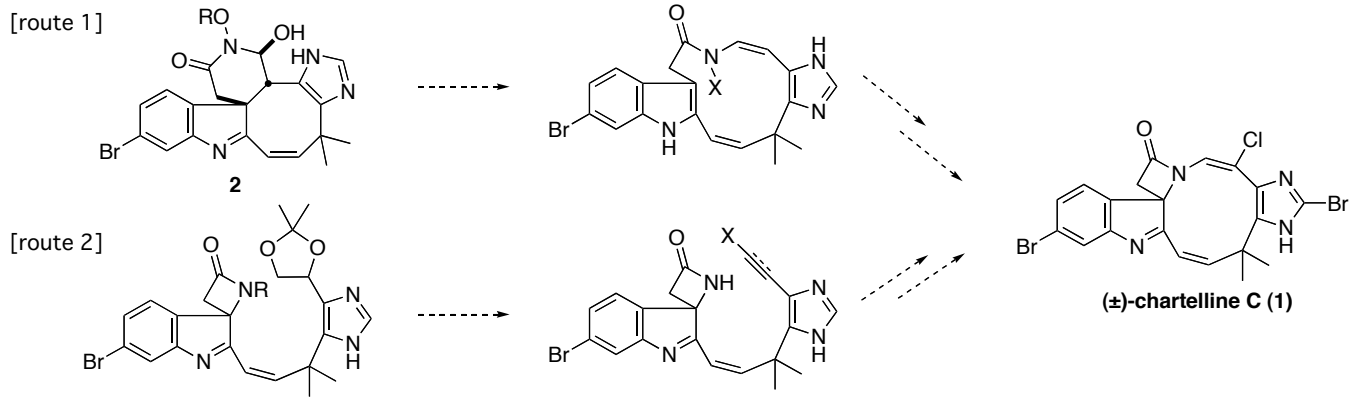
講演番号：3A07p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ A校舎07会場

海産アルカロイドチャルテリンCの合成研究

Synthetic Study on Chartelline C, a Marine Alkaloid.

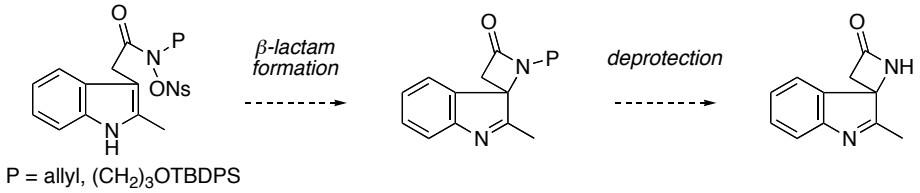
○原 由香里、梶井 重男、中崎 敦夫、磯部 稔、西川 俊夫（名大院生命農）
○ Yukari Hara, Shigeo Kajii, Atsuo Nakazaki, Minoru Isobe, Toshio Nishikawa
(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

【目的】 チャルテリン類は北海に生息するコケムシ*Chartella papyracea*から単離されたアルカロイドであり、その特異な構造から多くの合成研究が活発に行われている。当研究室ではこれまでに独自のアプローチによるチャルテリンC（**1**）の合成を検討している[1,2]。今回、五環性インドレニンの合成とその環拡大により１２員環ラクタムを合成するルート1、および、β-ラクタムを形成した後に１０員環合成を行う合成ルート2で**1**の全合成を目指した(**Scheme 1**)。



Scheme 1

【結果】インドールフラグメントとイミダゾールフラグメントを連結し、環化前駆体を合成した後に、五環性インドレニン**2**の合成を試みた。しかし再現性の問題により、ルート1を断念した。現在、ルート2で行うβ-ラクタムの窒素上の脱保護の検討を行うため、モデル基質を用いた変換を検討中である(**Scheme 2**)。



Scheme 2

References: 1) S. Kajii *et al*. *Synlett* **2004**, 2025. 2) S. Kajii *et al*. *Chem. Conmmun*. **2008**, 3121.

Chartellines, indolenine β- lactam, total synthesis

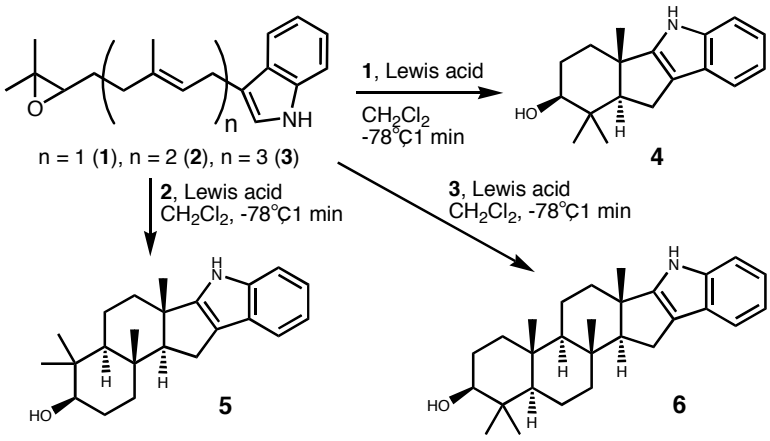
講演番号：3A07p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ A校舎07会場

生合成類似環化反応による新規インドールテルペン類の合成研究

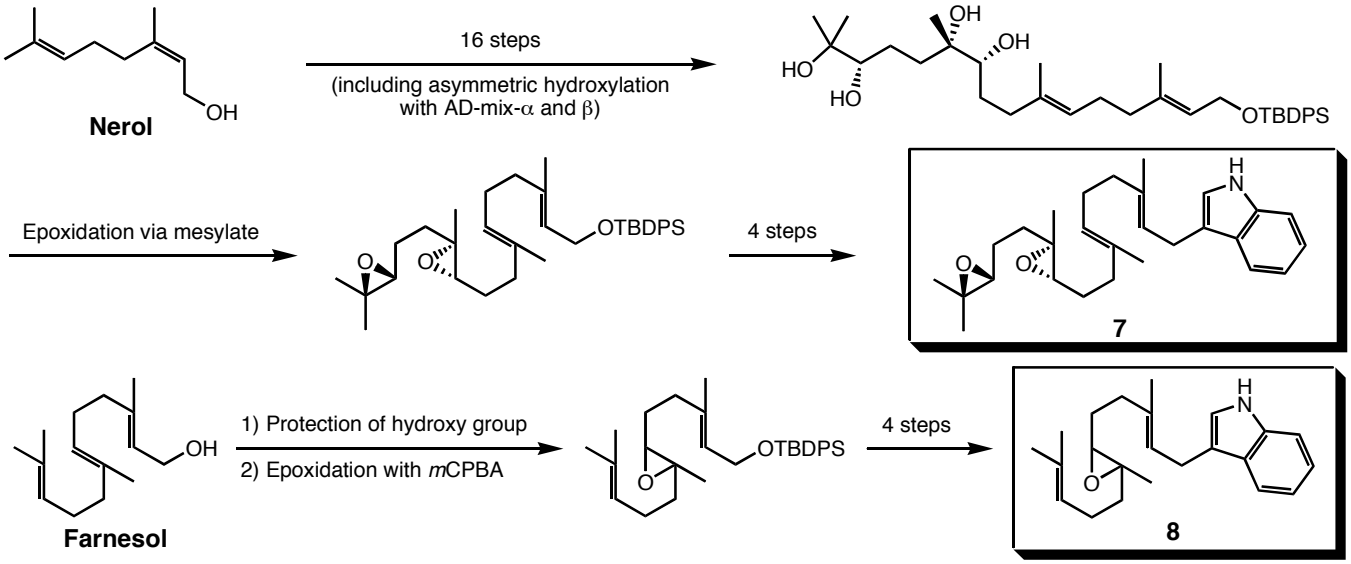
Synthetic study of novel indole terpenes by biomimetic cyclization

○井坂哲也、長谷川守文[1]、戸嶋浩明[1]（農工大院・連農、[1]茨大・農）
○Tetsuya Isaka, Morifumi Hasegawa, Hiroaki Toshima[1] (Noukoudaiinn, [1]Ibadai)

【目的】一部のインドールアルカロイドの複雑な多環性骨格は，環化酵素によって形成される．これらの環化酵素による骨格形成は興味深く，生合成類似環化反応の研究が行われている。我々は，これまでに末端エポキシド (**1**, **2**, **3**) を化学合成し，生合成類似環化反応を用いた新規インドールテルペン類の合成 (**4**, **5**, **6**) を報告している．本研究では，paspalineの前駆体と考えられる化合物 (**7**)と，環化反応によって新規物質の合成が見込まれる (**8**) を合成し，ルイス酸による生合成類似反応を行って得られる環化生成物の単離・構造決定を行い，生合成類似環化反応における新たな知見を得ることを目的とした．



【結果】Neroleを原料とし，AD-mix-αおよびβによる不斉ジヒドロキシル化とメシレートを経由したエポキシ基の導入を鍵反応として２０段階の反応で(**7**)を合成した。また、farnesolを原料とし，*m*CPBAによるエポキシ化を鍵反応として７段階の反応で (**8**) を合成した．現在，ルイス酸 (BF_3, $MeAlCl_2$, $SnCl_4$, $TiCl_4$) を用いて環化反応を行い，環化生成物の単離構造決定を行っている．



indole sesquiterpene, indole diterpene, biomimetic cyclization

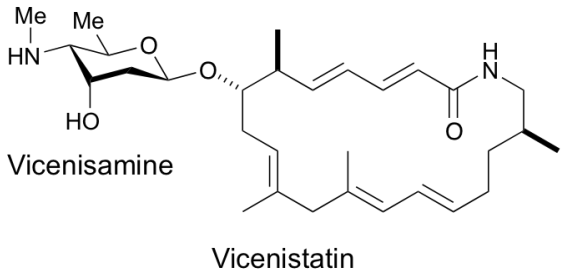
講演番号：3A07p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ A校舎07会場

カーバマートのヨード環化反応を用いたデオキシアミノ糖類の新規合成法の開発

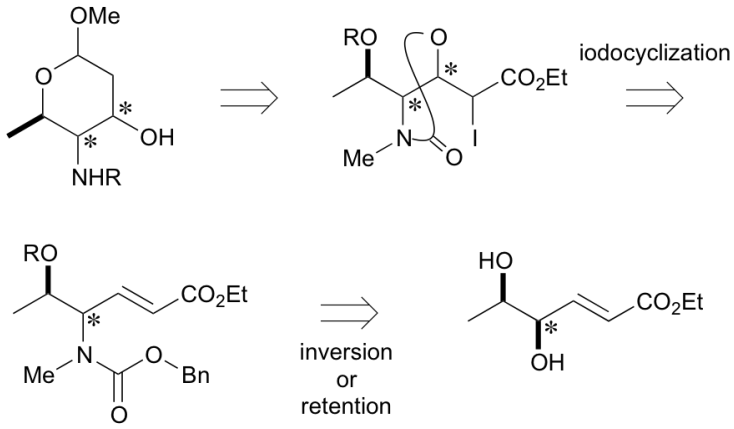
A novel route to 4-amino-2,4,6-trideoxy sugars: stereoselective syntheses of D-vicenisamine and epimer via iodocyclization of carbamate

○松島 芳隆、記野 順（浜松医科大学・化学）
○Yoshitaka Matsushima, Jun Kino (Hamamatsu Univ Sch of Med)

【目的】デオキシアミノ糖は抗腫瘍抗生物質など重要な生理活性をもつ天然物に見いだされ、その活性発現に必須の構成成分であることが多い。２０員環マクロラクタム系抗腫瘍抗生物質ビセニスタチンについても構成アミノ糖であるビセニサミンは活性発現に必須なデオキシアミノ糖である。本合成研究は、ビセニサミンの新規合成法を確立する目的で始められたものであり、両鏡像体の合成に適用可能な汎用性の高い合成法を目指したものである。



【方法・結果】シャープレスの不斉ジヒドロキシル化反応を用いて得られる光学活性ジオールを出発原料とし、まず４位水酸基を窒素官能基へ変換した。この際、前法[1]ではトシラートを経由して行っていたものを、環状チオノカーボナートを経て立体反転を伴ってアジド基を導入することで水酸基の選択的保護が不要となり、より効率的な合成法とすることができた。その後、アミノ基のカーバマート保護基を利用したヨード環化反応 iodocyclization (iodocyclocarbamation) によって３位酸素官能基の導入に成功した。引き続き、還元、脱保護などの変換によって、4-アミノ-2,4,6-トリデオキシ糖の１種である D-vicenisamine の新規合成法を確立した。また、出発原料のジオールの環状カーボナートを中間体としたパラジウム触媒を用いた手法により、立体保持で窒素官能基の導入を行った。こちらの異性体についても同様の反応を行い、4-*epi*-D-vicenisamine の合成にも成功した。反応の詳細について報告する。



1) Y. Matsushima and J. Kino, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 8609-8612.

deoxyamino sugar, iodocyclization, vicenisamine

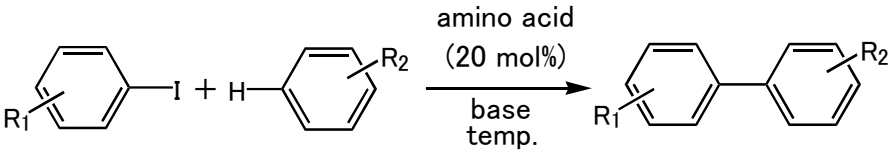
講演番号：3A07p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ A校舎07会場

アミノ酸を触媒としたベンゼンの直接的アリール化

Amino acid-catalyzed direct C-H arylation of unactivated benzene

○上野　穣、谷森　紳治、切畑　光統（阪府大院生命環境・応生科）
○Minoru Ueno, Shinji Tanimori, Mitsunori Kirihata (Hanfudaiinseimeikankyou)

【目的】 ビアリールは、医薬品や農薬、有機電子材料などとして利用される重要な構造モチーフの１つである。ビアリール化合物は、ハロゲン化アリールと有機金属化合物を原料として、根岸カップリングや鈴木－宮浦カップリング反応などにより合成されている。また近年、アレーンのC－H結合を直接、ハロゲン化アリールや有機金属化合物と反応させる合成法も報告されている。しかしながら、これらの反応で用いられる重金属触媒や配位子には、高コスト性や有毒性、そして使用後の環境汚染などの問題点があることから、それらを使用しない触媒系の開発が望まれている。このような例として、伊丹らは遷移金属触媒を用いないハロゲン化アリールとヘテロ環化合物のクロスカップリング反応を報告している。[1] また近年、ジメチルエチレンジアミンや1,10-フェナントロリンなどの有機分子を触媒として用いたビアリール合成法も報告されている。本研究では、有機分子触媒としてアミノ酸に着目し、ヨウ化アリールとアレーンを出発物質とした遷移金属触媒を用いないクロスカップリング反応の開発に取り組んだ。



【方法・結果】 まず、4-メトキシヨードベンゼンとベンゼンをモデル基質に用いて、反応条件の最適化を行った。3当量の *tert*-ブトキシカリウムの存在下、150℃で24時間、様々なアミノ酸を触媒として反応を行ったところ、L-プロリンを20 mol%用いた時、クロスカップリング生成物である4-メトキシ-1-フェニルベンゼンが87%と最も高い収率で得られた(entry 1)。これを最適条件として、種々のヨウ化アリールとの反応に適用した。その結果、2-メトキシヨードベンゼン(entry 2)、4-フルオロヨードベンゼン(entry 4)、ならびに2-ヨードピリジン(entry 7)を用いた時、反応は円滑に進行し、相当するクロスカップリング生成物がそれぞれ70-83%の高収率で得られた。また、3-メトキシならびに2-フルオロヨードベンゼンや3-ヨードピリジンを用いた時、それぞれ中程度の収率で反応が進行した(entries 3, 5, 6)。現在、他の基質についても反応を行っている。

entry	Ar-I	temp (℃)	time (h)	yield[a] (%)
1	4-$MeOC_6H_4$-I	150	24	87
2	2-$MeOC_6H_4$-I	180	24	70
3	3-$MeOC_6H_4$-I	150	24	49
4	4-FC_6H_4-I	150	24	71
5	2-FC_6H_4-I	150	24	54
6	3-pyridyl-I	150	6	49
7	2-pyridyl-I	150	24	83

a. Isolated yield.

参考文献

1. Yanagisawa, S.; Ueda, K.; Taniguchi, T.; Itami, K. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4673-4676.

organocatalyst, cross-coupling, biaryl

講演番号：3A07p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ A校舎07会場

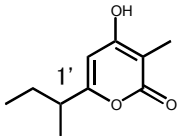
Surugapyrone B の全合成による絶対構造の解明ならびに誘導体の合成と抗酸化性評価

Chiral synthesis, determination of absolute configuration, and antioxidant activity of surugapyrone B and derivatives

○大向宏明，谷森紳治，切畑光統（阪府大院生命環境・応生科）
○Hiroaki Ohmukai, Shinji Tanimori, Mitsunori Kirihata (Hanfudaiin seimeikankyou)

【目的】

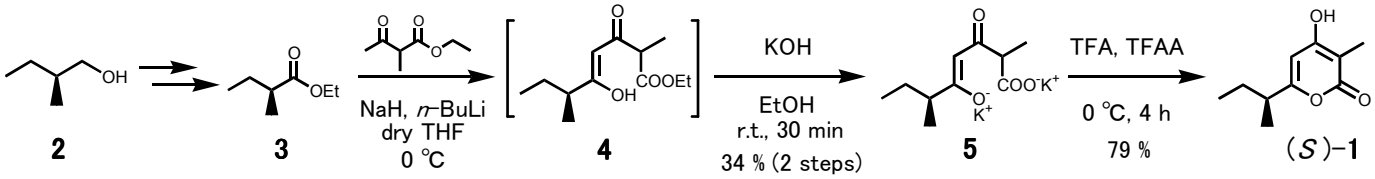
Surugapyrone B(**1**)は、杉山、廣田らにより放線菌 *Streptomyces* sp.USF-6280 から単離された DPPH ラジカル捕捉活性物質であり、その平面構造はα−ピロン誘導体 **1** のように決定された。[1)] しかし、1'位の不斉炭素原子の立体配置は解明されていなかった。そこで、本研究では、入手容易な(*S*)-2-methyl-1-butanol(**2**)を出発物質に用い、そのキラリティーを保持したまま(*S*)-**1** を合成し、天然物との比旋光度の比較から、**1** の絶対立体構造を決定することにした。また、様々な側鎖類縁体を合成し、DPPH ラジカル捕捉活性評価を行った。



1

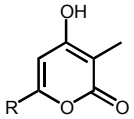
【方法と結果】

まず、(*S*)-2-methyl-1-butanol(**2**)から 2 工程を経てエステル **3** を得た。これに、2−メチルアセト酢酸エチルから、2 等量の強塩基により発生させたジアニオン体を反応させ縮合物 **4** を得た後、アルカリ加水分解によって、カリウム塩 **5** へと導いた。最後に **5** に対し、トリフルオロ酢酸を用いて環化させ、目的物である(*S*)-**1** を得た（全収率 13%）。



2 **3** **4** **5** (*S*)−**1**

合成した(*S*)-**1** の比旋光度は$[\alpha]_D^{23}$ +20.5 であり、surugapyrone B の比旋光度$[\alpha]_D^{20}$ +22.2 との比較から、1'位の不斉炭素原子の立体配置は *S* であることが決定された。また、同様の方法で様々な置換基をもつエステルを原料として用い、surugapyrone B 類縁体 **6** を合成した。さらに、**6** について吸光度計を用い、DPPH ラジカル捕捉活性評価を行ったところ *p*-メトキシ体が surugapyrone B の約 2 倍の活性を示した。



6

R = Ph, *o*-$MeOC_6H_4$, *p*-$MeOC_6H_4$, *m*-MeC_6H_4, *o*-BrC_6H_4, *p*-ClC_6H_4, 2-thienyl, 2-furanyl, Et, *s*-Bu

参考文献

1) 杉山 靖正，廣田 陽ら，天然有機化合物討論会講演要旨，*49*, 323-328, **2007**.

chiral synthesis, Surugapyrone B, antioxidant activity

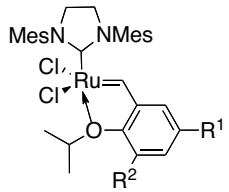
講演番号：3A07p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ A校舎07会場

高活性型ライトフルオラスメタセシス触媒の合成

Synthesis of highly activated light fluorous metathesis catalysts

○土屋 勇輝、小林 佑基、鈴村 直紀、塩入 孝之、松儀 真人（名城大・農）
○Yuki Tsuchiya, Yuki Kobayashi, Naoki Suzumura, Takayuki Shioiri, Masato Matsugi (Fac. Agric. Meijo Univ.)

【目的】 メタセシス反応は、炭素-炭素結合を形成する重要な触媒反応の一つである。本反応では一般に Grubbs-Hoveyda 2nd generation **1a** が汎用されるが、本触媒は非常に高価であり効率的に回収再利用されることが望ましい。これまでに我々は、ライトフルオラスメタセシス触媒 **1b** を合成し、ライトフルオラスタグの特性を利用することで、本触媒の回収のみならず触媒活性を向上させることに成功している [1]。今回我々は、リガンド芳香環上の置換基修飾 [2] に基づく触媒活性の更なる向上を目指し、新規ライトフルオラスメタセシス触媒 **1c~1e** の合成を試みた (**Figure 1**)。

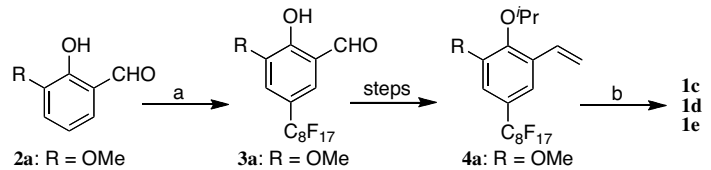


1a: R^1 = H, R^2 = H
1b: R^1 = C_8F_{17}, R^2 = H
1c: R^1 = C_8F_{17}, R^2 = OMe
1d: R^1 = C_8F_{17}, R^2 = O^{i}Pr
1e: R^1 = C_8F_{17}, R^2 = Ph

Figure 1

【方法・結果】 サリチルアルデヒド体 **2a**, **2b** を出発原料とし、芳香環上への直接パーフルオロアルキル化反応 [3] を鍵反応として位置選択的にライトフルオラスタグを導入したフルオラスタグ導入体 **3a** 及び **3b** を得た。これらを鍵中間体として、メトキシ基を有するリガンド **4a** 、及びジイソプロポキシ基を有するリガンド **4b** へとそれぞれ **3a** から 3 段階、及び 2 段階の反応で誘導した。また、フェニル基を有するリガンド **4c** は、 **3b** から鈴木クロスカップリングを含む 4 段階の反応により調製した。最後に、リガンド **4a~4c** を用いて Grubbs 2nd generation とのリガンド交換反応を行い、新規ライトフルオラスメタセシス触媒 **1c~1e** を合成することに成功した (**Scheme 1**)。三置換ジエン体 **5** を基質とした閉環メタセシス反応により、触媒 **1c~1e** の触媒活性を調べた結果、 **1c** 及び **1d** は市販触媒 **1a** よりも高い触媒活性を示すことがわかった (**Figure 2**)。

Scheme 1



2a: R = OMe
2b: R = H

3a: R = OMe
3b: R = H

4a: R = OMe
4b: R = O^{i}Pr
4c: R = Ph

Reagents and conditions:
(a) V-70L, $C_8F_{17}I$, Cs_2CO_3, DMF, rt, 20 h, **3a**: 59%, **3b**: 36%.
(b) Grubbs 2nd generation catalyst, CuCl(I), CH_2Cl_2, rt, 3 h, **1c**: 50%, **1d**: 31%, **1e**: 25%.

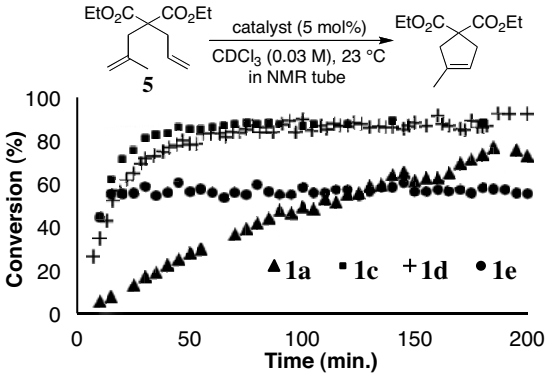


Figure 2. 触媒活性の比較

1) Matsugi, M.; Tsuchiya, Y. et al. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7905-7908.
2) Butenschön, H. et al. *Organometallics* **2008**, *27*, 1878-1886.
3) Matsugi, M. et al. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4189-4191.

metathesis catalysts, light fluorous tag, highly activation.

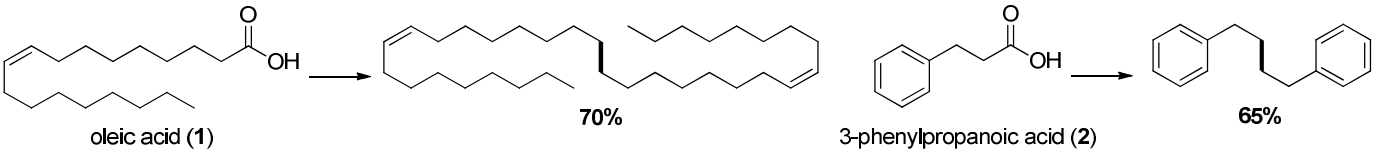
講演番号：3A07p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ A校舎07会場

シクロアルカン熱応答性多相電解溶液における連続的コルベカップリング

Continuous Kolbe-coupling assisted by cycloalkane-based thermomorphic multiphase electrolyte solution

○上村　和也，岡田　洋平，千葉　一裕（東農工大・農）
○Kazuya Kamimura, Yohei Okada, Kazuhiro Chiba (Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

【目的】不均一触媒を用いる有機合成は分離精製が簡便であり，工業的にも広く応用されている．均一触媒を固体へと担持する試みも多く，触媒活性の低下を最小限に抑えつつ，効率的な分離精製ならびに触媒の再利用性を獲得した例が報告されている．有機電解法では支持電解質を含む極性有機溶媒中で電子そのものを試薬として電極上で化学反応が進行するため，多様な不均一反応を達成する手法となる．我々の研究室では，低極性溶媒であるシクロアルカンと様々な極性有機溶媒が温度変化により可逆的に相溶，分離を繰り返す現象を見出し，多様な化学プロセスに応用してきた．これを有機電解法に応用することで，極性電解溶液に難溶の低極性基質が利用可能になるばかりでなく，相分離によって反応生成物を連続的にシクロアルカン相へと回収することで目的生成物の電極表面での過酸化による収率低下を抑制する効果が期待される．本研究では，代表的な有機電解反応であるコルベカップリングをモデルとして用い，シクロアルカン熱応答性多相溶液系による連続的な反応システムの構築を試みた．
【方法】極性有機溶媒としてメタノール，アセトニトリル，ピリジンを用い，シクロアルカン（C5～C8）の熱応答性を評価した．コルベカップリングは，支持電解質として水酸化カリウムを含む極性有機溶媒に同体積のシクロアルカンを加えた多相電解溶液中，白金電極を用い定電流および無隔膜の条件で行った．
【結果】極性有機溶媒に対して各種シクロアルカンが炭素数に依存した熱応答性を示すことが見出され，目的の温度帯に応じてシクロアルカンを使い分けることが可能となった．特にシクロヘキサンを基軸とした多相電解溶液を用いることで，低極性なカルボン酸（C8～C18）の効率的なコルベカップリングが達成された．極性溶媒は基質であるカルボン酸に応じて自由に組み合わせることが可能であり，いずれの場合も目的生成物はシクロヘキサン相へと選択的に回収されるため，連続的な反応が実現できる．本手法によって，oleic acid（**1**）や相対的に酸化電位の低い 3-phenylpropanoic acid（**2**）についても効率的にコルベカップリングが進行し，良好な収率で目的生成物を与えることが示された．



oleic acid (**1**)　　3-phenylpropanoic acid (**2**)

【参考文献】Okada, Y.; Yoshioka, T.; Koike, M.; Chiba, K.; *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 4690-4693.

cycloalkane, thermomorphic multiphase electrolyte solution, Kolbe-coupling

講演番号：3A07p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ A校舎07会場

陽極酸化を用いた置換ピロリジンの一段階合成

One-step synthesis of substituted pyrrolidines using anodic oxidation

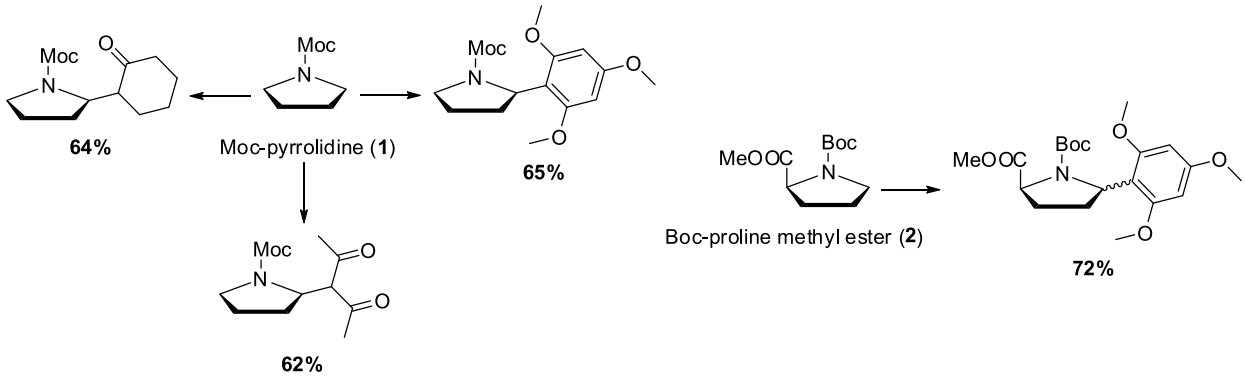
○小路　貴生，岡田　洋平，金　承鶴，千葉　一裕（東農工大・農）

○Takao Shoji, Yohei Okada, Shokaku Kim, Kazuhiro Chiba (Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

【目的】ピロリジンは，タンパク質の立体構造に大きく寄与するプロリンの骨格としてだけでなく，多様な生物活性を有するアルカロイドの構成要素としても天然に多く存在している．特に近年ではプロリン自身が不斉触媒としての機能を有することが見出され，これを用いた立体選択的な有機合成ならびに様々な置換ピロリジンの合成法が報告されている．我々の研究室では，過塩素酸リチウム／ニトロメタンを電解溶液として用いた陽極酸化によってピロリジン由来のイミニウムカチオンを発生させ，通電後にこれを種々の求核剤で捕捉することで様々な置換ピロリジンを一段階で合成できることを見出している．本研究では，従来法では合成が困難であった置換ピロリジンの合成を試みた．

【方法】陽極酸化は，過塩素酸リチウム／ニトロメタン溶液中でカーボンフェルト電極を用い，定電位および無隔膜の条件で行った．通電後各種求核剤を添加することでイミニウムカチオンを捕捉し，目的とする置換ピロリジン化合物を得た．

【結果】Moc-pyrrolidine (**1**)を基質として用いることで，様々な炭素求核剤を導入した置換ピロリジン化合物が一段階で合成できることが示された．(cyclohex-1-en-1-yloxy) trimethylsilaneやpentane-2,4-dioneなどの脂肪族求核剤に加え，3,4,5-trimethoxybenzeneのような芳香族求核剤も効率的に一段階でピロリジン骨格中に導入することが可能である．また，基質としてBoc-proline methyl ester (**2**)を用いることで，効率的に二置換のピロリジン化合物も合成できることが示された．これらの反応は従来の合成法では困難であった不活性ピロリジンメチレン上への置換基導入を可能にしており，本手法を用いることで新たなイミノ糖ヌクレオチド核酸アナログの合成法が拓かれることが期待される．



【参考文献】Kim, S.; Hayashi, K.; Kitano, Y.; Tada, M.; Chiba, K. Org. Lett. **2002**, 4, 3735-3737.

anodic oxidation, pyrrolidine, lithium perchlorate/nitromethane

講演番号：3A07p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ A校舎07会場

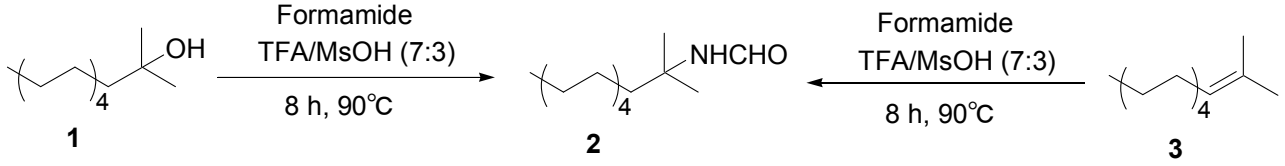
アルコール及びアルケンからのアミド化合物との反応によるN-置換アミドの合成

Synthesis of N-substituted amides from alcohols or alkenes with amides

○岡田 郁、千葉 一裕、北野 克和（東農工大・農）
○Iku Okada, Kazuhiro Chiba, Yoshikazu Kitano (Tokyo univ. of Agric. and Technol.)

【目的】アミド化合物は、天然物に多く見られ、医薬品としても有用な活性を持つだけでなく、有機合成や高分子合成のブロックとして広く用いられるなど、非常に重要な化合物である。一般的なN-置換アミド化合物の合成方法としては、ニトリル化合物を用いた、Ritter反応による方法がある。この方法は、酸性条件下で、アルコール、及びアルケンとニトリル化合物からN-置換ホルムアミドを合成する優れた方法であるが、N-置換ホルムアミドの合成を目的とする場合には、ニトリル化合物として、毒性の高いシアン化物を使う必要がある。N-置換ホルムアミドは、その脱水生成物であるイソニトリル化合物が、Ugi反応やPasserini反応などの多成分反応の基質となること、また、付着阻害活性などの様々な生理活性を有することから有用な化合物である。そこで我々は、ニトリル化合物の替わりに、アミド化合物を用いたN-置換アミド化合物を得る方法を検討した。この方法では、N-置換ホルムアミドを合成する場合に、シアン化物ではなく安全、安価なホルムアミドを用いることが可能である。これまでに、ホルムアミドとアルコールからのN-置換ホルムアミドの合成法としては、ブレンステッド酸を用いた1-アダマンタノールとホルムアミドの反応が報告されている。しかしながら、その他のアルコールを基質とした、ブレンステッド酸条件下でのアミド化合物を用いたN-置換アミド化合物の有効な合成方法は報告されていない。そこで本研究では、より広範なアルコール、及びアルケンを原料とした、アミド化合物とブレンステッド酸によるN-置換アミド化合物の合成法を検討した。

【方法と結果】ホルムアミドとブレンステッド酸を用いて、アルコールを対応するホルムアミドへと変換する方法を検討した。ブレンステッド酸の種類、ホルムアミドとの比率、当量などを検討した結果、2-メチル-2-ドデカノール **1** にホルムアミド、トリフルオロ酢酸、メタンスルホン酸を適当量加え加熱することで、目的とする*N*-(2-メチル-2-ドデシル)ホルムアミド **2** を高収率で得た。また、三置換アルケン **3** を原料とした場合にも、同様の条件で反応を行った場合、目的とするN-置換アミド化合物 **2** が得られたことから、本反応は三置換アルケンおいても有効に作用することが確認された。さらには、同様の条件下、アセトアミド、ベンズアミドを用いた場合にも、目的とするN-置換アミド化合物を得ることができ、ホルムアミド以外のアミドについても本反応は有効であることが示唆された。



1 **2** **3**

amide, alcohol, alkene

講演番号：3A07p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ A校舎07会場

環境調和型酸化的エーテル環化反応の開発

Development of environmentally benign oxidative cycloetherification

○知名 秀泰、岡田 豊（立命館大・生命科学）
○Hideyasu China, Yutaka Okada (Ritsumeikan Univ.)

【目的】近年、注目されている海洋天然物の多くに環状エーテル構造が含まれる傾向があり、効率的なエーテル環形成法の構築が求められている。また有機溶媒などの化学物質による環境負荷が懸念されている中で環境調和型の反応も求められている。Bromoperoxidase（BPO）などの酵素は低効率ながら水系反応場で酸化的エーテル環化活性を示すことから、これを改良することにより環境調和型のエーテル環形成法の構築が可能である。この活性における反応機構の全貌は未だ明らかになっていないが、酵素活性は遊離性の活性種に依存していることから、酵素非存在下でも系内で活性種を発生させることによりBPOと同様な活性が期待できる。本研究では、BPOの活性をモデルとし海洋天然物合成に有用な環境調和型酸化的エーテル環化反応の開発を試みた。

【方法・結果】Perhydrolase（metal-free BPO）の活性測定条件（0.5M NaBr存在下、25℃、pH5.5の1.0M 酢酸緩衝液中）を基に、過酢酸（AcOOH）で臭素化反応を行った。まず、モノクロロジメドン（MCD）を基質に用いた解析から、pH、温度、基質濃度、NaBr濃度、及びAcOOH濃度依存性を検討した。反応速度は疑一次反応となり基質濃度に依存しなかったことから、MCDの臭素化反応は活性種の生成が律速段階になることが示され、活性種の生成速度の解析が可能になった。活性種は、酸性、低温、及び低NaBr濃度条件下で効率良く生成されることが示された。特に活性種はCO_2に熱分解され易いことから、Hunsdiecker反応の中間体として知られる次亜臭素酸アセチル（AcOBr）を活性種として提案した。活性種の生成はAcOOHの分解よりも活性化エネルギーが低く反応速度定数が高いことから、活性種の生成が優先的に進行することが示され、生成機構はカルボカチオン中間体を経由するAcOOHの分解機構に類似すると提案した（図1）。次にMeOH混合条件下によるアルケンの臭素化反応から、次亜臭素酸メチル（MeOBr）のシン付加体を検出した。この結果は、水中で次亜臭素酸アルキル（ROBr）の発生を示唆した。そこでアルケノールの臭素化反応を検討したところ、ネロール**1**からブロモ体**2**-**5**を与えるのと同時にブロモエーテル環化体**6**が得られた（図2）。この*exo*型の反応は、Markovnikov則に従いブロモニウム中間体を経由した。本研究は、BPOによる酸化的エーテル環化反応を酵素非存在下で可能にした。

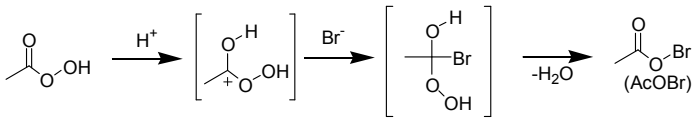


図１　次亜臭素酸アセチルの生成機構

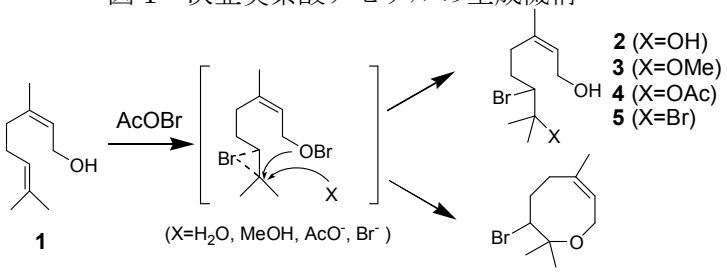


図２　ブロモエーテル環化反応の反応機構

Oxidative cycloetherification, Environmentally benign, Bromoperoxidase

講演番号:3A08a01
講演日時、会場:3月24日09:00～ A校舎08会場

サイトカインLECT2及びV58I変異体のリフォールディング及び構造とダイナミクスの解析

Refolding of cytokine LECT2 and the V58I mutant and their crystal structures and dynamics analysis

○鄭 海、宮川 拓也、澤野 頼子、山越 智[1]、鈴木 和男[2]、田之倉 優（東大院・農生科、[1]国立感染研・生物活性物質、[2]千葉大院・医）

○Hai Zheng, Takuya Miyakawa, Yoriko Sawano, Satoshi Yamagoe[1], Kazuo Suzuki[2], Masaru Tanokura (The Univ. of Tokyo, [1]National Inst. of Infectious Diseases, [2]Chiba Univ.)

【目的】LECT2(Leukocyte cell-derived chemotaxin 2)は好中球の走化性因子であり、133残基からなる塩基性タンパク質である。3対のジスルフィド結合をもつ1次構造上の特徴が明らかとなっている。本研究では、LECT2の立体構造を決定し、その構造的特徴を手掛かりにしてLECT2の分子機能を解明するとともに、V58I変異が構造と分子機能に与える影響を明らかにすることを目指している。

【方法】タンパク質の立体構造と機能の解析には大量の試料が必要であるが、大腸菌を用いて可溶性画分として得られたLECT2の量は非常に少なかった。そこで200 MPaの高圧処理によりLECT2の封入体からのリフォールディングを行った。このLECT2およびV58I変異体について、ボイデンチャンバー(Boyden Chamber)法でケモカイン活性を測定し、結晶化とX線回折実験を行った。さらに、NMRを用いてダイナミクス解析を試みた。

【結果】可溶性発現したLECT2と比較して同スケールの培養で40倍量のLECT2を高圧処理によるリフォールディングで取得できた。このLECT2はケモカイン活性を示した。また、LECT2及びV58I変異体のケモカイン活性に有意差は認められなかった。LECT2はZn(II)結合タンパク質であるが、$ZnCl_2$の添加はケモカイン活性を亢進しないことから、LECT2のケモカイン活性はZn(II)に依存しないと考えられる。さらに、LECT2及びV58I変異体の結晶構造をそれぞれ分解能1.94 Åと1.60 Åで決定した。それらの結晶構造を比較した結果、両者の構造に全く違いを見出すことができなかった。そこで、V58Iのタンパク質ダイナミクスに与える影響を観測するために、NMRによりT_1、T_2、NOE等の緩和測定データを取得し解析を行っている。一方、DALIサーバーを用いた構造アラインメントの結果、LECT2はメタロエンドペプチダーゼのLytMと立体構造の類似性が認められた。このため、メタロエンドペプチダーゼ活性の解析を進めている。今後、得られた構造情報から分子機能の解明にアプローチするとともに、マイクロ秒からミリ秒オーダーの運動性を解析することにより、変異が活性に及ぼす影響を解析する。

High pressure refolding, X-ray crystallography, Chemotaxis

講演番号：3A08a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ A校舎08会場

タンパク質の品質評価における示差走査蛍光定量の応用

Assessment of protein quality using differential scanning fluorimetry

○稲垣かおる、古澤孝太[1]、露崎知世[1]、鈴木文昭[1]、中川寅[1]、海老原章郎[1]（岐大院・応生、[1]岐大・応生）

○Kaoru Inagaki、Kota Furusawa[1]、Tomoyo Tsuyuzaki[1]、Fumiaki Suzuki[1]、Tsutomu Nakagawa[1]、Akio Ebihara[1]（Grad. sch. of appl. biol. sci.、[1]Fac. of Appl. Biol. Sci）

【目的】タンパク質の構造機能研究において、タンパク質の品質評価は重要だ。例えば、研究に用いるタンパク質標品の保存する溶液条件による影響や、リフォールディングした標品が活性を有するか否かを判別する場合に際し、標品の品質を確認する必要がある。タンパク質の保存溶液の条件やリフォールディング条件は多岐にわたるため、多検体の測定が可能な評価法が求められる。タンパク質の安定性評価法の一つである示差走査蛍光定量（differential scanning fluorimetry: DSF）は、幅広いタンパク質に適用可能なだけでなく、リアルタイムPCR装置の利用により迅速かつ大規模に安定性を評価できる利点がある。そこで本研究は、卵白リゾチームを試験タンパク質として、DSFがタンパク質の品質評価法として応用可能かを検討した。

【方法】蛍光色素SYPRO Orangeの存在下で、様々なpH（pH 3.5~9.5）と塩濃度に置いた卵白リゾチーム溶液を96穴プレート上で調製した。その溶液をリアルタイムPCR装置によって25～95℃まで1 ℃/min の速度で昇温させ、1℃ごとに蛍光を検出した（励起光 : 490 nm 付近、蛍光 : 600～630 nm）。得られた蛍光強度プロットにシグモイド型の回帰曲線を適用し、変性中点温度T_mを算出した。次に、卵白リゾチームをThermo Scientific Pierce Protein Refolding Kitを用いてリフォールディングした。リフォールディング後の卵白リゾチームを上記と同様の方法でDSFに供しT_mを算出した。また、*Micrococcus luteus*を基質としたリゾチーム活性から、リフォールディング収率を求めた。

【結果・考察】予備実験から、96連で実験を行った場合の標準偏差が±0.2℃以下となる操作方法を決定した。pHと塩濃度を組み合わせ種々の条件でT_m値の変動が検出され、卵白リゾチームがpH 4.0~5.5の範囲でT_m値が最大となり、そのpH領域で高い安定性を示すことが分かった。リフォールディング標品の品質確認では、リフォールディングされた標品、リフォールディングが十分でない標品、天然構造の標品について蛍光強度プロットの差を確認することができた。また、天然構造の標品にT_m値が近い標品ほど、リフォールディング収率が高くなる傾向にあった。以上の結果から、DSFがタンパク質の品質評価法の一つとして活用できる可能性が考えられる。

Protein quality, Differential scanning fluorimetry

講演番号：3A08a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ A校舎08会場

オボアルブミン重合体形成におけるフォールディング中間体の寄与

Folding intermediate on the polymerization of ovalbumin

〇杉田 知衣梨、高橋 延行、三上 文三（京大院農・応用生命）

〇Chieri Sugita, Nobuyuki Takahashi, and Bunzo Mikami (Division of Applied Life Sciences・Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】オボアルブミンは全卵や卵白の食品機能特性を特徴付ける重要なタンパク質素材であり、加熱によるポリマー化の機構について詳細に検討されてきた。この過程にアミロイド線維の関与することが示されていたので(1)、そのコアと成り得る領域を探索し、オボアルブミンの一次構造上、N末端に近いヘリックスB近傍の領域を候補として見出した(2)。加熱によりオボアルブミンのこの領域が部分的に変性し、天然とは異なるコンフォメーションを取ることによって、他の分子と結合すると考えられるが、その実態は不明である。そこで、本研究では、オボアルブミンの重合体形成の分子機構を解明するために、加熱による重合体の形成と、尿素により変性した状態から変性剤を希釈することによりリフォールディングさせる過程との関連を検討した。

【方法】

＜材料＞〇産卵後1日を経ない鶏卵を採集し、硫安塩析と結晶化により卵白からオボアルブミン画分を調製、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、分子内に2か所のリン酸化セリン残基を含むA1画分のみを集めて実験に用いた。

＜方法＞（加熱）主に20mMTris-HCl(pH8.0)溶液中で、80℃に加熱し、一定時間後サンプルを取り出し、氷水にて急冷した。（リフォールディング）4mg/mlオボアルブミンについて8M尿素存在下、37℃、30分間インキュベートすることにより変性させ、これを20倍希釈することにより構造の回復を促した。（Native-PAGE）変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル電気泳動を行いサンプルの重合度合いを調べた。（CDスペクトル）加熱およびリフォールディング後の高次構造を調べるために、円二色性旋光分散計J-720（日本分光）により、遠紫外領域（190-250nm）でのCDスペクトルを測定した。

【結果】オボアルブミンを加熱したサンプルについて、Native-PAGEを行った結果、はしご状の泳動像が得られ、二量体、三量体と段階的に重合度が高くなった分子種が見出されることを確認した。尿素変性状態からリフォールディングさせたサンプルについても同様の泳動像が得られ、オボアルブミンの重合過程でフォールディング中間体を形成することが示唆された。CDスペクトルの形状は、両者とも未処理のものとわずかに異なっており、相対的にβストランド成分の増加を示唆する結果が得られた。また加熱サンプルでは、加熱時間に関わらずCD強度の減少が起こっており、急冷により変性状態が固定された分子種が混在する可能性が示唆された。

(1) H. Azakami, A. Mukai, and A. Kato, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1254-1257 (2005)

(2) N. Tanaka, Y. Morimoto, Y. Noguchi, T. Tada, T. Waku, S. Kunugi, T. Morii, Y.-F. Lee, T. Konno, and N. Takahashi, *J. Biol. Chem.*, **286**, 5884-5894 (2011)

Ovalbumin, polymerization, folding

講演番号：3A08a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ A校舎08会場

タイトル　高圧巻き戻しを利用した高品質タンパク質結晶の作製

Title　Improvement of a crystal quality using a protein that is refolded by high-pressure treatment

○宮園 健一、堤 香苗、石野 良純[1]、田之倉 優（東大院農生科・応生化、[1]九大院農院・生機科）

○Ken-ichi Miyazono, Kanae Tsutsumi, Yoshizumi Ishino[1], Masaru Tanokura (The university of Tokyo, [1]Kyushu university)

【目的】X線結晶構造解析はタンパク質の立体構造を決定するために極めて有用な手法であり、これまでに約7万弱の立体構造が同手法により決定され、Protein Data Bankに登録されている。X線結晶構造解析法によるタンパク質の構造決定は、対象とするタンパク質の立体構造を分子量の制限なく高精度に決定できるという利点があるものの、構造決定の成否はいかにして良質なタンパク質結晶を得るかに大きく依存している。そのため、良質なタンパク質結晶を作製するための技術開発は、構造生物学の分野において広く求められているものである。本発表では、inclusion bodyとして大量発現させた目的タンパク質を高圧処理し、可溶性として回収したタンパク質を用いることにより、高品質結晶の作出に成功した例を報告する。

【方法】超好熱古細菌*Pyrococcus horikoshii* OT3由来新規エキソヌクレアーゼPhoDNaseIを大腸菌の系を利用して発現させ、可溶性画分及びinclusion bodyを回収した。可溶性画分に発現したPhoDNaseIは、熱処理・陰イオン交換カラム・疎水カラムによる精製を行った。Inclusion bodyとして回収したPhoDNaseIは、NDSB-201で洗浄を行った後、0.5 Mのアルギニンを含む条件で200 MPa, 16 hの高圧処理を行うことにより可溶化した。可溶化したPhoDNaseIは陰イオン交換カラムによる精製のみ行った。これらのタンパク質を用い結晶化実験を行い、得られた結晶に関してX線回折データの取得を行った。

【結果】可溶性画分から回収したPhoDNaseIは、PEG MME 550を沈殿剤とする条件で結晶が得られ、X線回折データの収集を行ったところ、結晶の空間群は$P2_12_12_1$であり、最高分解能は2.15Åであった。一方、inclusion bodyから回収したPhoDNaseIを用いて結晶化実験を行ったところ、PEG6000を沈殿剤とする条件で結晶が得られ、空間群は$I32$で最高分解能は1.60Åと、結晶品質は大幅に改善されていた。この回折データを利用することによって、PhoDNaseIの立体構造を高精度に決定することができた。Inclusion bodyにはPhoDNaseIが高濃度に含まれており、そこからタンパク質を抽出することによって高純度のPhoDNaseIが調製できたことが、結晶品質の改善につながったものと考えられる。高圧処理による可溶化は、タンパク質の立体構造を完全には破壊しないため、高純度の活性型タンパク質をinclusion bodyから回収するのに適した手法であると言える。

high-pressure refolding, X-ray crystallography, nuclease

講演番号：3A08a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ A校舎08会場

強磁場利用によるタンパク質結晶の高品質化

Quality improvement of protein crystals in a high magnetic field

○中村 顕、大塚 淳、宮園 健一、山村 昭裕、窪田 恵子、広瀬 量一[1]、廣田 憲之[2]、安宅 光雄[3]、澤野 頼子、田之倉 優（東大院農生科・応生化、[1]JASTEC、[2]物材機構、[3]産総研）

○Akira Nakamura, Jun Ohtsuka, Ken-ichi Miyazono, Akihiro Yamamura, Keiko Kubota, Ryoichi Hirose[1], Noriyuki Hirota[2], Mitsuo Akata[3], Yoriko Sawano, Masaru Tanokura (Univ. of Tokyo, [1]JASTEC, [2]NIMS, [3]AIST)

【目的】精密立体構造解析においては、高分解能のX線回折像を与える高品質結晶を用いる必要があるが、良質な結晶を得ることは容易ではない。結晶品質向上の取り組みの中で、超伝導マグネットが作り出す強磁場やその磁場勾配から生じる磁気力を利用することが提案された。本研究は、様々なタンパク質試料を強磁場・磁気力場環境において結晶化し、その品質を重力場で得た結晶と比較することにより、強磁場・磁気力場結晶化の有効性を評価、実証することを目的とした。
【方法】19種類のタンパク質を精製し、これらの試料を適切な沈殿剤と混合して、シッティングドロップ蒸気拡散法により20℃で結晶化させた。超伝導マグネットとしては、JMA-15T40(JASTEC)を使用し、B=7.5～12.5 T、$B_z \mathrm{d}B_z/\mathrm{d}z \leqq -1200$ T^2/mとなる領域で結晶化実験を行った。この領域での水滴にかかる実効重力は-0.1～+0.1Gである。結晶化実験開始から約2週間後に磁場空間から試料を取り出し、磁場中で得られた結晶および対照実験として重力場で得られた結晶についてX線回折実験を行った。取得したデータを解析し、X線回折の最高分解能、結晶のモザイク性、結晶全体の温度因子に基づいて結晶品質を評価した。
【結果】磁場中で生成された結晶の外観上の特徴として、クラスター化の抑制、大型化の傾向があった。これらの特徴は宇宙空間における微小重力環境下での結晶化においても報告されており、本研究では勾配磁場に起因する上向きの磁気力がタンパク質溶液に作用して実効重力を低減させたことにより、自然対流が抑制された結果を反映していると考えられる。また、磁場中で生成された結晶では、磁場方向と平行に配向するものが複数確認された。これらの磁場配向した結晶は、配向していない結晶や対照実験で取得した結晶と比較して、X線回折分解能が向上するなど品質改善を示す結果が得られた。本研究においては、磁場配向が認められなかった試料を含む合計6種類のタンパク質について、強磁場・磁気力場中での結晶化による結晶品質の向上が確認された。これらの事例では、結晶核形成の抑制、不純物の取り込み抑制、結晶内分子配列の均質化などの効果が品質改善の主な要因として考えられるが、特に磁場配向した結晶に関しては、微結晶状態での規則正しい分子整列や結晶成長方向の変化が高品質化に寄与したと推測される。上記のように約30%の確率で結晶品質が向上し、強磁場・磁気力場結晶化の有効性が示唆された。一方、本研究において顕著な品質向上が確認されなかった試料に関して、強磁場・磁気力場中で得られた結晶が対照実験で得られた結晶と同等のX線回折能を有していたことから、タンパク質結晶化において強磁場・磁気力場が負の影響を及ぼす可能性は低いと言える。

Protein crystallization, High magnetic field, Crystal quality improvement

講演番号：3A08a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ A校舎08会場

タイトル　脂質立方相を用いた膜タンパク質結晶化における添加剤の影響

Title　Effects of additives on membra ne-protein crystallization with the lipidic cubic phase method

○城塚秀之，小杉正幸，日比真仁，竹田一旗，三木邦夫（京大院理）

○Hideyuki Jonotsuka, Masayuki Kosugi, Shinji Hibi, Kazuki Takeda, Kunio Miki (Kyoto Univ.)

【目的】膜タンパク質は全タンパク質の約３割を占めており、細胞膜におけるエネルギー生産や物質輸送などの重要な役割を果たしている。また膜タンパク質はしばしば医薬品のターゲットとなることから応用面においても重要である。しかし、構造解析された膜タンパク質の数は水溶性タンパク質と比べて非常に少なく、膜タンパク質の構造解析は未だ難しいのが現状である。膜タンパク質の構造解析における大きな障害の一つとして、結晶作成の困難さが挙げられる。このため、通常の水溶性タンパク質では用いられないような結晶化法がいくつか提案されてきた。それらのなかでも脂質立方相を用いる結晶化法が最もよく利用されている。脂質立方相とは水と脂質から成る中間相の一種であり、この中に膜タンパク質を組み込むことで生体膜に近い環境中での結晶化が可能になる。この結晶化法によって、結晶化できる膜タンパク質の種類が増加した。しかしながら、この方法で得られた結晶は膜が積層した格子構造をもっており、一般的に結晶性が悪く、サイズが小さいのが問題となっている。一方、水溶性タンパク質の結晶化においては、沈殿剤以外に化合物を添加することで結晶性の向上と大型化が実現された例が多数見られる。本研究では、脂質立方相を用いた膜タンパク質の結晶化法においても、添加剤によって結晶性の向上や結晶の大型化が可能になるかどうか検討した。

【方法】脂質立方相はモノオレイン酸と水溶液を、シリンジを組み合わせた特殊な実験器具を用いて均一になるように混合することで作成した。また、添加剤（脂質や界面活性剤、その他の化合物）は、1～20%になるように加えた。そして、X線小角散乱法によって形成された脂質相の種類を決定し、その性質を調べた。さらに添加剤を加えた脂質立方相を用いて、膜タンパク質（バクテリオロドプシン、光合成反応中心、光捕集アンテナ複合体）の結晶化を行った。

【結果】いくつかの添加剤で、脂質相の性質及び膜タンパク質結晶の形状に変化が見られた。特にテルペノイドの一種であるスクアレンを脂質立方相に加えると、通常より迅速に均一な脂質立方相が形成されることがわかった。また、この脂質立方相から成長するバクテリオロドプシンの結晶は通常のものより積層する膜が広がる方向に大型化していた。これらの結果は、添加剤を加えることによって、膜タンパク質結晶の結晶性や大きさを改善できる可能性を示している。

Membrane Protein, Crystal, Lipidic Cubic Phase

講演番号：3A08a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ A校舎08会場

バクテリオファージϕX174スパイクGタンパク質の5量体構造形成機構の解析

Analysis of the mechanism for pentamer formation of spike G protein of bacteriophage ϕX174

○伊藤 静香、南平 麻衣、稲垣 穣（三重大院・生資）
○Shizuka Ito, Mai Nampei, Minoru Inagaki (Department of Life Science, Faculty of Bioresources, Mie University)

【目的】小型の正20面体ファージであるϕX174は，12箇所の頂点にGタンパク質の5量体で形成されるスパイクを持っている。スパイクは，感染の際に宿主菌のリポ多糖（LPS）を認識し，ファージ遺伝子の通路となる。これまで我々は，C末端にヒスチジンタグを融合したGタンパク質（cHisG）が，スパイクと同様に溶液中で自発的に5量体を形成し，宿主菌のLPSと強く相互作用することを明らかにした。そこで本研究では，cHisGのアミノ酸変異体を調製し，変更したアミノ酸残基の5量体形成に及ぼす影響について比較解析を行った。

【方法・結果】ファージ粒子全体のX線構造をもとに，βシートをつなぐターンに位置し，LPSとも相互作用すると考えられるD84，隣接するタンパク質間で5量体形成に関与すると考えられる，Caイオンを共有するD117，およびsalt bridgeを形成するK124とD125について，それぞれセリン残基に置換した変異体（D84S，D117S，K124S，D125S，K124SD125S）を作製した。得られたタンパク質はSDS-PAGEにおいて，SDS緩衝液と混合しただけで加熱せずに泳動すると，D117SとK124SおよびcHisGは，5量体にあたる110 kDaのバンドが確認され，加熱して泳動すると単量体にあたる20 kDaのバンドのみが認められた。いっぽう，D84S，D125S，K124SD125Sは，加熱するしないに関わらず単量体のバンドのみが検出されたことから，それぞれの変異体は5量体形成能力に違いがあることがわかった（Fig. 1）。つぎに，CDスペクトル測定をしたところ，5量体を形成するグループは217 nmに負の吸収極大を持つβシート構造に特徴的なスペクトルが得られたのに対し，5量体を形成しないD125SとK124SD125Sはβシートが大幅に少ないことが示唆され，D84Sはどちらとも少し異なるスペクトルが得られた（Fig. 2）。また，5量体構造を形成するグループの中で，その安定性の違いを可視化することを目的として，D117S，K124S，cHisGについて，SDS共存下で30～90℃で処理した後にSDS-PAGEに供した。その結果，50～60℃を境目に5量体構造が解離していることがわかり，なかでもK124Sが最も低い温度で解離することがわかった。

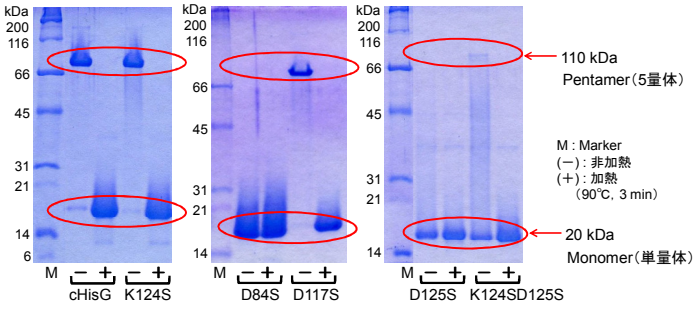


Fig. 1　cHisG と各変異体の SDS-PAGE における非加熱(−)および加熱(+)処理による 5 量体の検出

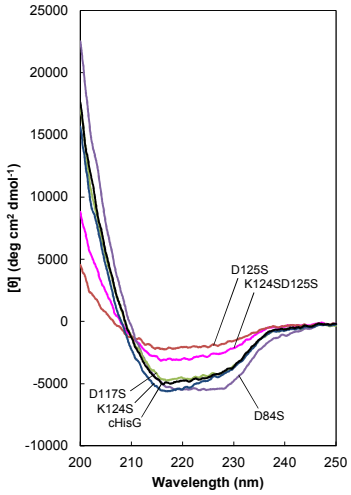


Fig. 2　cHisG と各変異体の CD スペクトル
タンパク質濃度 5 μM, 10 mM PBS, 25℃

Bacteriophage ϕX174, spike protein, oligomerization

講演番号：3A08a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ A校舎08会場

タイトル：新規イソ型 dioscorin のクローニングと構造・機能解析

Title: Cloning of genes and enzymatic characterizations of novel dioscorin isoforms from *Dioscorea japonica*

○薛　友林、宮川　拓也、中村　顕、澤野　頼子、田之倉　優（東大院・農生科）

○You-Lin Xue, Takuya Miyakawa, Aakira Nakamura、Yoriko Sawano, Masaru Tanokura
(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo)

Dioscorea spp.の塊根であるヤムは多くの熱帯地域の国々において主要な食品である。ヤムの機能的な特徴と医薬品としての可能性が注目されており、中国では伝統的な健康食品や漢方薬として使用されている。600種類以上のヤムが世界中で栽培されているが、ヤムの有益な機能のいくつかには貯蔵タンパク質であるdioscorinが寄与している。dioscorinはヤムの主要な貯蔵タンパク質で、可溶性タンパク質の80-85%を占める。このタンパク質は炭酸脱水素酵素、トリプシン阻害剤、デヒドロアスコルビン酸(DHA)還元酵素、モノデヒドロアスコルビン酸(MDA)還元酵素という様々な活性をもつことが報告されているが、dioscorinの特徴を解明する試みとしては、アミノ酸配列の決定といくつかの機能解析がなされているに過ぎない。タンパク質の活性はその立体構造によって特徴付けられるので、dioscorinのもつ様々な活性のメカニズムを理解するためには立体構造情報の取得が不可欠である。

本研究では、ヤム塊根（*Dioscorea japonica*）から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。DNA 配列解析の結果、配列が類似した 4 種類の dioscorin を取得した。これらの dioscorin について大腸菌を用いて発現・精製し、ヤムから抽出・精製した天然型 dioscorin と比較した。その結果、組換え型 dioscorin は天然型と同様に炭酸脱水素酵素、トリプシン阻害剤活性を持っていたが、DHA 還元酵素と MDA 還元酵素活性は著しく低下していた。また、糖鎖切断反応（*N*-/*O*-結合型）と糖鎖染色の結果、天然型は *N*-及び *O*-結合型糖鎖を持ち、糖鎖切断反応より DHA 還元酵素と MDA 還元酵素活性が組換え型と同レベルまで低下した。以上より、dioscorin の DHA 還元酵素活性と MDA 還元酵素活性には糖鎖が寄与していることが明らかになった。さらに、X 線結晶構造解析により dioscorin の立体構造を決定し、dioscorin の活性を調節する構造基盤を解析した。その結果、dioscorin の活性部位は 2 つの His 残基と 1 つの Gln 残基で形成され、3 つの His 残基で活性部位が形成される他の炭酸脱水素酵素と異なっていた。dioscorin は Q114H 変異によっても炭酸脱水素酵素活性を示したが、その活性は Zn^{2+}依存的に変化した。また、dioscorin の構造は多くのトリプシン阻害タンパク質に見られる knottin 構造（β シートとジスルフィド結合）に類似であり、この構造基盤により阻害活性が発揮されているものと考えられる。

Dioscorin, Enzymactic activity, Structure

講演番号：3A08a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ A校舎08会場

高等植物型フェリチンのN-末端領域はフェリチン多量体の会合に関与する

The N-terminal region of phytoferritin is related to the association of multimer of phytoferritin.

○増田 太郎、森本　晋一郎[1]、三上　文三[2]、豊原　治彦[1]（京大院農・農、[1]京大院農・応用生物、[2]京大院農・応用生命）

○Taro Masuda, Shin-ichiro Morimoto, Bunzo Mikami, Haruhiko Toyohara (Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】フェリチンはほぼ全ての生物種において、鉄代謝に主要な役割を演じる鉄貯蔵蛋白質である。演者らは植物由来のフェリチンとして初となるダイズフェリチンの立体構造解析に成功し、その構造活性相関を解明した。本研究では、植物型フェリチンの特徴であるN-末端ヘリックス領域の構造と機能に着目し、植物型フェリチンの高次構造に関する共通点と差異を明らかにするため、高等植物とは進化的に大きな隔たりを持つ緑藻類（アナアオサ *Ulva pertusa*）よりフェリチン遺伝子を単離し、その立体構造解析を行った。

【方法】緑藻（アナアオサ）より総RNAを抽出し、縮重PCRと5’/3’-RACEによりアナアオサフェリチン（UpFer）cDNA全長配列を得た。UpFer成熟領域全長及びN-末端ヘリックス領域欠失変異体を大腸菌発現系により調製し、結晶化および機能解析に用いた。

【結果】UpFerのcDNAは1423 bpからなり、240個のアミノ酸をコードしていた。既知植物フェリチンと比較的高い相同性を示し、特に近縁種であるリボンアオサや、アオサと同じ緑藻綱に属するクラミドモナスのフェリチンと高い相同性を示した。UpFerのアミノ酸配列中には、鉄の酸化的取り込みに必須とされる二価鉄酸化部位（Ferroxidase site）の構成アミノ酸が全て含まれており、また、N-末端に存在する植物フェリチン特有のExtension Peptide (EP)と呼ばれる配列が存在していた。UpFerのX線結晶構造解析について、到達分解能は2.4 Åに留まったが、高い対称性を有する立方晶（空間群 *I*432）に属していたことから、植物フェリチンに特有のEP領域の立体構造に関する詳細な情報を得ることができた。EP領域は短いヘリックスを形成しており、24量体外側において隣接サブユニットの疎水性ポケットと相互作用していた。DSCによる熱安定性測定の結果、このEP領域は24量体の安定性に寄与していた。また、EPを欠失する変異体では、多量体表面の疎水性ポケットが分子表面に露出し、分子表面の疎水性が劇的に向上することが明らかとなった。これまでの研究により、EP領域は生体内の鉄要求に応じて分解を受け、この分解に伴い、フェリチン内部に蓄えられた鉄の放出につながることが示唆されている。本研究の結果より、EP部分の分解から鉄の放出に至る機構を分子レベルで解明することができた。即ち、EP領域の分解により、１．多量体全体の不安定化から、鉄の放出が誘起されること、２．疎水性表面の露出によるフェリチン多量体の凝集が起こる可能性が示された。

Ferritin, algae

講演番号:3A08a10
講演日時、会場:3月24日10:49～ A校舎08会場

水酸化アミノ酸生産に有用な*Burkholderia ambifaria* AMMD 由来新規Fe(II)/α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼの構造解析

Crystal structure of a novel non-haem iron/α-ketoglutarate dependent dioxygenase from *Burkholderia ambifaria* AMMD in producing hydroxylated amino acid

○秦慧民[1]、宮川拓也[1]、河嶋隆志[2]、日比 慎[2]、小川 順[2]、田之倉 優[1]（[1]東大院・農生科、[2]京大院・農）

○Huimin Qin[1], Takuya Miyakawa[1], Takashi Kawashima[2], Makoto Hibi[2], Jun Ogawa[2], Masaru Tanokura[1] ([1] Grad. Sch. Agric. Life Sci., The Univ. of Tokyo; [2] Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

水酸化アミノ酸には有用な生理活性を持つものが多数知られている。例えば、4-ヒドロキシイソロイシン（HIL）はマウスを使った経口投与実験でインスリン分泌促進作用があり、抗肥満薬、糖尿病治療薬として期待されている。微生物酵素を用いた化合物合成はその立体選択性の高さから有用であり、水酸化アミノ酸を合成する酵素として、*Burkholderia ambifaria* AMMD由来ジオキシゲナーゼSadAが見出されている。SadAはα-ケトグルタル酸（α-KG）と非ヘム鉄Fe(II)に依存してN修飾アミノ酸の水酸化反応を触媒する。しかし、基質の特異性はあまり広くなく、産業上の用途が限られている。このため、SadAの立体構造に基づいて、基質結合様式と触媒反応機構を明らかにし、SadAの基質選択性を拡大することを目指している。

本研究では、構造情報を取得するために、X線結晶構造解析を行い、セレノメチオニン置換体を用いたSAD法によりSadAの立体構造を2.0 Åで決定した。SadAはdouble stranded β-helix (DSBH) フォールドを持ち、major sheetとminor sheetからなるβ構造を6つのαヘリックスが取り囲むような構造を形成していた。活性部位にH-X-D/E-X_n-Hモチーフをもち、His155, Asp157, His246が鉄イオンの代わりに亜鉛イオンを結合していた。さらにα-KGの1-カルボキシル基及び2-オキソ基が亜鉛イオンに二座配位で結合しており、5-カルボキシル基はArg255、Tyr143、Arg141の側鎖と結合していた。SadAは溶液中と結晶中で二量体として存在する。構造解析の結果、2分子間でCys101を介したジスルフィドが形成されていた。今回、得られた構造から基質結合モデルを提案し、触媒反応機構と基質選択性について議論する。

dioxygenase, *Burkholderia ambifaria* AMMD, crystallization

講演番号：3A08a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ A校舎08会場

水酸化アミノ酸の立体選択的合成に有用なアルドラーゼ（asHPAL）のX線構造解析

Crystal structures of the aldolase asHPAL useful for stereoselective hydroxyl amino acid synthesis

○郭 琳珺、岡井 公彦、間瀬 朋子、Imai Fabiana Lica、宮川 拓也、日比 慎[1]、小川 順[1]、田之倉 優（東大院農生科・応生化、[1]京大院農・応用生命）

○Linjun Guo, Masahiko Okai, Tomoko Mase, Fabiana Lica Imai, Takuya Miyakawa, Makoto Hibi[1], Jun Ogawa[1], Masaru Tanokura (The Univ. of Tokyo, [1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】光学活性体（キラル化合物）は医薬品の原料として需要が増大している。これらの医薬品のうち半数以上は特定のエナンチオマーのみが有効な活性を示す。微生物由来酵素を用いた合成法は、有機合成と比較して立体選択性が高く廃棄物が少ないため、効率的かつ環境に優しい生産手段である。水酸化アミノ酸の一種である4-hydroxyisoleucine（4-HIL）はインスリンの分泌を促進する化合物で、高血糖時のみ分泌促進作用があることから糖尿病治療薬として期待されている。フェメグリーク種子からの抽出が可能であるが、収量はわずかである。4-HILは不斉炭素原子が3つあり、天然型4-HILは(2*S*, 3*R*, 4*S*)であることから、酵素を用いた立体選択的合成法の確立が期待されている。本研究で扱う酵素*Arthrobacter simplex* strain AKU 626由来のアルドラーゼ（asHPAL）は、L-アミノ酸アミノ基転移酵素とのカップリング反応において天然型4-HILを優先的に合成することができる。本研究ではasHPALの構造解析を行い、詳細な反応機構を明らかにすることを目的としている。

【方法】大腸菌Rosetta(DE3)を宿主とした発現系を構築した。可溶性発現したasHPALは陰イオン交換樹脂を用いて精製した。精製したタンパク質を用いて結晶化スクリーニングにより、高品質な結晶を取得した。得られた結晶は大型放射光施設 Photon FactoryのBL-5A で、最高分解能1.60 Åのデータセットを取得し、分子置換法によりasHPALの立体構造を決定した。

【結果】asHPALは結晶中で6量体として存在しており、各プロトマーは10本のαヘリックスと8本のβストランドから成り、活性部位には１つのMgイオンが結合していた。反応には二種類の基質が必要で、これまでに第一基質との共結晶化を行い、1.59 Å の分解能で複合体構造を決定している。さらに、第一基質であるピルビン酸と2-オキソ酪酸との複合体構造解析にも成功した。この複合体構造を基に第二基質との相互作用エネルギー解析を行い、立体選択性を決定するアミノ酸について知見を得ることができた。

alodolase, 4-hydroxyisoleucine, structure

講演番号：3A08a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ A校舎08会場

多糖アルギン酸の取り込みに関わる細菌由来ABCトランスポーターのX線結晶構造解析

X-ray crystallographic analysis of bacterial ABC transporter involved in import of alginate polysaccharide

○丸山 如江、伊藤 貴文、西谷 悠、三上 文三、橋本 渉、村田 幸作（京大院・農）
○Yukie Maruyama, Takafumi Itoh, Yu Nishitani, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, Kousaku Murata (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】多くの細菌は、分泌した分解酵素によって菌体外の高分子物質を低分子化し、その分解物を細胞内に取り込む。しかし、グラム陰性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株（A1 株）は、特徴的な高分子物質取り込み・分解系「超チャネル」を用いて多糖アルギン酸（平均分子量：26,000）を細胞内に直接取り込み、資化する。「超チャネル」は細胞表層の孔「体腔」、ペリプラズムの結合タンパク質（AlgQ2）、内膜の ABC トランスポーター（膜貫通タンパク質 AlgM1-AlgM2 ヘテロ 2 量体と細胞質 ATP 加水分解酵素 AlgS-AlgS ホモ 2 量体から成る 4 量体）、および細胞質のアルギン酸リアーゼで構成される。これまでにマルトースやビタミン B_{12} といった低分子物質の取り込みに関わる細菌由来 ABC トランスポーターの構造と機能が研究されているが、高分子物質の取り込みに関わる分子機構の解明は遅れている。本研究では、細菌の高分子物質取り込み機構を明らかにすることを目的として、A1 株由来アルギン酸輸送 ABC トランスポーターの X 線結晶構造解析を行った。
【方法と結果】アルギン酸輸送 ABC トランスポーターを、大腸菌発現系を用いて発現、精製した。精製トランスポーターを AlgQ2 とアルギン酸オリゴ糖の存在下で結晶化したところ、ポリエチレングリコールを主要な沈殿剤とした条件下において結晶が得られた。結晶化の際に添加する界面活性剤やイオン種を検討することにより結晶化条件の最適化を行い、分解能 3.3Å の X 線回折データを収集した。本結晶は空間群 $P2_12_12_1$ に属し、非対称単位あたり 1 つの複合体（AlgQ2/AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS）を含んでいた。AlgQ2 および大腸菌由来マルトーストランスポーターの各サブユニットの構造を用いた分子置換により初期モデルを構築し、現在構造精密化を進めている。本結晶構造において、AlgM1-AlgM2 は、AlgS-AlgS との接触面側（細胞質側）が開いた Inward-facing 構造をとっており、AlgM1-AlgM2 の閉じたペリプラズム領域にはアルギン酸オリゴ糖を補足した AlgQ2 が結合していた。AlgQ2 との相互作用は AlgM2 サブユニットにおいて多く見られる一方で、AlgQ2 と AlgM1 との界面にはアルギン酸結合部位へと続くトンネルが形成されており、ここに長鎖のアルギン酸が結合すると推察された。
【考察】AlgQ2 と AlgM1 との界面に見出された特徴的なトンネル構造により、A１株 ABC トランスポーターは、オリゴ糖のみならず、高分子アルギン酸を補足した AlgQ2 と相互作用できることが示唆された。
尚、本研究は文部科学省ターゲットタンパクプログラムの一環として行われた。

Sphingomonas, alginate, ABC transporter

講演番号:3A08a13
講演日時、会場:3月24日11:32～ A校舎08会場

好熱性アーキア由来タイプ２イソペンテニル二リン酸イソメラーゼの四次構造に対する基質結合の影響

Effect of substrate binding on the quaternary structure of type 2 isopentenyl diphosphate isomerase from a thermophilic archaeon

○中谷　仁美、郷田　秀一郎[1]、海野　英昭[1]、長井　拓也、吉村　徹、邊見　久（名大院生命農・応用分子生命科、長崎大院・工）

○Hitomi Nakatani, Shuichiro Goda[1], Hideaki Unno[1], Takuya Nagai, Tohru Yoshimura, Hisashi Hemmi (Grad. Sch. of Bioagr. Sci., Nagoya Univ., Grad. Sch. of Engineer., Nagasaki Univ.[1])

【目的】タイプ２イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ（IDI）はアーキアや一部のバクテリアにおいて、イソプレノイド生合成の初期段階反応であるイソペンテニル二リン酸とジメチルアリル二リン酸の間の異性化を触媒する酵素である。我々が研究対象としてきた好熱性アーキア *Sulfolobus shibatae* 由来タイプ２IDIはモノマーの分子質量が約40 kDaであり、ゲルろ過クロマトグラフィーや結晶構造解析の結果からホモ４量体を形成すると考えられてきたが、最近同酵素のX線結晶構造解析により、一部条件下における８量体の形成が示された。この８量体形成には基質の結合に重要な残基が寄与していた。そこで、本研究では基質の結合が同酵素の四次構造に与える影響を解明することを目的とした。

【方法・結果】 まず、同酵素の四次構造と機能の相関について情報を得るために、変異体E13R/R235Eを作製した。この変異体は８量体形成に重要なアミノ酸残基であるGlu13、Arg235を入れ替えたものである。速度論解析の結果、V_{max}は野生型酵素と変異体でほぼ同様の値を示したが、変異体のK_mは野生型酵素に比べて６分の１以下に低下した。次に、X線小角散乱測定により野生型酵素およびE13R/R235E変異体の四次構造の解析を試みた。野生型酵素は、基質の非存在下では８量体、基質と二価金属の存在下では４量体に近い構造をとり、一方、変異体は常に４量体で固定されていることが推定された。また、野生型酵素のゲルろ過クロマトグラフィーの結果、高濃度では８量体と推定されるピークが検出され、低濃度では８量体、４量体とそれぞれ推定される２つのピークが検出された。一方、変異体では高濃度においても４量体と推定されるピークが検出された。さらに、野生型酵素を用いた動的光散乱測定の結果、基質の添加に伴って同酵素の解離に起因すると思われる粒径低下が観察された。以上の結果から、基質の結合が同酵素における４量体と８量体の間の平衡に影響を及ぼしていることが示された。

isoprenoid, type 2 isopentenyl diphosphate isomerase , small-angle X-ray scattering

講演番号：3A08a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ A校舎08会場

*Shewanella*属細菌由来の相同Cytochrome c_5の安定性

Study on the stability of homologous cytochrome c_5 from *Shewanella*

○政成 美沙、若井 暁、加藤 千明[1]、為我井 秀行[2]、栗原 達夫[3]、三本木 至宏（広島大院・生物圏、[1]JAMSTEC、[2]日大・文理、[3]京大・化研）

○Misa Masanari, Satoshi Wakai, Chiaki Kato[1], Hideyuki Tamegai[2], Tatsuo Kurihara[3], Yoshihiro Sambongi (Hiroshima Univ., [1]JAMSTEC, [2]Nihon Univ., [3]Kyoto Univ.)

【目的】蛋白質への圧力効果はこれまでにも研究されており、高圧力が蛋白質の変性要因になることが示されてきた。また、最近では食品産業において蛋白質の酵素活性を高圧下で用いることが多くなってきた。こうした高圧下のプロセスでは、加圧と同時に加熱する場合が多い。そのため、圧力耐性と熱安定性を併せ持つ蛋白質の有用性は高いと言える。
深海は、極限環境のひとつであり、高圧を特徴とする。そのため、深海微生物の蛋白質は圧力耐性を示すと考えられる。本研究の目的は、深海由来*Shewanella*属細菌が生産するCytochrome c_5 (Cyt c_5)について、その安定性のメカニズムを明らかにすることである。

【方法・結果】*Shewanella*属細菌は海洋に生息する細菌であり、浅瀬から深海まで広く分布している。本研究では、深海由来の*Shewanella violacea*、浅瀬由来の*Shewanella livingstonensis*および*Shewanella amazonensis*が生産するCyt c_5 (それぞれSV、SL、SA)を用いて、比較実験を行った。これらのCyt c_5はアミノ酸配列が72.4%一致し、高い相同性を示す。そのため、性質の違いに寄与するアミノ酸を特定しやすく、比較に適したサンプルである。
熱安定性を比較するために、示差走査熱量測定(DSC)や円偏光二色性スペクトル(CD)を用いて熱安定性を測定した。その結果、SVは、SAやSLよりも高い熱安定性を示した。

【考察】*Shewanella*属細菌は、16S rRNA遺伝子配列から、Group1とGroup2という2つのグループに分けられる。*S. violacea*が属するGroup1は、圧力耐性の生育を示す。これに対して、*S. amazonensis*および*S. livingstonensis*が属するGroup2は、圧力感受性の生育を示す傾向がある。このことから、Group1が生産する蛋白質は圧力耐性を示す可能性があると考えられる。今回明らかになったSVの高い熱安定性も、圧力耐性の結果であると考えている。SAおよびSLのCyt c_5は50番目のアミノ酸がLeuであるのに対し、SVはLysである。このLysがヘムと水素結合を形成することによって、SVがSAやSLよりも高い熱安定性を示している可能性がある。
今後は、SVと同じく50番目のアミノ酸がLysである深海由来の*Shewanella benthica*のCyt c_5も比較に加え、50番目のアミノ酸の影響について検討する。また、4種のCyt c_5について、変性剤による変性を常温高圧下で測定し、圧力に対する安定性についても比較する予定である。

Cytochrome c_5, pressure tolerance, heat stability

講演番号：3A08p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ A校舎08会場

タイトル プリオンタンパク質は弱い相互作用でニューレグリンと結合する。
Title Prion protein weakly interacts with neuregulin.
○有井康博、山口秀徳[1]、桑原寿江[1]、福岡伸一[1]（武庫女大・生活環境、[1]青学大院・理工）
○Yasuhiro Arii, Hidenori Yamaguchi[1], Satoshi Oshiro[1], Keita Wada[1], Toshie Kuwahara[1], Shin-Ichi Fukuoka[1] (MWU, [1]AGU)

【目的】ウシ海綿状脳症（BSE）を初めとするプリオン病の発症には、プリオン蛋白質（PrP）が関与する。しかしながら、プリオン病の発症機構の詳細は不明なままである。有井らはプリオン病発症機構の詳細を明らかにするために、PrPの生理機能を明示することが不可欠だと考えた。プリオン病が運動失調を伴う疾患であることから、PrPは運動神経系において生理的役割を担っていると推察される。有井らは神経栄養因子の一つである、Type Ⅰニューレグリン（NRG Ⅰ-β1）に注目した。これまでにPrPとNRG Ⅰ-β1は共精製されるという報告があるが、両タンパク質の相互作用は確認されていない。一方で、有井らは両タンパク質を大腸菌体内で共発現すると、組換え型PrPが可溶性画分に生産されることを報告している[1)]。本研究では両タンパク質の相互作用を明確にすることを目的とした。
【方法】以前の報告で、両タンパク質の相互作用が免疫沈降法により調べられたが、相互作用が検出されなかったという報告がある。免疫沈降法は強い相互作用を検出するためには有用であるが、弱い相互作用の検出には不向きである。そこで、弱い相互作用の検出に適している蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法により、両タンパク質の相互作用の検出を試みた。まず初めに、PrPのＣ末端ドメインと青色蛍光タンパク質(EBFP)を繋げた融合タンパク質（ΔN-PrP-EBFP）およびNRG Ⅰ-β1と緑色蛍光タンパク質(EGFP)を繋げた融合タンパク質（NRG-EGFP）を遺伝子工学的に作製した。次にEBFPをドナー、EGFPをアクセプターとしてFRET法により、両タンパク質の相互作用の有無および性質を調べた。
【結果】ΔN-PrP-EBFPとNRG-EGFPの組合せではFRETが劇的に観察されたが、その他の組合せでは観察されなかった。この結果はPrPとNRG Ⅰ-β1が相互作用することを強く示唆している。次に、アクセプター濃度を変化させて、FRET効率(*E*)の濃度依存的変化を調べたところ、ΔN-PrP-EBFPとNRG-EGFPの組合せでは、*E*の濃度依存的増加が確認された。そのプロットから解離定数K_dが44.5 nMと算出され、モル比は約1：1であった。また、そのFRETが250 mM NaClの存在下で消失することも分かった。これらの結果は両タンパク質間の相互作用が比較的弱いことを示している。さらに、Försterの式を用いて蛍光タンパク質間の距離を計算した結果、36.1 Åであることが分かった。この距離は両タンパク質が相互作用時に起こりうる距離であることを示している。以上の結果から、PrPとNRG Ⅰ-β1は弱い相互作用により結合することが分かった。
本研究は科研費（17710188）の助成を受けたものである。
１）Arii et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. (2011) 75, 1181-1183.

FRET, neuregulin, prion protein

講演番号：3A08p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ A校舎08会場

アピオス塊茎由来レクチンの分離精製と性質

Purification and characterization of lectins from *Apios americana* tubers.

○入江 聡、上妻 由章、米倉 政実（茨城大農・資生科）
○Satoshi Irie, Yoshiaki Kouzuma, Masami Yonekura (Ibaraki Univ)

【目的】マメ科植物アピオス（ *Apios americana* Medikus ）塊茎には、N 末端アミノ酸配列の異なる 2 種のレクチン AAL-1, 2（ *A . americana* lectin-1, 2 ）の存在が示唆されている。現在までに、アピオス塊茎から種々のカラムクロマトグラフィーを行うことで AAL-1 を分離精製し、cDNA クローニングによってその 1 次構造を決定した。一方で、AAL-2 に関しては、分離精製が行われておらず、その 1 次構造やレクチンとしての活性については明かにされていない。そこで本研究では、AAL-1 の各種赤血球に対する凝集活性や糖特異性などの性質を明らかにする。また、AAL-2 を分離精製してその性質を調べるとともに、cDNA クローニングによりその 1 次構造を明かにすることを目的としている。

【方法】アピオス塊茎より抽出した粗アピオス塊茎タンパク質溶液を、Butyl-Cellulofine カラム、Ovomucoid-Cellulofine カラム、次に DEAE-Cellulofine カラムに供することで AAL-1 と 2 を分離精製した。赤血球凝集活性は、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ニワトリ、ガチョウおよびモルモット赤血球を用いて測定した。レクチンの糖特異性については、単糖、ニ糖や糖タンパク質の添加による赤血球凝集反応の阻害試験によって調べた。また、AAL-2 をリジルエンドペプチダーゼで分解することで得られたペプチドの部分アミノ酸配列を決定し、その配列より縮重プライマーを設計して PCR を行った。明らかとなった塩基配列を基にプライマーを設計して 3’および 5’ RACE 法により cDNA クローニングを行った。

【結果】粗アピオス塊茎タンパク質溶液を Butyl-Cellulofine カラムに供することで得られた AAL-1 と 2 を含む画分を Ovomucoid-Cellulofine カラムに供したところ、AAL-1 はカラムに吸着したので 20mM HCl で溶出することにより精製した。一方、非吸着画分には AAL-2 が存在していたので、この非吸着画分を DEAE-Cellulofine カラムに供し、緩衝液中の NaCl 濃度を 0 M から 0.1 M に直線的に上げることで、AAL-2 を精製した。得られた AAL-1 と 2 の赤血球凝集活性を調べた結果、AAL-1 ではウシ赤血球以外の動物赤血球に対して凝集活性を示したが、AAL-2 では今回用いた各種動物赤血球に対する凝集活性は認められなかった。また、AAL-1 の赤血球凝集活性は単糖や二糖の添加によっては阻害されないものの、オボムコイドやアシアロフェツインといった糖タンパク質の添加によって強く阻害されることから、AAL-1 がこれらの糖タンパク質中の糖鎖と相互作用することが示唆された。次に AAL-2 の 1 次構造を決定するために、リジルエンドペプチダーゼで分解した AAL-2 を YMC-Pack Pro C18 カラムで分離し、新たに 9 つのペプチドのアミノ酸配列を決定した。これらの部分アミノ酸配列と N 末端アミノ酸配列を基にして計 6 本の縮重プライマーを設計した。これらのプライマーを用いて縮重 PCR を行ったところ、目的遺伝子断片の増幅を確認した。

lectin, *Apios americana*, cDNA cloning

講演番号：3A08p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ A校舎08会場

ブナシメジ由来レクチンの精製と諸性質

Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Hypsizigus marmoreus*

○阿部　智也、梅原　香奈子、鈴木　智大[1]、小林　夕香[2]、道羅　英夫[3]、平井　浩文、河岸　洋和[4]（静大農・応生化、[1]静大・イノベーション、[2]J-オイルミルズ、[3]静大・遺伝子、[4]静大院・創造）

○Tomoya Abe, Kanako Umehara, Tomohiro Suzuki[1], Yuka Kobayashi[2], Hideo Dohra[3], Hirofumi Hirai, Hirokazu Kawagishi[4] (Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [1]Innovation and Joint Research Center, Shizuoka University, [2]*J*-Oil mills INC., [3]Genetic Research and Biotechnology, Shizuoka University, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

ブナシメジ（*Hypsizigus marmoreus*）はキシメジ科シロタモギタケ属のキノコであり、シイタケ、エノキタケとともに日本で最もポピュラーな食用キノコの一つである。近年、制癌効果などの効腫瘍作用をはじめ、老化防止などの抗酸化作用や抗アレルギー作用などのさまざまな健康維持機能を有することなどが報告されており、我々も抗真菌活性を示すタンパク質の単離・精製に成功している[1)]。

様々なキノコをスクリーニングした結果、ブナシメジの抽出液にレクチン活性があることを明らかにした。そこで本研究では、ブナシメジ由来レクチンの精製及びその諸性質を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

ブナシメジ子実体を50 mM酢酸緩衝液(pH 5.0)、4℃にて抽出し、得られた抽出液をCM陽イオン交換クロマトグラフィー、BSMアフィニティークロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィーに供し、ブナシメジレクチン(HML)を得た。HMLは還元、非還元時ともに、SDS-PAGEにおいて10 kDa付近に単一バンドを示した。また、MALDI-TOF-MSを測定した結果、*m/z* 9576にモノマーのピークが観測された。

続いてHMLの一次構造を明らかにするためHMLをトリプシンにて酵素消化したのち、逆相カラムクロマトグラフィーに供した。得られたペプチド断片をプロテインシーケンサーに供した。その結果、HMLの部分アミノ酸配列情報の取得に成功した。現在HMLの諸性質を詳細に解析中である。

1)　Suzuki, T., et al., *Int. J. Med. Mushr.*, 13, 27-31 (2011)

Lectin ,Mushroom, *Hypsizigus marmoreus*

講演番号：3A08p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ A校舎08会場

コムラサキシメジ由来レクチン遺伝子のクローニング

cDNA cloning of a lectin from the *Lepista sordida*

○松葉　悠、岡山　紗也、鈴木　智大[1]、小林　夕香[2]、道羅　英夫[3]、村田　健臣、平井　浩文、河岸　洋和[4]（静大農・応生化、[1]静大・イノベーション、[2]J-オイルミルズ、[3]静大・遺伝子、[4]静大院・創造）

○Haruka Matsuba, Saya Okayama, Tomohiro Suzuki[1], Yuka Kobayashi[2], Hideo Dohra[3], Takeomi Murata, Hirofumi Hirai, Hirokazu Kawagishi[4]

(Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [1]Innovation and Joint Reseach Center, Shizuoka University, [2]*J*-Oil mills INC., [3]Genetic Research and Biotechnology, Shizuoka University, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】コムラサキシメジ（*Lepista sordida*）は、キシメジ科ムラサキシメジ属のキノコである。コムラサキシメジ粗抽出液を用いて赤血球凝集反応阻害試験を行った結果、高濃度のフコース、いくつかの糖タンパクに対して特異性が示された。また、フロンタルアフィニティークロマトグラフィーによる特異性解析の結果からLSLはα-1,6フコース糖鎖に強く結合することが明らかになった。我々は以前、コムラサキシメジからレクチン（LSL）を単離・精製し、その *N*-末端アミノ酸配列の取得に成功し、多数のアイソマーが存在することを確認した[1)]。また、温度安定性試験の結果から LSL は非常に熱安定性が高いことが明らかになった。そこで本研究では、LSL の一次構造解析及び発現系の構築に向けた LSL 遺伝子のクローニングを試みた。

【方法・結果】コムラサキシメジ子実体をリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）で抽出し、得られた抽出液を硫酸アンモニウム分画に供し、80%硫酸アンモニウム沈殿画分を疎水クロマトグラフィーに供した。その後、強陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、レクチン活性の見られた溶出画分を粗 LSL とした。更に複数存在するアイソフォームを分離するため、粗 LSL を Asp-N で酵素消化した後に逆相カラムクロマトグラフィーに供し、得られたペプチド断片をプロテインシーケンサーに供した。その結果、部分アミノ酸配列情報の取得に成功した。得られたアミノ酸配列情報より縮重プライマーを設計し縮重 PCR、RACE 法を行い、成熟 LSL をコードする全ての cDNA 塩基配列情報を取得した。この得られた塩基配列情報より 5'末端側のセンスプライマー、3'末端側のアンチセンスプライマーを設計し、成熟 LSL をコードする cDNA を取得した。LSL をコードする cDNA の全長は 561 bp であり、その GC 含量は 54%であった。本塩基配列より推定されるアミノ酸配列は 187 アミノ酸残基で、配列内に相同性の高い部分が 3 ヶ所存在することが明らかになった。現在、LSL の異種発現を試みている。

1）岡山ら、日本農芸化学会2010年度大会講演要旨集、p.156

Lectin, *Lepista sordida* , Mushroom

講演番号：3A08p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ A校舎08会場

レクチン-致死活性物質複合体によるプロテアーゼ活性発現機構の解明

Elucidation of manifestation mechanism of protease activity of a lectin and lethal toxin complex.

○藤田　基寛、鈴木　智大[1]、道羅　英夫[2]、平井　浩文[3]、河岸　洋和 (静大院・創造、[1]静大・イノベーション、[2]静大・遺伝子、[3]静大農・応生化)

○Motohiro Fujita, [1]Tomohiro Suzuki, [2]Hideo Dohra, [3]Hirofumi Hirai, Hirokazu Kawagishi (Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [1]Innovation and Joint Reseach Center, Shizuoka University, [2]Genetic Reseach and Biotechnology, Shizuoka University, [3]Department of Applied Biological Chemistry, Facalty of Agriculture, Shizuoka University)

【目的】我々は現在までに、スギヒラタケからレクチン (PPL) の単離・精製に成功し、その一次アミノ酸配列及びcDNA塩基配列情報の取得に成功し[1)]、PPLとスギヒラタケ致死性高分子 (B3) を混合するとプロテアーゼ様活性を示し、血液脳関門を破壊することを報告している[2)]。しかし、B3の一次構造はその難溶性から未だ不明であり、プロテアーゼ活性の詳細な検討が困難である。

またPPLのMALDI-TOF MS解析の結果から、PPL (m/z 14,000) と異なるm/z 13,000にピークが観察される時には、B3と混合しなくてもプロテアーゼ活性を有することが確認された。そこでこのm/z 13,000の物質 (PP-13000) がB3であること、もしくはB3と同様にPPLと複合体を形成しプロテアーゼ活性を有する物質であることが示唆された。そこで本研究ではPPLとB3のプロテアーゼ活性発現機構解明のため、B3の一次構造の解明を目的にPPLと相互作用するタンパク質 (PP-13000) の単離・精製を目的とした。

【方法・結果】PP-13000の単離のため、まずスギヒラタケ水層高分子画分を酸処理Sepharose 4Bアフィニティークロマトグラフィーに供し、粗精製PPLを得た。次いで粗精製PPLを0.01%SDSを含むPBSに溶解し100℃で10分間煮沸することにより、PPLと相互作用しているPP-13000を分離した後、ゲルろ過クロマトグラフィーに供した。得られた各画分をMALDI-TOF MS解析に供した結果、PPLのみの画分、PPLに対しPP-13000の含有率が多い画分を得た。現在、この画分を更に二次元電気泳動またはBioassist Q強陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、PP-13000を完全に単離すること及びLC-MS/MS解析を用いてPP-13000の一次構造を解読することを試みている。

1) Suzuki, T., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 702-709 (2009)
2) 鈴木ら、第52回天然有機化合物討論会講演要旨集、p.655 (2010)

Pleurocybella porrigens, protease, lectin and lethal toxin complex

講演番号：3A08p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ A校舎08会場

酵母two-hybrid法を用いたスギヒラタケ致死性高分子遺伝子の取得

Search for the genes of the toxic principles from the mushroom *Pleurocybella porrigens* by yeast two hybrid method

○大前　沙央理、鈴木　智大[1]、平井　浩文、河岸　洋和[2]
(静大農・応生化、[1]静大・イノベーション、[2]静大院・創造)
○Saori Omae,Tomohiro Suzuki[1], Hirofumi Hirai and Hirokazu Kawagishi[2]
(Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [1]Innovation and Joint Reseach Center, Shizuoka University, [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】2004年秋、東北・北陸地方を中心に原因不明の急性脳症が発生し、患者数は59名に達し、17名の患者が亡くなった。そのうち59例中55名はスギヒラタケ(*Pleurocybella porrigens*)を摂取しており、51名が腎機能障害を持っていたことから、スギヒラタケが急性脳症の原因であることが予想されたが、未だその発症機構は不明である。我々は現在までに、スギヒラタケレクチン(PPL)の単離・精製及びアミノ酸配列・cDNA塩基配列情報の取得に成功しており[1)]、PPLとスギヒラタケ致死性高分子 (B3)を混合するとプロテアーゼ様活性を示し、血液脳関門を破壊することを報告している[2)]。さらに、スギヒラタケエタノール可溶部よりミエリン鞘を構成するオリゴデンドロサイト系細胞に毒性を示すpleurocybellaziridineの単離にも成功している[3)]。しかし、このプロテアーゼ様活性はスギヒラタケ抽出物のコンタミネーションの可能性が否定できないため、PPL及びB3のrecombinant体を用いたプロテアーゼ様活性の再現が必要となるが、B3の一次構造はその不溶性から未だ不明である。そこで本研究ではB3遺伝子の獲得及び一次構造の解明を目的に、酵母two-hybrid法を用いてPPLと相互作用するタンパク質遺伝子の取得を目的とした。
【方法・結果】酵母two-hybrid法には、Clontech社のMatchmaker™ Gold Two-Hybrid Systemを使用した。まず、PPL cDNAをp*GBKT7* vectorに導入後、酵母Y2HGold株へ形質転換しbait 株を作成した。次いで、スギヒラタケ子実体より抽出したtotal RNAから得たcDNAライブラリーとp*GADT7-Rec* vectorを混合し、酵母Y187株へ共形質転換し prey株を作成した。得られた両菌体を用いて接合実験を行い、タンパク質間相互作用を示す青色コロニーの取得を試みた。その結果、64株の陽性クローンの取得に成功した。得られた全陽性クローンの遺伝子配列情報及びスギヒラタケトランスクリプトーム解析データより、目的遺伝子を有すると思われる陽性クローン5株を選抜した。また、RACE法を用いて、全5株の完全長cDNA塩基配列情報の取得に成功した。

1) Suzuki, T., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 702-709 (2009).
2) 鈴木ら, 第52回天然有機化合物討論会講演要旨集, 655-660 (2010) .
3) Wakimoto, T., et al., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 50, 1168-1170 (2011).

Keyword　mushroom, *Pleurocybella porrigens,* Yeast two-hybrid screening

講演番号：3A08p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ A校舎08会場

白色腐朽菌*Phanerochaete sordida*を用いたスギヒラタケレクチンの大量発現系の構築

Heterologous over-expression of a lectin from *Pleurocybella porrigens* in *Phanerochaete sordida* YK-624

○鈴木　智大、藤田　基寛[1]、田原　慎太郎[2]、徳山　真治[2]、平井　浩文[2]、河岸　洋和[1]
(静大・イノベーション、[1]静大院・創造、[2]静大農・応生化)
○Tomohiro Suzuki, Motohiro Fujita[1], Shintaro Tahara[2], Shinji Tokuyama[2], Hirofumi Hirai[2] and Hirokazu Kawagishi[1]
(Innovation and Joint Reseach Center, Shizuoka University, [1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

【目的】スギヒラタケ（*Pleurocybella porrigens*）はキシメジ科スギヒラタケ属のキノコで、北陸、中部、東北地方を中心に食用とされてきたが、2004年9月以降、新潟、山形、秋田の各県で原因不明の急性脳症が相次いだ。我々は現在までに、スギヒラタケからレクチン（PPL）の単離・精製に成功し、その一次アミノ酸配列及びcDNA塩基配列情報の取得に成功し[1)]，PPLとスギヒラタケ致死性高分子を混合するとプロテアーゼ様活性を示し、血液脳関門を破壊することを報告している[2)]。我々は現在までにPPLの発現系の構築を試み、白色腐朽菌*Phanerochaete sordida* YK-624株を用いた PPLのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーターまたはマンガンペルオキシダーゼ遺伝子プロモーター制御下での発現に成功したが、未だ大量発現系の構築には至っていない[3)]。そこで本研究ではPPLの大量発現系の構築に向け、GST 融合PPLの*P. sordida*-YK-624株による異種発現を試みた。

【方法及び結果】まず、*P. sordida* YK624株由来のGPD遺伝子プロモーター･ターミネーター間に GST遺伝子を融合させたPPLのcDNAを挿入し発現プラスミドを構築した。本プラスミド及びマーカー（*URA5*）プラスミドを*P. sordida* YK-624株由来ウラシル要求性変異株UV-64株にPEG法を用いて導入し、復帰変異株89株を取得した。これら復帰変異株からゲノムを抽出しgenomic PCRを行ったところ、89株中31株にて目的遺伝子の挿入が確認された。これら形質転換株よりGST融合PPLの産生に優れた株を選抜し、Kirk HNHC液体培地で培養し菌体を破砕した後、GSTrap 4B アフィニティークロマトグラフィーに供した後、エンテロキナーゼを用いてGSTタグを切断した。その後TSK gel super SW 2000ゲルろ過クロマトグラフィーを行いrecombinant PPLを精製した。rPPLのMALDI-TOF-MS解析、N-末端アミノ酸配列解析の結果、rPPLはnative PPLと一致した分子量及びアミノ酸配列を示した。また、スギヒラタケ致死性高分子と混合するとnative PPLと同様プロテアーゼ様活性を示した。

1) Suzuki, T., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 13, 100-709 (2009)
2) 鈴木ら、第 52 回天然有機化合物討論会講演要旨集、p. 655
3) 鈴木ら、日本農芸化学会2010年度大会講演要旨集、p. 157

lectin, mushroom, *Pleurocybella porrigens*

講演番号：3A08p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ A校舎08会場

ムラサキナギナタタケレクチンの構造と糖結合特異性

Structure and sugar binding specificity of Clavaria purpurea lectin (CpL)

リモビトリス、[1]西香織、下川倫子、[1]南雄二、○[1]八木史郎（鹿児島農連大、[1]鹿児島大農生資化）
Beatrice Lyimo, [1]Kaori Nishi, Michiko Shimokawa, [1]Yuji Minami, ○[1]Fumio Yagi
(United Grad. Sch. Agr. Kagoshima Univ., Biochem. Sci.& Technol., Fac. Agr. Kagoshima Univ.)

【目的】ムラサキナギナタタケは松林の砂地に生えるキノコでヒダナシタケ目シロソウメンタケ科に属している。以前[1]このキノコレクチン（CpL）の精製と性質について報告し、RIPタイプのレクチンであると推定したが、今回その糖結合特異性についてさらに詳細に検討し、部分配列についても他のRIPタイプとされているキノコレクチンとの比較を試みた。

【方法】精製はアシアロフェチュインを用いたアフィニティクロマトグラフで行い、吸着レクチンをガラクトースで溶出し均一な標品を得た。分子量はHPLCを用いたゲルろ過、およびSDS-PAGE, TOFMSで決定した。糖結合特異性については、トリプシン処理ウサギ血球の凝集阻害活性阻害、ELLSA、αガラクトース結合コロイド金ナノ粒子（GNP）の解離をもちいて評価した。CpL-GNP複合体の解離では、各糖によって遊離するGNPの530nmの吸収より複合体を50%解離させる糖濃度を計算し比較した。ペプチド断片はトリプシン、サーモリシンなどによる酵素分解後ペプチド断片を逆相カラムによりHPLCで分離精製した。ヒドロキシルアミンによるAsn-Gly解裂、o-iodosobenzoateによるTrpでの切断後、トリシンSDS電気泳動でペプチドを分離後、PVDF膜へブロッティングした。精製ペプチドの配列はプロテインシークエンサーにより決定した。

【結果】CpLの分子量は15.9KでありN-末端はブロックされていた。RIPタイプレクチンに見られるQXWモチーフを少なくとも２つもち、Pleurocybella porrigens lectin (PPL)[2]やClitocybe nebularis lectin (CNL)[3]といったRIPタイプのキノコレクチンとは分子量は近く、β2-β5付近と推定される配列も似ていた.しかし糖結合特異性については異なっていた。CNLはラクトースやGalNAcをもつ糖鎖と強く反応することが報告されていて、PPLもGalNAcに親和性が強い。CpLの糖結合特異性はシバフタケレクチンであるMOA[4]に近い。MOAのようにGalα1,3Gal特異的ではないがGalαを含むオリゴ糖を強く認識できるレクチンであった。全構造についてはcDNAから解析中である。

[1]リモビトリスら、日本農芸化学会2010年度大会講演要旨集 p.157.
[2]Suzuki et al., Biosci Biotechnol Biochem, 73, 702-709 (2009).
[3]Pohleven et al., Biochim Biophys Acta, 1790,173-181(2009).
[4]Winter et al., J. Biol. Chem., 277, 14996-15001 (2002).
Biosci Biotechnol Biochem in press.

Lectin, RIP, Mushroom

講演番号：3A08p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ A校舎08会場

エゾニワトコ果実レクチンの性質と構造

Properties and structure of the lectin from the fruit of S. racemosa subsp. kamtschatica

○綿 文禎、坂本 光、舘野 浩章[1]、平林 淳[1]、小栗 秀（東農大生物産業・生物生産、[1]産総研・糖鎖医工学）

○Tomoyoshi Wata, Hikaru Sakamoto, Hiroaki Tateno[1], Jun Hirabayashi[1], Suguru Oguri (Tokyo Nodai, [1]AIST)

【目的】スイカズラ科の樹木ニホンニワトコの樹皮は、Gal/GalNAc 特異的レクチン（ＳＳＡ）を含むことが知られている。近縁種エゾニワトコの果実抽出液に市販ＳＳＡと異なる特異性を示すレクチン活性を見出した。本レクチンを精製し、その性質と一次構造を解析した。

【方法】北海道網走に自生するエゾニワトコの完熟果実を精製材料に用いた。

【結果】１．Fetuin-Sepharose４B カラムおよびゲルろ過カラムを用いて、エゾニワトコ果実抽出液からレクチン（ＳＫＡと略す）を均一に精製した。２．ＳＫＡの血球凝集活性は、Meα-Man の添加により最も強く阻害され、Glc およびα-Glc を含む二糖の添加によっても阻害された。糖鎖アレイを用いた解析からＳＫＡは高マンノース型糖鎖を持つ糖タンパク質と強く結合することが示された。３．ＳＫＡは、33kDa の糖鎖を含まない単量体であり、N 末端は閉鎖していた。プロテアーゼ消化断片のアミノ酸配列情報に基づいて作製した縮重プライマーを用いて未熟果実から調製した cDNA に対して 5’および 3’-RACE 法を行った。287 アミノ酸残基のＳＫＡをコードする 1196bp の完全長 cDNA をクローニングした。ＳＫＡはシグナルペプチドを含まないと考えられた。その推定配列は植物レクチンの一家系であるマンノース特異的ジャカリンとの間に配列の類似性を示し、16kDa ジャカリンのプロトマー配列が分子内で 2 回繰り返された構造を持つと予想された。その結果からＳＫＡは既知ニワトコレクチンＳＳＡと異なる新規レクチンであることがわかった。

lectin, jacalin, Sambucus racemosa subsp. kamtschatica

講演番号:3A08p11
講演日時、会場:3月24日15:49～ A校舎08会場

チョウセンアサガオ種子に含まれるレクチンの一次構造

Primary structure of lectins from the seeds of Datura stramonium

○西本 圭佑、坂本 光、仲下 英雄[1]、小栗 秀（東農大生物産業・生物生産、[1]東農大応生科・化学）

○ Keisuke Nishimoto, Hikaru Sakamoto, Hideo Nakashita[1], Suguru Oguri(Dept. of Bioproduction, [1]Dept. of Applied Biology and Chemistry, Tokyo Nodai)

【目的】ナス科チョウセンアサガオの種子に含まれるキチン結合性レクチン（DSA）は、ヒドロキシプロリンに富む糖タンパク質である。DSAは２種類のサブユニット（AとB）がジスルフィド結合を介して会合した２量体であり、サブユニット組成の異なるイソレクチンが存在する。サブユニットの構造を比較し、Bサブユニット遺伝子をクローニングした。

【方法・結果】１．DSA画分から疎水クロマトグラフィーを用いてサブユニット組成（A-B）と（B-B）の二種のイソレクチンを分離した。還元ピリジルエチル化産物およびその脱グリコシル化産物のMALDI-TOF MS分析からサブユニットAとBのポリペプチド部分の質量はそれぞれ22.0 kDaと26.5 kDa、糖含量はそれぞれ40％と30%と求められた。２．両サブユニットのN末端配列は同じであったが、ペプチドマップは異なっており、解析されたプロテアーゼ消化断片のアミノ酸配列にも数か所の置換が検出された。３．Bサブユニットの内部アミノ酸配列情報を元に縮重プライマーを設計し、未熟種子から調製したcDNAに対して5´および3´-RACE法を行った。単離されたcDNAにコードされた推定アミノ酸配列は、Bサブユニットの内部アミノ酸配列と一致した。また、予想N末端から234アミノ酸残基の推定分子量は実測値と一致した。このことから単離されたcDNAはDSAのBサブユニット遺伝子であると結論した。Bサブユニットは4個のキチン結合ドメイン(CBD1～4)と、CBD２と-３の間に挿入されたProに富む37残基のエクステンシン様ドメインから構成された。CBD2は、ドメイン内S-S結合に参加しないと予想される余剰のCys残基を1個含み、これによりサブユニット間S-S結合を形成し、二量体を構成することが示唆された。

lectin, chitin-binding, Datura stramonium

講演番号：3A08p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ A校舎08会場

糖結合サブドメインへの変異導入による溶血性レクチンCEL-IIIの機能向上

Improvement of hemolytic activity of hemolytic lectin CEL-III by mutation into sugar binding subdomain.

○清水 良樹[1,2]、米倉 政実[2]、上妻 由章[2] ([1]東農工大・連農、[2]茨大・農)
○Yoshiki Shimizu[1,2], Masami Yonekura[2], Yoshiaki Kouzuma[2] ([1]Tokyo Univ. of Agr. and Tec., [2]Ibaraki Univ.)

【目的】

Ca^{2+}依存性溶血性レクチンCEL-IIIは、赤血球膜上の糖鎖に結合後、オリゴマー化し、小孔を形成後、溶血させる。CEL-IIIは3回の繰り返し構造(サブドメインα, β, γ)からなる2つの糖認識ドメインと1つの会合体-小孔形成ドメインから構成されている。CEL-IIIはマラリア伝播阻止のために構築されたトランスジェニックハマダラカ (TGM) の機能分子に利用され、このCEL-III発現TGMは非常に高いマラリア伝播阻止能を示すものの、マラリアの伝播を100%阻止することはできていない。マラリア伝播を完全阻止するTGMの構築には、抗マラリア活性を向上させた高機能化CEL-IIIの構築が必要であることから、今回、CEL-IIIの高機能化の一環として、CEL-IIIの糖結合部位等に変異を導入し、CEL-IIIの溶血活性の向上を試みることとした。

【方法】

CEL-IIIの糖認識ドメイン中の3つのサブドメインのうち1αで糖とのスタッキング効果に寄与しているHis36を芳香族アミノ酸 (Tyr、Phe、Trp) 及びその近傍に位置するAsn32をAspに置換した変異体CEL-III (H36Y、H36F、H36W、N32D) をチオレドキシン融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。封入体として発現された変異体CEL-IIIを6Mグアニジン塩酸塩で可溶化後、希釈法によりリフォールディングして、Lactosyl-cellulofineカラムによるアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した。次に、精製した変異体CEL-IIIのウサギ赤血球に対する溶血活性と溶血速度を調べた。

【結果】

変異体CEL-IIIをチオレドキシン融合タンパク質として発現し、リフォールディングして、精製したところ、培養液1L当たりH36Yが19.1 mg、H36Fは13.4 mg、H36Wは14.9 mg、N32Dは12.4 mg得ることができた。次に、ウサギ赤血球に対する溶血活性を調べたところ、H36Yの50%溶血に要する濃度は 0.367 μg/ml (野生型CEL-III (WT)に対する相対活性47.3%)、H36Fが0.112 μg/ml (同155%)、H36Wが0.321 μg/ml (同54.1 %)、N32Dが0.142 μg/ml (同122%)となり、H36FとN32Dに関してはWTと比較して溶血活性が上昇していた。更に変異体CEL-IIIの溶血速度を調べたところ、50%溶血に要する時間がWTは3.95 minであったのに対し、H36Yは3.42 min (WTの0.866倍)、H36Fは1.85 min (同0.468倍)、H36Wは4.91 min (同1.24倍)、N32Dは3.29 min (同0.833倍)となり、H36Wを除く4種の変異体で溶血速度が上昇していた。特にH36Fは溶血活性及び溶血速度の両方がWTと比較して大きく上昇し、HisからPheへの置換により、糖結合活性が変化し、リガンドへの親和性が上昇したことや、糖鎖へ結合した後のオリゴマー形成の速度が上昇したことが推測された。

hemolytic lectin, *Cucumaria echinata*, mutant analysis

講演番号：3A08p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ A校舎08会場

イトマキヒトデレクチンおよびその変異体の糖結合活性測定

Measurement of carbohydrate-binding activity of *Asterina pectinifera* lectin and its mutant

○畠山智充，小松紗世，小笠原未紗，馬場智大，狩野良太，海野英昭，郷田秀一郎，沖野　望[1]，伊東　信[1]（長崎大院・工・物質科学，[1]九大院・農・生命機能）

○Tomomitsu Hatakeyama, Sayo Komatsu, Tomohiro Baba, Ryota Karino, Hideaki Unno, Shuichiro Goda, Nozomu Okino[1], Makoto Ito[1] (Grad. Sch. of Eng., Nagasaki Univ., [1]Dept. of Biosci. and Biotech., Grad. Sch. of Biore. and Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

【目的】イトマキヒトデ(*Asterina pectinifera*)由来レクチンAPLは，Gal/GalNAc特異的C型レクチンであり，分子量17,000のサブユニットが会合したオリゴマー構造をとっている。これまでに，大腸菌を用いて組換え型APL（WT-APL）を調製し結晶化を試みた結果，結晶は得られたが，立体構造解析可能なX線回折像を示さないことがわかり，WT-APLがN-末端領域を介して不均一な会合体を形成している影響である可能性が示唆された。そこで，今回，WT-APL のN-末端10残基を削除したΔ10-APLを作製し，その性質と糖結合活性について検討を行った。
【方法】WT-APL及びΔ10-APL遺伝子をPCRにより作製し，プラスミドpET-3aに組み込んだのち，大腸菌BL21(DE3)pLysSを用いて発現を行った。両タンパク質ともに発現後はインクルージョンボディとして得られたことから，尿素を用いた可溶化を行い，糖固定化カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。糖結合活性については，赤血球凝集活性，糖含有ポリアミドアミンデンドリマー（PD）凝集活性，等温滴定カロリメトリー（ITC）により検討した。
【結果】得られたWT-APL及びΔ10-APLの円二色性（CD）スペクトルを測定した結果，同様の二次構造を有していることから正しくフォールディングしているものと考えられた。一方，SDS-PAGEの結果からは，WT-APLがジスルフィド結合を介してオリゴマーを形成していたのに対して，Δ10-APLはモノマーであったことから，WT-APLはN-末端領域のCys残基を介してS-S結合を形成していることが推定された。また，WT-APLはウサギ赤血球に対して凝集活性を示したのに対して，Δ10-APLは凝集活性を示さなかったことからも，Δ10-APLがモノマーとして存在し，1分子あたり1か所の糖結合部位しか持たないことが確認された。ITC及び糖含有PDとの相互作用から，両タンパク質はGalNAcに比較的高い特異性をもつものと考えられた。Δ10-APLについて結晶化条件を検討した結果，複数の条件で微結晶の生成が認められた。

lectin, carbohydrate, *Asterina pectinifera*

講演番号：3A08p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ A校舎08会場

tRNA および DNA 切断酵素 PaT のキャラクタリゼーション

Characterization of the enzymatic activity of yeast killer toxin, PaT, cleaving both tRNA and DNA.

○田中　亘、茂松　恵、小川　哲弘、日高　真誠、正木　春彦（東大院農生科・応生工）
○ Wataru Tanaka, Megumi Shigematsu, Tetsuhiro Ogawa, Makoto Hidaka, Haruhiko Masaki (Dept. of Biotech., Univ. of Tokyo)

【目的】キラー酵母 *Pichia acaciae* が生産する PaT は、感受性酵母に対して DNA 損傷を誘導し、細胞周期を S 期で停止させることが知られていた。更に近年、これに加えて $tRNA^{Gln}UUG$ を特異的に切断する活性を持つことも明らかとなった。これより、PaT の tRNA 切断が原因となって、間接的に感受性菌の DNA 損傷を引き起こすと考えられている。一方、我々のグループでは、PaT が DNA と直接相互作用することを明らかにし、ゲノム DNA に直接働きかけて DNA 損傷を誘導する可能性を示した。今回、PaT が DNA 切断活性を持つことを報告する。
【方法と結果】tRNA 切断活性を担うとされるサブユニットである Orf2p の C 末端に His タグが付加されるように改変した遺伝子をクローニングした。これを大腸菌に導入することで Orf2p を大量発現させ、Ni-NTA カラムにより精製した。精製した Orf2p は、出芽酵母より調製した tRNAGlnUUG を 34-35 位間で切断することを明らかにした。現在、切断末端のリン酸基の形状を解析中である。また、Orf2p を DNA と反応させたところ、非特異的分解活性を示した。この活性は、tRNA 切断に必須である His299 を変異させた変異型 Orf2p では観察出来なくなることから、Orf2p の DNA 切断活性には、tRNA 切断と同様、His299 が関与することが考えられる。

ribonuclease, deoxyribonuclease, toxin

講演番号:3A08p15
講演日時、会場:3月24日16:43～ A校舎08会場

タイトル　マイクロ波処理を利用した果実クチクラ膜の簡単な調製法の開発

Title　Development of convenient preparation method of fruit cuticle membrane by microwave treatment

○東　順一、尾崎嘉彦[1]、米森 敬三（京大院農、[1]農研機構果樹研）

○Jun-ichi Azuma, Yoshihiko Ozaki, Keizo Yonemori(Kyoto univ., Natl. Inst. Fruit Tree Sci.[1])

【目的】

果実の果皮は、品質・保存性等の決定因子となっていると同時に、食する際に残渣果皮バイオマスを発生しており、ゼロエミッションの観点からも重要である。特に、柿は「干し柿」の生産時に多量の果皮バイオマスを発生しているのでその利用が求められている。そこで、我々は柿の果実表層のクチクラ膜を単離してその化学的・力学的性質について研究を進めている。しかし、従来の酵素法によるクチクラ膜の単離には週単位の長時間を必要とし、より簡単なクチクラ膜の調製法の開発が求められていた。本研究では、マイクロ波を利用した簡単な果実クチクラ膜の調製法を開発したので報告する。

【方法】

クチクラ膜を調製する果実として和歌山県産の富有柿と平核無柿の果実を選択した。また、リンゴやその他の果実についても比較検討した。剥皮した果皮部分を0-10%の過酸化水素の存在下マイルストーンゼネラル社のMHP大容量加圧反応ローターを用いて加熱処理し、色彩計とFT-IRを利用してモニターしつつクチクラ膜の単離を試みた。

【結果】

柿の果皮は石細胞に裏打ちされているが、水中で210℃以上の温度でマイクロ波加熱するとペクチン系多糖が分解され膜状物質としてクチクラ膜を単離することができる。しかし、多糖が多く残存するとともに、カロチノイド系の色素の色も残存する。そこで、過酸化水素を添加した条件下でマイクロ波加熱することによりこれらの夾雑成分の除去を試みた。その結果、5%以上の過酸化水素の共存下2.5分の加熱により白色のクチクラ膜が得られることが明らかとなった。単離したクチクラ膜のFT-IR分析の結果、多糖と共に芳香族に由来する吸収が劇的に減少し、酵素法とは異なったクチクラ膜であることも明らかとなった。本法では、従来用いていた100mLの容器とは異なり、果実サイズのクチクラ膜を調製できる利点がある。その他の化学組成分析や力学的分析の結果についても報告する。また、単離条件は果実の種類により最適化する必要があることもわかった。

Keywords; Cuticular membrane, Microwave treatment

講演番号:3A08p16
講演日時、会場:3月24日16:54～ A校舎08会場

リンゴ果実クチクラ膜の成長に伴う化学的、力学的性質の変化

Growth-dependent changes in chemical and mechanical properties of apple fruit cuticular membrane

○松村 由貴、尾崎嘉彦[1]、坂本正弘、東 順一（京大院農・地域環境、[1]農研機構果樹研）
○Yuki Matsumura, Yoshihiko Ozaki[1], Masahiro Sakamoto, Jun-ichi Azuma (Kyoto Univ., [1]Natl.Inst.Fruit Tree Sci.)

【目的】
果実の表面を覆うクチクラ膜は脂肪族バイオポリエステルであるクチン、可溶性のワックス、多糖類及び難分解性のクタンから成り、水分損失や病原菌の侵入を防ぐなどの役割を果たしている。果実の成長に伴ってクチクラ膜が裂開する現象を裂果現象と呼び、様々な種類の果実に発生する重大な生理障害として認識されている。しかし、裂果現象の発生については不明な点が多いため、発生に関わる重要な因子と考えられるクチクラ膜の性質により深い理解が求められている。組織の成長に伴うクチクラ膜の構成成分の変化によりクチクラ膜の剛性が増すという報告もされており、クチクラ膜の構成成分が物理的性質に寄与すると考えられているが、リンゴでの報告はなされていない。そこで、本研究では、リンゴ果実の成長に伴うクチクラ膜の化学的、力学的性質の変化について研究を行った。

【方法】
開花後 35 日、65 日、97 日、128 日、158 日、175 日、188 日及び 204 日に採取したリンゴ（ふじ）果実をペクチナーゼ及びセルラーゼで酵素処理してクチクラ膜を単離した。クチクラ膜を構成する主成分であるワックス・クチン・多糖類を単離し、それぞれの処理による重量の変化から含量を求めた。また、FT-IR 分析、GC-MS 分析を行い、果実の成長に伴うクチクラ膜の構成成分の組成変化を分析した。

【結果】
リンゴ成熟果実はワックス含量が約 45%と比較的多いことが特徴的であった。成長の後期にワックス含量が増加するに伴い、クチン含量が相対的に減少していった。また、クチクラ膜構成成分の分析から、ワックスの主成分はウルソール酸であることを確認した。現在、成長に伴うクチクラ膜の詳細な化学的及び力学的性質について分析し、クチクラ膜の構成成分の生育に伴う変化について検討している。

apple, cuticular membrane

講演番号:3C09a01
講演日時、会場:3月24日09:00～ C校舎09会場

クルクミン代謝に関わる酵素の精製

Purification of the enzyme involved in microbial metabolism of curcumin

○ハサニナサブ アザム、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Azam Hassaninasab, Yoshiteru Hashimoto and Michihiko Kobayashi (Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

【目的】 Curcumin is a polyphenol derived from the herbal remedy and dietary spice turmeric. It possesses diverse range of medical properties such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer. Despite the impressive applications of curcumin and its metabolites, a few basic investigations related to biosynthesis, biotransformation and biodegradation are at hand.

【方法】 The curcumin-converting ability of microorganisms was measured by reduction of curcumin using HPLC. The enzyme involved in curcumin conversion was purified using different column chromatographi es. Moreover, the products derived from curcumin metabolism were identified by liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry (LC-ESI^{+}-MS), fast atom bombardment mass spectrometry (FAB mass) and UV-vis spectra using HPLC.

【結果】 The microorganism with the highest curcumin-converting activity was identified as *Escherichia coli*. The enzyme involved in curcumin biotransformation was purified. The homogeneity of the purified protein was confirmed by SDS/PAGE. The gel filtration chromatography analysis demonstrated that the enzyme consisted of two identical subunits. The enzyme has a narrow substrate spectrum, preferentially acting on curcumin. The metabolism of curcumin by the purified enzyme was found to comprise a two-step reduction. Moreover, corresponding enzyme gene was cloned and sequenced.

curcumin, metabolism, microorganism

講演番号：3C09a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ C校舎09会場

紅色光合成細菌*Rhodobacter capsulatus*を用いたコハク酸脱水素酵素複合体の異種生物間発現

Heterologous expression of succinate dehydrogenase in *Rhodobacter capsulatus*

○坂元　君年、Aldrat Hendri[1]、北　潔[1]（弘前大農学生命、[1]東大院医）
○Kimitoshi Sakamoto, Hendri Aldrat[1], Kiyoshi Kita[1] (Hirosakidai, [1]Tokyodai)

【目的】細菌の細胞膜やミトコンドリア内膜で機能する呼吸鎖電子伝達系は一連の酵素複合体の反応により、生物のエネルギー転換反応を担う。その一つ、コハク酸脱水素酵素複合体は呼吸鎖電子伝達系と TCA 回路を繋ぐ重要な酵素複合体であり、細菌、真核生物を通して結晶構造解析がなされた例が比較的多い一方で、アミノ酸変異体解析については技術的な問題から大腸菌と出芽酵母に集中している。膜酵素であるコハク酸脱水素酵素複合体の親水性サブユニットにおいては生物種間でのアミノ酸配列の一致率は高いが、膜貫通サブユニットでの一致率は極めて低い。その為、類似性の低い部位に関しては大腸菌や出芽酵母において変異体解析により確かめられたアミノ酸残基の機能が他の生物においては必ずしも同じではない。コハク酸脱水素酵素の基質の一つは脂溶性のキノンであり、その結合部位周辺の解析に大腸菌や出芽酵母をモデルとして一般論を導くことには限界がある。そこで我々はより広範囲な生物での情報を得るシステムを作るために紅色光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* を発現宿主とした異種生物コハク酸脱水素酵素複合体の発現系開発を目指している。発現宿主としてミトコンドリアに局在する酵素複合体の発現に適している可能性を考慮し、ミトコンドリアの由来とされるαプロテオバクテリアの中から遺伝子操作に適したものを選択した。
【方法・結果】*R. capsulatus*を発現宿主とするにあたり、内在性のコハク酸脱水素酵素を欠損させた。同様にコハク酸脱水素酵素を欠損した大腸菌も並行して発現宿主としての可能性を考慮し、両細菌を使用してミトコンドリアや細菌由来である数種の異種生物コハク酸脱水素酵素複合体の発現を試みた結果、これまでに機能的に発現することが確認されたのは*R. capsulatus*を宿主としαプロテオバクテリア*Rhodospirillum rubrum*の酵素複合体を発現させた場合のみであった。これはコハク酸脱水素酵素複合体の機能的な異種生物間発現系としては最初の例である。さらにこの組換え酵素が酵素学的解析に利用できるかを確認するために安定な酵素の精製法を検討した結果を報告する。

respiratory chain, succinate dehydrogenase, Rhodobacter capsulatus

講演番号：3C09a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎09会場

点変異導入によるサツマイモ桂皮酸オルト位水酸化酵素の基質認識アミノ酸残基の探索

Exploration of substrate recognition of the *ortho*-hydroxylase by introducing point mutations

○岩田　友子、柴田　行範、清水　文一（東洋大・生命科）
○Tomoko Iwata, Yukinori Shibata, Bun-ichi Shimizu (Toyo Univ.)

【目的】クマリン化合物は、フェニルプロパノイドに属する二次代謝産物で植物界に広くみられる。クマリン骨格は桂皮酸類のオルト位水酸化、シス－トランス異性化、ラクトン化を経て形成される。なかでもオルト位水酸化は不可逆反応で、クマリン化合物生合成において鍵段階である。クマリン化合物であるスコポレチン（7-hydroxy-6-methoxycoumarin）はフェルロイル-CoA（4'-hydroxy-3'-methoxycinnamoyl-CoA）から、ウンベリフェロン（ 7-hydroxycoumarin ）は *p*-クマロイル-CoA（4'-hydroxycinnamoyl-CoA）からオルト位水酸化を経て生合成されると考えられる。モデル植物であるシロイヌナズナではフェルロイル-CoA を基質として触媒する 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ（2OGD）がオルト位水酸化酵素（AtF6'H1）として同定された。また、サツマイモ（*Ipomoea batatas* ）からは AtF6'H1 ホモログの桂皮酸オルト位水酸化酵素（IbF6'H）が 2 種類同定されている。その 1 つである IbF6'H1 はフェルロイル-CoA だけを基質として認識する。一方、IbF6'H2 はフェルロイル-CoA と *p*-クマロイル-CoA を基質として認識する。これら 2 つの CoA エステルの違いは、フェルロイル-CoA の 3'位メトキシ基の有無である。IbF6'H1 と 2 にはこれらの基質を区別する何らかのメカニズムが存在していると考えられる。そこで本研究では、IbF6'H1 と 2 の基質認識に関わることが予想されるアミノ酸残基を入れ替え触媒活性の変化を確認し基質認識に関わるアミノ酸残基を解明することを目的とした。
【方法および結果】同じ2OGDファミリーに属するシロイヌナズナ由来アントシアニジンシンターゼ（AtANS）の結晶構造を参考にしてIbF6'H1のアミノ酸配列から各種モデリングツールを用いて三次元モデルを構築した。これをもとにフェルロイル-CoA の3'位のメトキシ基周辺で基質認識に関わる可能性が高い候補アミノ酸残基をIbF6'H1配列中で絞り込んだ。さらに、*IbF6'H1-2*および*IbF6'H2-2-1*を鋳型として変異配列を持つプライマーを用いたPCRで点変異を導入した。これら点変異配列を大腸菌にて、タンパク質として大量発現した。得られた変異導入タンパク質の酵素活性および基質認識について検討した。

ortho-hydroxylase, substrate recognition, cinnamates

講演番号：3C09a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎09会場

*Streptomyces coelicolor*が産生する菌体外ジアホラーゼの発見と解析

Discovery and analysis of an extracellular diaphorase produced by *Streptomyces coelicolor*

○老沼 研一、山口 格、高野 英晃、上田 賢志（日大・生物資源）
○Ken-Ichi Oinuma, Itaru Yamaguchi, Hideaki Takano, Kenji Ueda (Nichidai)

【目的】土壌には、生物の死後、生体由来有機化合物が微生物等による様々な分解や重合を受けることで最終的に生成する、腐植酸と呼ばれる構造不定の有機物が豊富に含まれている。腐植酸は芳香環を多く含み褐色を呈する極めて難分解性の化合物であるが、自然界では微生物による腐植酸分解が地球上の炭素サイクルに大きく寄与していると目されている。また、近年では、土壌中の多様な微生物群が、有機物代謝によるエネルギー生産の過程で生じた電子の最終的な受容体として、腐植酸を利用している可能性が示唆され始めている。一方、腐植酸は放線菌の選択分離に極めて有効な培地添加物として知られながら、それが放線菌によってどのように利用されているかについては全く知見が得られていなかった。そこで我々は、研究室保有の各種放線菌に対して脱色を指標とした腐植酸分解能の検定を行い、これらの菌群が自然界でどの程度腐植酸の分解に寄与しているかの予備的知見を得るとともに、特に強い脱色活性を示した菌（*S. coelicolor* A3(2)）から腐植酸分解酵素（あるいは腐植酸に対して何らかの特異的な作用を示すタンパク質）の取得を試みた。

【方法と結果】腐植酸を含む最少培地や半合成培地（Bennett's maltose）（寒天プレート）に各種放線菌を点植菌し培養したところ、検定を行った約400株のうち３割程度で、いずれかの培地に生育したコロニーの周囲に腐植酸の脱色が観察された。我々は、これらの放線菌は腐植酸分解酵素を菌体外に分泌しているものと推察し、菌の培養液を染み込ませたペーパーディスクを腐植酸入りプレートに設置後インキュベートすることで、培養液の腐植酸分解活性を検定した。結果、*S. coelicolor*の培養上清に比較的強い腐植酸脱色活性が確認されたため、我々は活性を指標に培養液からの腐植酸分解酵素の精製を試みた。最終的に得られたタンパク質のN末端アミノ酸配列は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の構成成分であるジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ（PdhL）（推定）と一致した。本酵素は一般的に、補酵素としてFADを含み、NADH依存的にジクロロフェノールインドフェノール（DCIP）など様々な色素化合物を還元するジアホラーゼ活性を持つことが知られている。*S. coelicolor*の培養上清から得られた酵素も、やはりFADを含み、DCIPの還元反応を触媒することが確認された。これらの結果から、*S. coelicolor*のPdhLは、腐植酸の還元的脱色能を有する菌体外酵素であると推察した。本酵素の働きによって、菌が土壌中の腐植酸を最終電子受容体として利用することが可能になると考えられる。

humic acid, actinomycetes, diaphorase

講演番号:3C09a05
講演日時、会場:3月24日09:44～ C校舎09会場

*Enterococcus*属乳酸菌のD型マンデル酸脱水素酵素の解析

Functional analysis of D-mandelate dehydrogenase from *Enterococcus* family

○高橋　葉、藤沢　伸介、宮永　顕正、田口　速男（東理大・理工・応生科）
○Yo Takahashi,Shinsuke Fujisawa,Akimasa Miyanaga,Hayao Taguchi (Tokyo University of Science)

【目的】D型マンデル酸脱水素酵素(D-MDH)はNADHを補酵素としてベンゾイル蟻酸とマンデル酸間の酸化還元反応を行う。D-MDHファミリーのタンパク質は微生物に広く分布しており、現状ではその大半が機能未知のタンパク質である。腸球菌と呼ばれる乳酸菌の一種である*Enterococcus faecalis* IAM10071株には、過去の研究により2種類のD-MDH(D-MDH1とD-MDH2)が含まれていることが明らかになった。D-MDH2については、既に遺伝子クローニングから組換え型酵素を作製し、その性質を明らかにした(1)。しかし、D-MDH1については未だこうした研究が為されていない。本研究では、D-MDH1について遺伝子クローニング及び組換え型酵素作成を行い、その酵素学的性質を検討した。

【方法】近縁株である*E. faecium* C68株のD-MDH配列を基にプライマーを作製し、PCRを行いD-MDH1遺伝子の増幅を確認した。増幅した遺伝子を発現ベクターであるpCold Iに導入し、作製した組換えプラスミドで*E. coli* HST08 Premium株を形質転換し、発現を行った。その後、Ni-NTAカラムにより精製を行い、SDS-PAGEで単一の酵素標品を確認した。得られた酵素標品を用いて、pH7.0とpH5.0で、ベンゾイル蟻酸を基質とし活性を調べた。その際は補酵素としてNADH及びNADPHを用いて行った。加えて、pH7.0においてベンゾイル蟻酸以外の基質を用いて、基質特異性を検討した。

【結果】NADHを用いた時のベンゾイル蟻酸に対する活性を比較すると、pH7.0の場合ではpH5.0の場合よりも高いKm値を示した。また、NADPHを用いた時はpH7.0の時は有意な活性を示さなかったが、pH5.0の時では僅かに活性を示した。基質特異性を調べた結果、D-MDH2と同様に、大きな疎水性側鎖を持つ2-ケト酸などの化合物にも活性を示した。しかし、全般的にD-MDH2と比べて高いVmax値とKm値を示すなど、D-MDH2とは異なる結果を示した。現在は、D-MDH1のNADH及びNADPHに対する親和性について検討中である。

【引用文献】

(1) Wada,Y., Iwai,S., Tamura,Y., Ando,T., Shinoda,T., Arai,K. and Taguchi,H., A New Family of D-2-Hydroxyacid Dehydrogenases That Comprises D-Mandelate Dehydrogenases and 2-Ketopantoate Reductases. Biosci. Biotechnol. Biochem., 72 (4), 1087-1094 (2008).

D-2-Hydroxyacid, *Enterococcus*, Substrate specificity

講演番号:3C09a06
講演日時、会場:3月24日10:05～ C校舎09会場

耐塩性乳酸菌*Tetragenococcus halophilus*由来のLDHの精製と性質

Purification and characterization of L-lactate dehydrogenase from *Tetragenococcus halophilus*

○折重　広大、山田　美穂、市毛　朝雄[1]、小山　泰二[1]、藤田 信之[2]、荒井　一人、宮永　顕正、田口　速男（東京理大応生科、[1]野田産研、[2]NITE）

○Kouta Orishige, Miho Yamada, Asao Ichige[1], Yasuji Koyama[1], Nobuyuki Fujita[2], Kazuto Arai, Akimasa Miyanaga, Hayao Taguchi (Toukyouridai, [1]Nodasanken, [2]NITE)

【目的】*Tetragenococcus halophilus*は、醤油醸造における乳酸菌の優占種であり、近代的な醤油醸造で利用されている標準的な乳酸菌である。また、既知の乳酸菌の中では最も高い耐塩性を示す菌としても知られている。L-乳酸脱水素酵素(LDH)は生物に広く分布し、生物の生育する環境に伴って多様にその性質を分岐進化させてきた酵素である。LDHはその性質の違いから二種類に分けられ、一つは常に高い活性を示す非アロステリック型のLDH、そしてもう一つは細菌に広く分布するアロステリック型のLDHである。アロステリック型LDHでは、酵素の活性が一般にフルクトース-1,6-ビスリン酸(FBP)などによって調節されている。LDHの性質については広く研究されているが、本菌種を含め、醸造に関与する耐塩性乳酸菌のLDHの性質については全く報告されておらず、本研究では本菌株のLDH(THLDH)の性質の検討を試みた。

【方法・結果】THLDHの性質を明らかにするために、ゲノム配列をもとにTHLDH遺伝子をクローン化し、ベクターとしてpET-3dを用い、大腸菌BL21(DE3)株によって大量発現系を構築し研究を行った。組換え大腸菌の菌体破砕抽出液に対しDEAEカラムによって精製を試みたところ、LDH活性は急速に失われた。そのため、酵素活性の安定化条件を検討したところ、NaClやベタインを添加した破砕液では安定に保持されることが示され、これを用いた条件で精製に成功した。これらの結果は、THLDHの安定性には塩やベタインが大きく関与することを示している。また、THLDHは、FBP存在下で顕著に活性化されるアロステリックLDHとして特徴付けられた。さらに、得られたTHLDHは、酵素濃度が高い状態、ならびにFBPの存在下で顕著に安定化する性質を示した。ゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果、THLDHは活性の保持された状態ではテトラマーであることが確認されたが、ベタイン等の非存在下での不活性な状態ではピークが消失し、安定した四次構造をとらない可能性が示唆された。また、タンパク質濃度が低い場合に急速に活性を失ったが、希釈により失活したTHLDHを濃縮すると、活性が回復することが示された。このことから、THLDHではサブユニットの解離会合による可逆的な構造変化を伴う可能性が示唆された。

Tetragenococcus halophilus, Lactate dehydrogenase, Allosteric enzyme

講演番号：3C09a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎09会場

ニワトリ脂肪肝で特異的に発現する機能未知タンパク質の機能解析

Characterization of hypothetical protein from chicken fatty liver

○米田 一成、荒木 朋洋、仁木 隆博、櫻庭 春彦[1]、大島 敏久[2]、芝田 猛（東海大・農、[1]香川大・農、[2]九大院・農）

○Kazunari Yoneda, Tomohiro Araki, Takahiro Niki, Haruhiko Sakuraba[1], Toshihisa Ohshima[2], Takeshi Shibata (Tokai Univ., [1]Kagawa Univ., [2]Kyushu Univ.)

【目的】すでにゲノム解読が行われており、食糧資源として重要な家禽であるニワトリを対象として分子レベルでの脂肪蓄積に関する研究を行った。外科的甲状腺除去により人工的に脂肪蓄積を亢進させたニワトリを作成し、このニワトリの脂肪肝由来タンパク質を2次元電気泳動で分離後、正常肝と比較することで、肝臓において脂肪蓄積亢進とともに発現が増強しているタンパク質の検出に成功した。しかし、得られたタンパク質の部分的なアミノ酸配列からタンパク質の同定には成功したものの、機能既知のタンパク質とは相同性を有さない機能未知タンパク質であることが明らかになった。本研究では、ニワトリの脂肪肝で特異的に発現している機能未知タンパク質の機能と立体構造の解析を通じて、脂肪蓄積のメカニズム解明を行うことを目的としている。脂肪蓄積のメカニズム解明は動物生産および肥満における代謝異常の改善や、低脂肪鶏の作出につながると考えられる。

【方法・結果】ニワトリのゲノム情報から機能未知遺伝子（gga:415661）のcDNAをオーバーラップオリゴヌクレオチドを使用し、遺伝子を合成した後、pET15bベクターに挿入し、大腸菌BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL株を用いてIPTGによる遺伝子の発現を行った。その結果、SDS-PAGEで予測される分子量にバンドが検出され、His-tagによる精製にも成功した。また、特徴的なアミノ酸配列から酵素の機能を予測し、酵素活性測定を行った結果、NADPH依存性Carbonyl reductase活性の検出に成功した。本酵素の機能解析の結果から、補酵素NADPH存在下でのみ基質の還元活性が検出されることが明らかになり、機能未知タンパク質の機能を同定することに成功した。また、本酵素の結晶化を試みたところ、PEG300を沈殿剤として良好な結晶を得ることにも成功しており、今後本結晶を用いてX線回折実験を行う予定である。

Carbonyl reductase, NADPH, Chicken fatty liver

講演番号：3C09a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ C校舎09会場

大腸菌における膜結合型グルコース脱水素酵素の N 末端領域の機能解析

Analysis of function of N-terminal domain in membrane-bound glucose dehydrogenase in *Escherichia coli*

○山﨑　理恵子[1]、藤元　奈保子[1]、横山　加奈[1]、高坂　智之[2]，山田　守[1,2]（[1]山口大院医・応用分子，[2]山口大農・生機）

○Rieko Yamasaki[1], Naoko Fujimoto[1], Kana Yokoyama[1], Tomoyuki Kosaka[2], Mamoru Yamada[1,2]（[1]Biosci. Med. Yamaguchi Univ., [2]Biol. Chem. Yamaguchi Univ.）

大腸菌の膜結合型グルコース脱水素酵素(mGDH)は、87 kDa の単量体酵素で呼吸鎖初発酵素のモデルの１つであり、グルコースを酸化して電子をキノンへと渡す C 末端領域と、5 回膜貫通領域をもつ N 末端領域の 2 つの領域から構成される。これまで、膜貫通領域は膜へのアンカー機能しかもたないとされてきた。

本研究ではその N 末端領域の機能解析を試みた。N 末端領域を種々の欠失体は、構造の不安定さや活性の低下が見られた。そこで、N 末端のいくつかのアミノ酸置換体を作製し、活性への影響を検討した。その結果、R93A 変異体は、膜での安定性は野生型と変わらなかったが活性の低下が見られ、精製酵素は野生型と比べてキノン含量が増加していた。

以上のことから、N 末端領域はアンカー機能以外に、C 末端領域との重要な相互作用をもつと予想される。

Quinone, Glucose dehydrogenase, *Escherichia coli*

講演番号：3C09a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎09会場

セレンオキシアニオン還元細菌の単離と特性解析

Isolation and characterization of selenium oxyanion-reducing bacteria

○永野 知哉、斎藤 茂樹、谷 泰史、Prakash N. Tejo[1], 三原 久明（立命館大・生命科学、[1]Dept. Biotech. & Environ. Sci.・Thapar Univ.）

○Tomoya Nagano, Shigeki Saito, Yasushi Tani, N. Tejo Prakash[1], Hisaaki Mihara (Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [1]Dept. Biotech. & Environ. Sci., Thapar Univ.)

【目的】

セレンは多くの生物種にとって必須微量元素の一つであるが、体内における適正量の幅が非常に狭く、欠乏症や中毒症が引き起こされやすい。環境中や工業廃液などに含まれるセレン酸・亜セレン酸のバイオレメディエーションにおいて、セレン酸・亜セレン酸を元素状セレン（Se^0）へと還元する細菌が注目されている。細菌のセレン酸還元酵素についてはこれまでに、嫌気性グラム陰性細菌 *Thauera selenatis* のペリプラズム局在型酵素 SerABC (Schröder, I. *et al. J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 23765) や嫌気的にセレン酸を還元するグラム陽性細菌 *Bacillus selenatarsenatis* の SrdBCA (Kuroda, M. *et al. J. Bacteriol.*, 2011, 193: 2141) が同定されている。これらは共に活性中心にモリブデン補因子を持つと推定され、セレン酸を亜セレン酸に還元する。しかしながら、亜セレン酸から元素状セレンへの還元については、チオレドキシン還元酵素の関与が報告されているものの (Takahata M., *et al.*, *J. Biochem.*, 2008, 143: 467)、その詳細は不明である。本研究では、インドパンジャーブ地方の高濃度セレン蓄積土壌から単離した 33 菌株のセレン酸・亜セレン酸還元特性を調べ、新たなセレンオキシアニオン還元細菌を取得し、そのセレンオキシアニオン還元機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】

単離した 33 菌株のセレン酸・亜セレン酸還元能を好気的条件下で調べたところ、9 菌株が両セレンオキシアニオンを Se^0 まで還元し、20 菌株が亜セレン酸のみを還元した。一方、両オキシアニオンに対し還元能を示さない菌も 4 菌株見つかった。16S rRNA 系統解析の結果、21 種類が γ-proteobacteria、7 種類が firmicutes、3 種類が β-proteobacteria、2 種類が Actinobacteria に属すことが分かった。そのうち 10 種類の菌株に着目し、5 mM セレン酸もしくは亜セレン酸を含む TSB 培地で好気および嫌気条件下で培養した。その結果、好気・嫌気両条件下で亜セレン酸還元能を持つ菌株が 7 種類、嫌気条件下でのみ亜セレン酸還元能を持つ菌株が 2 種類存在した。次に、好気条件下で両セレンオキシアニオンを還元した *Bacillus* sp. NTP-1 株に着目し、他のオキシアニオンが本株のセレンオキシアニオン還元活性に与える影響を調べた。その結果、本株の亜セレン酸還元活性は亜硫酸ナトリウムにより嫌気的条件下でのみ阻害された。一方、本菌のセレン酸還元活性は好気・嫌気両条件下で亜硫酸ナトリウムにより阻害されることが明らかとなった。

selenate, selenite, reduction

講演番号：3C09a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ C校舎09会場

タイトル　*Aspergillus oryzae* RIB40 由来ギ酸オキシダーゼにおける Arg554 の機能
Title　The function of Arg554 in Formate Oxidase from *Aspergillus oryzae* RIB40

○若泉 杏奈[1)]、大竹 拓[1)]、沖 昌也[1)]、内田 博之[1)]、三上 文三[2)]（[1)]福井大・工、[2)]京都大・農）
○ Anna Wakaizumi[1)], Takumi Ootake[1)], Masaya Oki[1)], Hiroyuki Uchida[1)], Bunzou Mikami[2)]
([1)]Fukuidai, [2)]Kyoutodai)

【目的】*Aspergillus oryzae* RIB40 由来ギ酸オキシダーゼ（FODao）は GMC オキシドレダクターゼファミリーに属することが分った。しかし、FODao のコファクターは 8-formyl FAD であり、その周辺には GMC オキシドレダクターゼファミリーに特徴的な His-Asn 対 や His-His 対は存在せず、代わりに His-Arg 対（His511、Arg554）が存在していた。当研究では 8-formyl FAD の近傍に存在する Arg554 が FAD の 8-formyl FAD への修飾及び酵素活性発現においてどのような役割を担うのかを検討した。

【方法】活性部位に存在する Arg554 残基に変異を導入し、その変異が FAD 修飾や活性発現に及ぼす影響を調べた。

【結果】作成した変異体において、熱抽出物の可視-UV スペクトルや LC-MS 分析の結果から、Arg554Ala では FAD の 8 位修飾は起こらないことが分かった。また Arg554Lys においては、経時的に FAD の 8-formyl 化が起きていることが観察された。この結果は FAD の 8-formyl FAD への修飾が自己触媒的に起こることを示している。 FAD をコファクターとして持つ Arg554Ala は活性を示さなかった。 Arg554Lys においては 8-formyl 化が進むにつれて活性が増加した。しかし FAD の修飾が収束した後も ワイルドタイプの 1/80 の活性しかなかった。これらのことから、Arg554 は FAD の 8-formyl FAD への修飾、及び活性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Keyword1：protein,　Keyword2：oxidoreductase,　Keyword3：function

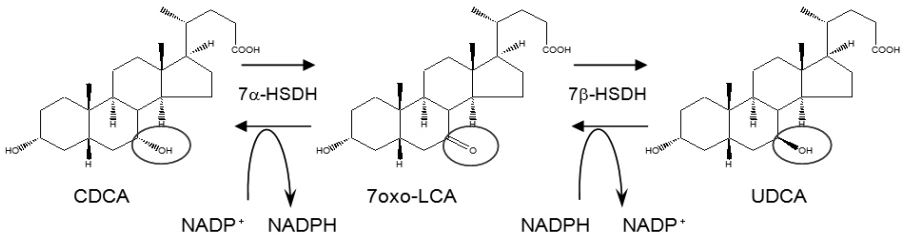
講演番号：3C09a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ C校舎09会場

新規ウルソデオキシコール酸生成腸内細菌 *Ruminococcus gnavus* N53 由来の 7β−hydroxysteroid dehydrogenase の発現と機能解析

Expression and functional analysis of 7β-hydroxysteroid dehydrogenase from novel ursodeoxycholic acid producer *Ruminococcus gnavus* N53

○李　慈英、荒井　尚志、吹谷　智、和田　大、横田　篤（北大院農・応生科）
○JaYoung Lee, Hisashi Arai, Satoru Fukiya, Masaru Wada, Atsushi Yokota (Hokkaido Univ.)

【目的】胆汁酸は、胆汁の主成分として体内に存在し、肝臓でコレステロールから生合成される。脂質の吸収に重要な役割を果たすこの胆汁酸は腸内細菌の影響を強く受け、様々な胆汁酸へと変換される。中でもウルソデオキシコール酸 (UDCA) は胆石溶解作用、大腸ガンの抑制効果などを示す有益な胆汁酸であるが、ヒトの大腸内には微量しか存在しない。UDCAはケノデオキシコール酸 (CDCA) の7位水酸基のエピマーであり、CDCAから7α−および7β-hydroxysteroid dehydrogenase (HSDH) の作用で7oxo−リトコール酸 (7oxo-LCA) を中間体として生成される。これまでに7β-HSDH活性を有する菌がUDCA生成菌として単離され、酵素が部分精製された。しかし、その遺伝子情報はまだ少ない。そこで本研究では本研究室で新規にヒト糞便から分離されたUDCA生成菌*Ruminococcus gnavus* N53の7β-HSDHをコードする遺伝子をクローニングし、*E. coli* で発現させた酵素の機能を解析した。
【方法】既知の7β-HSDHおよびshort-chain dehydrogenase/reductase superfamilyのN末端の補因子結合部位情報を用いてBLAST検索を行い、*R. gnavus* N53の推定7β-HSDH遺伝子を特定した。そのORFを用いて発現ベクターを構築し、大腸菌で発現させた。酵素はCo アフィニティカラムクロマトグラフィーによって精製し、その機能を解析した。
【結果】*R. gnavus* N53のゲノム情報はまだ無く、*R. gnavus* 基準株のゲノム情報からhypothetical protein RUMGNA_02585を7β-HSDH遺伝子と推定した。本ORFは基準株と同一のプライマーを用いてN53株でも同様に増幅された。N53株からの増幅産物をpQE30ベクターに挿入し、*E. coli* JM109で発現させた。N末端アミノ酸配列解析およびDNAシーケンスの結果、N53株由来配列は基準株RUMGNA_02585の配列と完全に一致した。本酵素はNADPH依存性で、NADPHまたは$NADP^+$存在下で7oxo-LCAとUDCAをそれぞれ還元、酸化した。しかし還元反応と酸化反応のk_{cat}/k_mがそれぞれ165と3.07だったことから、本酵素反応はUDCAを生成する反応に傾いてると考えられた。SDS-PAGE解析から本酵素の分子量は30 kDaであった。7oxo-LCAの還元はpH 6.0、UDCAの酸化はpH 10.0で最大活性を示し、至適温度は37°Cであった。反応の生成産物はTLCとHPLCによって確認した。本研究により、UDCA生成に関連する新規の株から新たな7β-HSDHおよびそれをコードする遺伝子の特性が明らかになった。



bile acid conversion, 7β-hydroxysteroid dehydrogenase, intestinal bacteria

講演番号：3C09a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ C校舎09会場

ヒト・NADPHーシトクロムP450還元酵素における R457H 変異型酵素の機能解析

Functional Analysis of R457H Mutant in Human NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase

○張　栩、深見　真紀[1]、緒方　勤[2]、本間　桂子[3]、片桐　昌直、（大教大・自然、[1]成育医療研究センター・分子内分泌、[2]浜松医大・小児、[3]慶大病院・中検）
○Ko Cho, Maki Hukami[1], Tutomu Ogata[2], Keiko Honma[3], Masanao Katagiri (Osaka Kyoiku Univ., [1]Nat. Res. Inst. Child Heal. Dev., [2]Hamamatsu Univ. Sch. Med.,[3]Keio Univ. Hosp.)

【目的】シトクロムP450オキシドレダクターゼ（POR）は、すべてのミクロソーム型シトクロムP450（CYP）に対してNADPHからの電子を伝達する酵素である。POR欠損症は、男女に共通する性分化異常やステロイド合成障害等を中核症状とする。また、R457H変異は、日本人の本欠損症における患者のほとんどが有する変異である。今回、その変異がPOR自身の機能およびCYPの機能にどう影響するのか、大腸菌での発現系を用いて検討を行ったので報告する。
【方法】PORの野生型とP457H変異型酵素を、発現用プラスミドｐCWを用いそれぞれ大腸菌で発現させ、膜画分を調製し、膜からPORを可溶化後、2’,5’-ADP アガロースカラムにより、精製を行いSDS-PAGEにおいて単一バンドを得た。これらの精製酵素を用い大腸菌膜へ再挿入し、シトクロムｃの還元活性を測定し、酵素速度論的パラメーターを決定した。さらに、ＣＹＰ17活性に対する影響を調べるため、CYP17を発現させた大腸菌膜に精製PORを再挿入し、プロゲステロン（Prog）の17α位の水酸化活性を高速液体クロマトグラフィーにより求めた。また、同様にプレグネノロン（Preg）を基質とし、ガスクロマトグラフィー質量分析により、17α位水酸化およびリアーゼ活性の代謝物の定量を行った。
【結果・考察】R4577H 変異型酵素の NADPH に対する Vmax/Km もシトクロムｃに対する Vmax/Km とも、野生型酵素の約 10 分の 1 を示した。つまり電子の入口、出口ともに低下を示し、全体として約 100 の 1 の低下となった。また、CYP17 の Por に対する 17α位の水酸化活性は、POR として R457H 変異型を用いた場合は野生型を用いた場合の約 10 分の 1 となった。さらに、CYP17 と POR の比率を変え、CYP17 活性を測定したところ、野生型、変異型酵素共に 1 対 3 までは同様に上昇したが、１対 5 では野生型は活性の飽和を示したが、一方 R457H 変異型ではさらなる上昇が見られた。これは、変異の影響を誘導により補償出来ることを示していると思われた。さらに、Preg を CYP17 の基質として用いた場合、水酸化活性の生成物である 17αOH-Preg の生成量は、POR として R457H 変異型を用いた場合、野生型を用いた場合より約４分の１に低下していた。また 17αOH-Preg がさらに CYP17 のリアーゼ活性により生成される DHEA は約６分の１に低下していた。一方、R457H 変異を有する患者の尿中ステロイドホルモン代謝物を正常範囲と比較した結果より推定される CYP 活性の低下は、5 分の 1 から最大でも 100 分の 1 程度であり、我々の得られた結果と矛盾しないことがわかり、この系の有用性が明らかとなった。そこでこの系を用い、他の CYP 活性に対する影響も検討をさらに行う予定である。

NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase, CYP17, Mutation

講演番号：3C09a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ C校舎09会場

タンパク質工学的手法によるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの基質特異性改良

Improvement of substrate specificity of fructosyl amino acid oxidase by using protein engineering method

○平尾　理恵、北林　雅夫[1]、西矢 芳昭[2]、石田　博樹[3]、秦　洋二[3]（東洋紡・敦賀バイオ研、[1]東洋紡・バイオケミカル、[2]摂南大・理工、[3]月桂冠・総合研）

○Rie Hirao, Masao Kitabayashi[1], Yoshiaki Nishiya[2], Hiroki Ishida[3], Youji Hata[3]([1]Toyobo, [2]Setsunandai, [3]Gekkeikan)

【目的】フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（FAOD）は、糖尿病検査項目の１つである Hb（ヘモグロビン）A1c 測定に使用される酵素である。HbA1c とは Hb のベータ鎖 N 末端が糖化されたものであり、Hb のベータ鎖 N 末端をプロテアーゼで切断し、遊離したフルクトシルバリルヒスチジン（F-VH）を FAOD と反応させて定量する。しかし、血液中には測定対象外のフルクトシルアミノ酸が存在し、基質特異性の高い FAOD が望まれている。特に糖化アルブミンからプロテアーゼで非特異的に切断されたフルクトシルリジン(F-K)と輸液に含まれるフルクトシルバリン(F-V)が測定値に影響を与えないことが重要である。

演者らは F-VH に反応する *Phaeoshaeria nodorum* 由来 FAOD を取得していたが、基質特異性には課題があった。そこで、本研究では、タンパク質工学的手法により FAOD の F-K/F-VH 比及び F-V/F-VH 比を低下させることを目的として検討した。

【方法】*P. nodorum* 由来 FAOD とアミノ酸配列相同性が高い FAOD のアミノ酸配列をアライメントし、基質特異性評価結果と比較することにより基質特異性に関与するアミノ酸残基を予測した。これらの残基を部位特異的変異導入によりランダムなアミノ酸に置換し、F-K/F-VH 比及び F-V/F-VH 比を評価した。

【結果】*P. nodorum* 由来 FAOD の N 末端から 58 番目の I が F-K/F-VH 比及び F-V/F-VH 比の低下に関与することが示唆された。そこで、全種類のアミノ酸に置換させた変異体を作製して評価すると、T,M,S,V,A,L に置換することにより F-K/F-VH 比及び F-V/F-VH 比が低下した。特に I58T で最も効果があり、F-K/F-VH 比は野生型が 0.1 に対し、0.0 に低下、F-V/F-VH 比は野生型が 4.9 に対し、0.5 に低下した。さらに、この I58T を用いて F-VH 測定試薬を調製し、F-VH を定量した結果、野生型と比較して F-K 及び F-V による影響の低下を確認することができた。

Fructosyl amino acid oxidase, HbA1c

講演番号：3C09a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ C校舎09会場

Rhodosporidium paludigenum VMA4の生産するバニリルマンデル酸脱水素酵素の解析と神経芽細胞腫スクリーニングへの応用

Characterization and application of vanillylmandelic acid dehydrogenase from *Rhodosporidium paludigenum* VMA4 for screening of neuroblastoma

○三井亮司、河野和也、堀内功典、藤井正[1]、福士勝[1]、田中三男（岡山理大・理、[1]札幌I.D.L）
○Ryoji Mitsui, Kazuya Kono, Isanori Horiuchi, Tadashi Fujii[1], Masaru Fukushi[1], Mitsuo Tanaka (Okayama Univ. of Sci., [1]Sapporo I.D.L)

【目的】神経芽細胞腫は白血病や脳腫瘍に次いで、また腹部悪性固形腫瘍の中では最も発症例が多い小児悪性腫瘍である。神経芽細胞腫のスクリーニングは発症によりカテコールアミンの過剰産生がみられることから、その代謝産物であるバニリルマンデル酸(VMA)などが尿中に過剰に排出されることをHPLCにて測定することにより行われる。しかし、HPLCは多検体の測定には時間がかかり、さらに尿中には食品由来のバニリンなど類似の夾雑物も多いことも問題となる。このことから尿中マーカーを短時間で精度よく簡便に検出するため微生物由来の酵素を用いた新規スクリーニング法を開発することを目的とした。
【方法および結果】土壌よりVMAを炭素源として生育する酵母*Rhodosporidium paludigenum* VMA4株を分離し、培養した菌体よりVMAの酸化を触媒するNAD$^+$依存型脱水素酵素の活性を検出した。この酵素を各種クロマトグラフィーを用いて精製し、諸性質を明らかにした。本酵素はVMAのほか、ジヒドロキシマンデル酸、*D*-マンデル酸に対して活性を示したが、*L*-マンデル酸ほか、エピネフリン、ノルエピネフリン等のアミン類に対しては活性を示さなかった。このことから本酵素は*D*体特異的なVMAデヒドロゲナーゼであることが推測された。尿中に排出されるVMAも*D*体であることが報告されており、特異性の面でも本酵素の利用は優位であると考えられる。そこで本酵素を実際の尿中VMA測定に適用可能であるか検討した。VMAの酸化に伴うNADHの生成をNBTで比色した結果においては0–1.0 mM程度で直線性が得られた。しかし、実際の検査では濾紙尿として回収するため、さらに低濃度を高感度で検出する必要がある。そこで、すでに他項目のマススクリーニングで実績のあるResazurinを用いたDiaphoraseとのカップリングにより、NADH生成量をResorufinとして蛍光定量する系に適応可能であるか検討した。その結果、1–5 μMという低濃度でも定量的な測定が可能であった。しかし、高感度の測定にはノイズを低減させるため高純度の酵素が必要となることから、大腸菌を宿主としてHisタグを付加した発現系の構築を行った。得られた酵素標品は、同程度の活性と基質特異性を示した。

vanillylmandelic acid, neuroblastoma, VMA dehydrogenase

講演番号：3C09a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ C校舎09会場

食品添加物の安全性評価への大腸菌発現ヒトP450酵素の利用

Application of human cytochrome P450 enzymes for safety assessment of food additives

○後藤 達志、森 大気、三木 悠、今石 浩正（神戸大、遺伝子）
○Tatsushi Goto, Taiki Mori, Haruka Miki, Hiromasa Imaishi (Res. Cent. Env. Gen., Kobe Univ.)

【目的】食品の品質向上や劣化の防止という目的で使用される様々な食品添加物は、年間一人あたり1キログラムほど摂取されており、現代の食生活に必要不可欠な存在である。一方で、食品添加物の利用にあたっては健康面へのリスクを可能な限り正確に評価することも重要である。化学物質によるリスクの一つにDNAの損傷に伴う遺伝毒性が挙げられる。この遺伝毒性は、生体内のシトクロムP450酵素（以下、P450）などの薬物代謝酵素群が関わる化学物質の代謝活性化が主な要因の一つと考えられる。現在、食品添加物の遺伝毒性評価にはエイムス試験やウム試験が多用されている。その際、これらの試験では主に簡便性や経済性の観点から、化学物質を代謝活性化させる目的でラット肝臓由来S9画分が用いられる。しかしながら、薬物代謝酵素の機能や生体組織での発現量はラットとヒトでは異なるため、ヒトでの遺伝毒性を正しく評価するにはヒトの薬物代謝酵素を用いる必要があった。そこで、我々はこの生物種差という問題を克服するためのアプローチとして、大腸菌で異種発現させたヒトP450酵素を食品添加物の安全性評価へと利用することを試みた。

【方法】肝臓に発現している主要P450酵素として5種類（CYP1A2、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4）を選抜した。それぞれのP450遺伝子をヒト肝臓cDNAライブラリーより単離し、発現プラスミドベクターへと挿入した。各P450発現ベクターを導入した大腸菌JM109株より、P450酵素を含む膜画分を調製し、還元型CO差スペクトル測定によりP450酵素量を定量した。次に、2-アミノアントラセン（2-AA）、アフラトキシンB1（AFB1）、ベンゾピレン（B[a]P）、N-ニトロソジメチルアミンの計4種類の変異原性物質について、従来法であるラット肝S9やヒト肝S9を用いたウム試験と同時に、P450発現大腸菌膜画分を用いたウム試験を行い、その値を比較した。さらに、用途の異なる24種の食品添加物を対象に、P450発現大腸菌膜画分を用いたウム試験を行った。

【結果】5種類の主要ヒトP450酵素について、N末端の膜結合領域を改変した組換えヒトP450酵素の大腸菌発現系の構築に成功した。4種の変異原性物質のウム試験を行ったところ、ラット肝S9によって2-AA、AFB1、B[a]Pは代謝活性化されてDNA損傷を引き起こすことが判明したが、ヒトの肝S9ではDNA損傷は見られず、生物種によって代謝活性化能が異なることが確認された。さらに、P450発現大腸菌膜画分を用いたウム試験では、2-AAによるDNA損傷がCYP1A2発現膜画分存在下でのみ増加することが示された。また、CYP3A4発現膜画分の添加によりAFB1によるDNA損傷は増加した。今回用いた中で24種の食品添加物の中で、23種の添加物はP450発現大腸菌膜画分に依存したDNA損傷を示さなかった。しかし、酸化防止剤として用いられるモリンではヒトCYP2C9によって代謝活性化されるという結果が得られた。

Cytochrome P450, food additive, mutagenicity

講演番号：3C09p01
講演日時、会場：3月24日13:49～ C校舎09会場

ピレン資化性菌*Mycobacterium* sp. H2-5株の新規複合体IIのサブユニット構成

Subunit composition of novel Complex II isolated from pyrene assimilating bacterium *Mycobacterium* sp. H2-5

○須田 裕介、桑原 悠輔、稲岡ダニエル健[1)]、北潔[1)]、峯木 茂（東理大・理工、[1)]東大・医）
○Yusuke Suda, Yusuke Kuwahara, Ken Daniel Inaoka[1)], Kiyoshi Kita[1)], Shigeru mineki (Tokyo University of Science, [1)]University of Tokyo)

【目的】
多環芳香族炭化水素（PAHs）は有機物の不完全燃焼によって生じる環境汚染物質であり、4 環以上の高分子量 PAHs は難分解性で環境中に残留しやすい。我々の研究室では、ピレンを唯一の炭素源として生育できる *Mycobacterium* sp. H2-5 株を都内の土壌より単離し、研究を進めてきた。ピレンの資化経路は、本菌株に近縁なピレン資化性菌 *M. vanbaalenii* PYR-1 株において提唱されている[1]が、本研究では、ピレン資化経路から TCA サイクルへの入り口であると考えられるコハク酸脱水素酵素(複合体 II)が、H2-5 株において特殊な性質を持つことを期待し、研究を進めている。
【方法】
細胞膜の調製：H2-5 株をピレンを唯一の炭素源とする培地で 30℃、120 rpm で約 2 週間生育させた。12,000×g、15 min で集菌し、菌体を 10 mM マロン酸を含むリン酸緩衝液に懸濁し、200 MPa でフレンチプレスで破砕した。その後、30,000×g、15 min で遠心してデブリを除去し、200,000×g、120 min で超遠心を行い、膜画分を得た。
活性測定：120 μg/ml PMS、60 μg/ml MTT、2 mM KCN を含む Tris-HCl (pH 8.0)に細胞膜試料とコハク酸を加え、還元型 MTT の生成による吸光度変化を 570 nm の波長で検出することで、細胞膜中の複合体 II の活性値を求めた。
分子量の推定：膜画分を 0.5%の C12E9 と 10 mM マロン酸を含むリン酸緩衝液に懸濁し、複合体 II を可溶化させた。これについて 200,000×g、120 min で超遠心を行い、上清を回収した。このサンプルについて Clear Native-PAGE を行い、複合体 II の分子量を推定した。
サブユニット構成の確認：Clear Native-PAGE 後のゲルについて SDH 活性染色を行い、活性を確認したバンドを切り出した。このバンドの SDS-PAGE を行い、サブユニット構成を検討した。
【結果】
活性測定の結果、H2-5 株の複合体 II を含む膜画分を、活性を維持した状態で抽出することができた。Clear Native-PAGE の結果より、H2-5 株の複合体 II は約 340 kDa であり、通常の生物が持つ複合体 II の約 130 kDa よりも遥かに大きいことがわかった。また、このバンドを SDS-PAGE に掛けると少なくとも 6 本のバンドが見られ、通常の複合体 II の 4 つよりも多いサブユニットで構成されていると考えられた。
[1] Kim *et al. Biodegradation* 19, 859–881 (2008)

polycyclic aromatic hydrocarbon, complex II, *Mycobacterium*

講演番号：3C09p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ C校舎09会場

好酸好熱性古細菌スルホロバス-トコダイ由来2-オキソ酸：フェレドキシン酸化還元酵素の鉄硫黄クラスター

Iron-sulfur cluster in 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase from *Sulfolobus tokodaii,* a thermoacidophilic archaeon

○イェン　チェン、伏信　進矢、若木　高善（東京大学・院農生科）
○Zhen Yan, Shinya Fushinobu, Takayoshi Wakagi (University of Tokyo, Department of Biotechnology)

2-Oxoacid:ferredoxin oxidoreductase (OFOR), catalyzes CoA-dependent oxidative decarboxylation of 2-oxoacid such as pyruvate and 2-oxoglutarate, forming acyl-CoA. The proposed mechanism of this reaction is complicated because thiamine pyrophosphate and three [Fe_4-S_4] clusters participate in transporting two electrons from 2-oxoacid to external ferredoxin. OFOR from *Sulfolobus tokodaii* is the smallest one among OFORs, which is a heterodimer comprising two subunits (70 and 35 kDa) and only one [Fe_4-S_4] cluster. So the archaeal enzyme is an outstanding model for redox study of OFOR.

To investigate the role of iron-sulfur cluster, various mutants were constructed by replacing Fe-ligating Cys with Ala, which is C12A, C15A, C47A, C197A, and C12/15A. The mutants were characterized in terms of metal content and enzyme activities for CoA dependent oxidative decarboxylations of pyruvate forming acetyl CoA, as well as decarboxylation of pyruvate forming acetaldehyde.

Each mutant exhibited similar dimeric structure as that of the wild-type enzyme. The absorbance ratios of A_{410nm}/A_{280nm} were 100%, 90%, 49%, 47%, 41% and 28% for wild type, C197A, C47A, C15A, C12A and C12/15A enzymes, respectively. The relative specific activities were 100%, 8%, 2.2%, 1.9%, 0.8% and 0.33% for wild type, C197A, C47A, C12A, C15A and C12/15A enzymes, respectively. These suggest intact FeS cluster is essential for full activity. Even when single Cys was replaced, FeS cluster was partially destructed and the enzyme activity was decreased. When double Cys were replaced, the enzyme lost most of the activity as well as the FeS cluster.

archaea, oxidoreductase, iron-sulfur cluster

講演番号：3C09p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ C校舎09会場

嫌気性アンモニア酸化（anammox）菌由来の銅型亜硝酸還元酵素の性質

Characterization of nitrite reductase from an anaerobic ammonium oxidizing bacterium strain KSU-1

○大久保 寛幹[1]、木戸　理保子[1]、平 大輔[1]、古川 憲治[2]、藤井 隆夫[1]（[1]崇城大・応生命、[2]熊大院・自然科学）

○Hiroki Okubo[1], Rihoko Kido[1], Daisuke Hira[1], Kenji Furukawa[2], Takao Fujii[1] ([1]Dep. Appl. Life Sci., Sojo Univ. [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Kumamoto Univ.)

【目的】1995年にある種の細菌が「嫌気的アンモニア酸化（anaerobic ammonium oxidation：anammox)」を行うことが発見された。anammoxでは、亜硝酸イオンが電子受容体となり、アンモニアが嫌気的に酸化され窒素ガスが生じる。そのため種々の排水中のアンモニアの革新的な除去法として注目され、anammox菌の排水処理への応用研究が盛んに行われている。反応過程については、ヘム型亜硝酸還元酵素（cd_1-NIR）により亜硝酸イオンが１電子還元され一酸化窒素が生成し、ヒドラジン合成酵素により一酸化窒素とアンモニアからヒドラジンが合成され、ヒドラジン酸化酵素（HZO）によりヒドラジンから窒素ガスが生じるという機構がヨーロッパのグループから提唱されている。しかし、HZO以外の酵素は未同定であり、中間体の同定を含め機構の詳細は未解明である。最近、我々はanammox菌KSU-1株のゲノム中にcd_1-NIRの遺伝子がなく、別に銅型亜硝酸還元酵素（Cu-NIR）遺伝子があることを見出した。そこで本研究では、反応機構の検証を目的とし、KSU-1株のCu-NIRを大腸菌により発現し、その性質を明らかにした。
【方法】KSU-1株のCu-NIR遺伝子をpET-28aに組み込んだ発現用プラスミドを作製し、大腸菌BL21(DE3)を形質転換することで、Cu-NIRの発現を行った。発現させたCu-NIRはカラムクロマトグラフィにより精製し、硫酸銅水溶液に透析することで銅中心の構築を行った後、Cu-NIR精製試料とした。この試料について、UV-vis・EPRスペクトル測定、ベンジルビオロゲンラジカルを電子供与体として用いた亜硝酸還元活性測定を行った。
【結果】発現したCu-NIRはCo-アフィニティカラムにより高度に精製された。分光学的測定により、既知の酵素に類似するタイプ1銅中心とタイプ2銅中心の構築が確認された。また、亜硝酸還元活性測定により、KSU-1株のCu-NIRは既知の酵素に匹敵する活性値を有することが明らかとなった。これらの結果より、KSU-1株のanammox反応過程においては、Cu-NIRが亜硝酸イオンの還元を担うことが示された。一般的に、脱窒菌のNIRにはヘム型と銅型の2種類が存在することが知られてきたが、anammox菌の属種により両者のどちらが機能するか、違いがあると推定された。

anammox, nitrite reductase, denitrification

講演番号：3C09p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎09会場

アルブチン・ゲンチジン酸の酸化的縮合物の分光学的性質

Spectroscopic properties of the glucoside derived from arbutin and gentisate

○木曽太郎、桐生高明、村上　洋、中野博文（阪市工研）
○Taro Kiso, Takaaki Kiryu, Hiromi Murakami, Hirofumi Nakano (OMTRI)

【目的】ペルオキシダーゼの酸化反応により、フェノール性化合物が重合することが知られている。我々は、フェノール性配糖体とゲンチジン酸との共重合にこの反応を利用し、チロシナーゼ阻害活性の強い新しい配糖体を合成した。この新規配糖体について、分光学的性質を調べた。
【方法と結果】アルブチンとゲンチジン酸ナトリウムを混合し、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼを添加した。この混合液に少量の過酸化水素を逐次的に加え、酸性にして放置することにより、新規配糖体を黄色の沈殿として得た。この化合物については質量分析やNMRによって解析し、アルブチンとゲンチジン酸が１：１で酸化的に縮合した構造であることが判明した。この配糖体はマッシュルームのチロシナーゼの活性を強く阻害した。この配糖体の吸収スペクトルは370nm付近に幅の広い吸収があるため、400nmより長い波長に裾を引いていることから着色していることが分かった。また、アグリコンについて蛍光スペクトルを測定したところ、450nm付近に発光の極大が認められるが、420nm付近と320nm付近の2つの波長領域で励起が起こることが判明した。さらに、沈殿として生成する以前の状態ではESRによるシグナルが認められ、生成に関してラジカルが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Peroxidase, Arbutin, Gentisate

講演番号:3C09p05
講演日時、会場:3月24日14:33～ C校舎09会場

Mycobacterium sp. H2-5による多環芳香族炭化水素分解に関わる初発酸化酵素の基質特異性

Substrate Specificities of PAHs Dioxygenases from *Mycobacterium* sp. H2-5

○都築　周作、中川　準、清水　悠子、土田　健人、後藤　純雄[1]、峯木　茂　（東理大院・応生科、[1]麻布大・環境科）

○Syusaku Tsuzuki, Jun Nakagawa, Yuko Shimizu, Kento Tsuchida, Sumio Goto[1], Shigeru Mineki (Tokyo University of Science, [1]Azabu University)

【目的】　多環芳香族炭化水素（Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAHs）は原油や重油に含まれるほか、有機物の不完全燃焼などで容易に生成するため、環境中に放出され続けている。PAHsとその誘導体の中には変異原性や発がん性を有する物が多く、難水溶性で環境中に残留しやすいことから、その浄化処理が必須の課題である。

Mycobacterium sp. H2-5は当研究室で単離された細菌で、ピレンを唯一の炭素源として生育することができ、バイオレメディエーションへの応用が期待できる。この株は様々なPAHsを分解するが、基質によって分解能に差があり、その差はPAHs分解の初発酸化酵素の基質特異性が影響していると考えている。そこで本酵素を大腸菌で発現させて、基質特異性を明らかにすることを目的とした。

【方法】　*Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1株では初発酸化酵素をコードする遺伝子としてαサブユニットの*nidA*、βサブユニットの*nidB*、同じく*nidA3*、*nidB3*、また電子伝達にかかわる遺伝子*phtAc*、*phtAd*が同定されているが、H2-5株もこれらの遺伝子を保持しており、これら*nidAB*と*nidA3B3*がどのような基質特異性を示すのか検証する実験系を大腸菌で構築した。構築には共発現ベクターであるpETDuet-1とpCOLADuet-1（Novagen社）を用いて*nidAB*pETDuet-1、*nidA3B3*pETDuet-1、*phtAcAd*pCOLADuet-1をそれぞれ作製し、その後発現用大腸菌Tuner(DE3)(Novagen社)にこれらを導入し、*nidABphtAcAd*系、*nidA3B3phtAcAd*系とした。

これらの大腸菌を発現誘導後、M9-glucose最少培地を用いて菌体を懸濁して、各種PAH（ピレン、フェナントレン、アントラセン）をそれぞれ終濃度200μMになるように添加し、30℃、12～16時間で反応させ、ジクロロメタン抽出後、PAH残存量と生成物をGC/MS（島津GCMS-QP2010）で分析した。

【結果】　*nidABphtAcAd*系と*nidA3B3phtAcAd*系に各種PAHをそれぞれ添加したところ、全てにおいてその反応産物である*cis*-ジヒドロジオール体がGC/MSで検出され、ジオキシゲナーゼ活性が確認された。また*nidABphtAcAd*系においてピレンが約35%、アントラセンが約17%減少し、有意な差が認められた。他の基質についても報告する予定である。

PAHs, *Mycobacterium*, dioxygenase

講演番号:3C09p06
講演日時、会場:3月24日14:44～ C校舎09会場

タイトル：高感度信号累積型ISFETバイオセンサー（AMIS センサー）および生理活性測定装置（AMIS）を用いたガラクトース、ラクトースの簡便定量

Title　：Simple and convenient measurement of galactose and lactose by high sensitive signal accumulation ISFET biosensor (AMIS sensor) and micro bioactivity analyzer (AMIS).

○佐々木　康孝、谷　敏夫、小川 順[1]（バイオエックス（株）、[1]京大院農・応用生命）

○Yasutaka Sasaki, Toshio Tani, Jun Ogawa[1] (Bio-X Inc., [1]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】高感度信号累積型ISFETバイオセンサー(AMIS センサー)および生理活性測定装置(AMIS)を用いたガラクトース、ラクトースの微量分析について検討した。

【方法】ガラクトースおよび、ラクトースにβ-ガラクトシダーゼを作用させることで生成するガラクトースに対するガラクトースデヒドロゲナーゼの酵素活性をAMIS センサー、生理活性測定装置（AMIS）を用いて測定することで、低濃度ガラクトースおよびラクトースの定量を行った。

【結果】ガラクトースデヒドロゲナーゼ、補酵素（NAD^+）とガラクトースをセル内で混合することで、25 ppm までのガラクトースの定量が可能であることが明らかとなった。また、ラクトースを基質とした場合には、β-ガラクトシダーゼを作用させることでラクトースをガラクトースとグルコースに分解し、生成したガラクトースをガラクトースデヒドロゲナーゼおよび補酵素（NAD^+）を用いて定量測定を行った。測定の結果、ラクトースについても25 ppm までのAMIS センサー、生理活性測定装置（AMIS）を用いた迅速かつ簡便な定量が可能であることが明らかとなった。

Keyword1: Lactose, Keyword2: Galactose, Keyword3: ISFET

講演番号：3C09p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎09会場

膜結合酸化還元酵素の可溶性変異体の発現とそれを用いた電子伝達メカニズムの解明

Expression of soluble form of membrane bound redox enzyme and mechanism study of electron transfer

○河井 翔太、薬師 寿治[1]、松下 一信[1]、白井 理、加納 健司（京大院・農、[1]山大院・農）
○Shota Kawai, Toshiharu Yakushi[1], Kazunobu Matsushita[1], Osamu Shirai, Kenji Kano (Kyoto Univ., [1]Yamaguchi Univ.)

【目的】

酢酸菌由来の膜結合酸化還元酵素の中には電子受容体として電極を利用できる酵素がいくつか報告されている。このような反応は直接電子移動（DET）反応と呼ばれ、次世代バイオセンサやバイオ燃料電池への応用が期待されている。しかし、そのDET反応の詳細なメカニズムは未だに不明である。また、膜結合酸化還元酵素の菌体内電子移動の詳細も不明な点が多い。本研究ではフルクトース脱水素酵素（FDH）に着目した。FDHはFADおよびヘム*c*を有するヘテロトリマーの膜結合酸化還元酵素であり、他の膜酵素に比べDET反応性が非常に高い。FDHはヘム*c*含有サブユニットを介して膜に結合していると考えられているため、これを欠損させたΔ*c*FDHの発現系を構築し、菌体における膜内への電子伝達やDET反応機構を電気化学的にさぐることを目的とした。

【方法】

FDHをクローニングし、fusion PCRによってΔ*c*FDHの発現系を構築した。酵素濃度、活性はそれぞれFAD由来の吸光度、Prussian blueによる吸光度変化より求めた。電気化学測定には作用電極としてグラッシーカーボン電極、参照電極として銀/塩化銀、対極として白金を用い、McIlvain緩衝液中にて掃引速度5 mVs^{-1}で行った。また、FDHの細胞膜上での電子伝達反応は、菌体を用いた酸素消費速度により解析した。

【結果・考察】

DNA配列よりNative型は開始コドンがTTGである可能性が示唆されたため、これをATGとした改変型Δ*c*FDHも作成したところ、どちらも可溶性画分に酵素活性を有する変異体の発現に成功した。ATGへの改変は比活性の大幅な上昇をもたらした。タンパク質発現の増加をもたらしたと推測した。

Δ*c*FDHを精製し、サイクリックボルタンメトリーを行ったところ、Δ*c*FDHのDET反応は観察されなかった。この知見は、DET反応に及ぼすヘム *c* 含有サブユニットの重要性を初めて明らかにしたもので、今後のDET反応研究の道を開くものである。

酸素電極を用い、フルクトースを基質として酸素消費量を測定したところ、FDHを発現させた菌体では速い酸素消費がみられたのに対し、Δ*c*FDH発現菌体では酸素呼吸活性がみられなかった。このような結果となった理由としては、可溶性Δ*c*FDHの存在領域の問題と、Δ*c*FDHのFADとユビキノンの反応性の問題が考えられる。現在、精製したΔ*c*FDHとキノン類とのバルク内での反応性を電気化学的に測定することでそれらについて明らかにしている。

Fructose dehydrogenase, Direct electron transfer , *Gluconobacter*

講演番号：3C09p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎09会場

クラスIII型carbazole 1,9a-dioxygenaseにおけるferredoxin-terminal oxygenase間の結合解離メカニズムの解明

Association and dissociation mechanism between ferredoxin and terminal oxygenase components of class III carbazole 1,9a-dioxygenase

○松澤 淳、梅田 隆志、相川 大樹、藤本 瑞[1]、山根 久和、野尻 秀昭（東大生物工学セ、[1]農生資研）

○Jun Matsuzawa, Takashi Umeda, Hiroki Aikawa, Zui Fujimoto[1], Hisakazu Yamane, Hideaki Nojiri (Biothechnology Research Center, The University of Tokyo, [1]National institute of agrobiological sciences)

【目的】細菌のcarbazole代謝の初発酸化酵素であるcarbazole 1,9a-dioxygenaseはterminal oxygenase (Oxy)、ferredoxin (Fd)、ferredoxin reductaseの3つのコンポーネントから構成される（図1)。これまでFdとOxyの間の電子伝達機構を詳細に解明するため、酸化型Oxy:酸化型Fd複合体、還元型Oxy:酸化型Fd複合体の結晶構造が明らかにされ、これらの構造の比較からOxyのR118とR210がFdのGlu残基との水素結合形成をとおして複合体形成時に重要である可能性が示唆された(図2)。本研究ではこれら2つのArg残基の重要性を生化学的に証明することを目的とした。

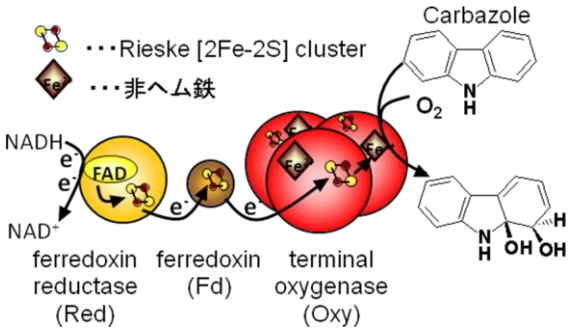


図 1.　クラス III 型 CARDO の構成と酸化反応

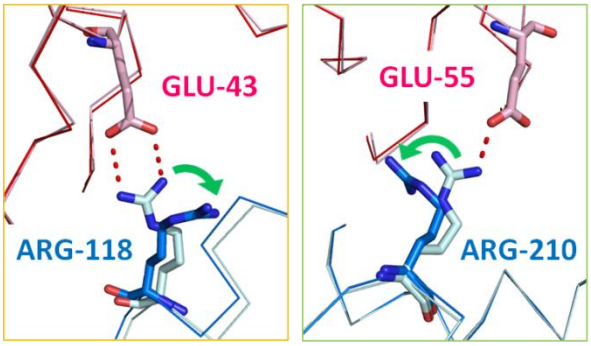


図 2.　電子伝達に伴う Oxy の構造変化

【方法】これら2つのArg残基の片方もしくは両方をAlaに置換したアミノ酸置換タンパク質を作製し、再構成系によるcarbazole変換活性、Oxyの還元に伴う吸光度変化を指標とした電子伝達速度、等温滴定型カロリメータ（ITC)で測定される結合定数の3つから野生型タンパク質との活性の比較を行った。

【結果】Carbazoleの変換活性の比較を行った結果、野生型タンパク質と比較して活性がR118Aは約20%、R210Aは約50%、R118A/R210Aは約10%に低下していた。電子伝達速度を比較したところ、R118A、R210Aは野生型タンパク質と大きな違いはなかったが、R118A/R210Aは活性が約50%に低下していた。現在ITCを用いた結合定数の測定から変異導入の影響を調べており、その結果もあわせて総合的に考察した結果を報告する。

Rieske oxygenase, electron transfer, itc

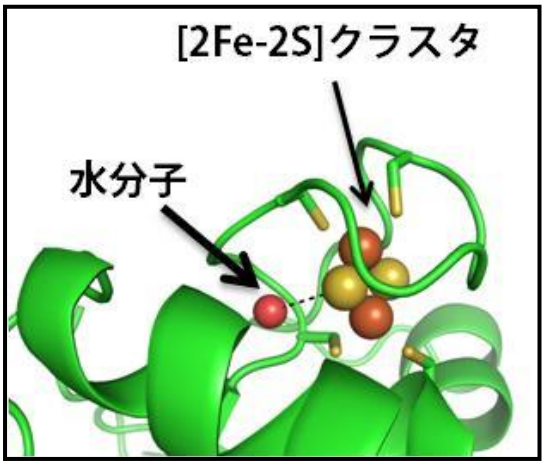
講演番号：3C09p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎09会場

Novosphingobium sp. KA1株由来フェレドキシンが高い酸化還元電位を持つ原因の解明

Structural basis of extremely high redox potential of ferredoxin from *Novosphingobium* sp. KA1

○梅田 隆志、安保 充[1]、山根 久和、野尻 秀昭（東大・生物工学セ、[1]東大院・農生科・応生化）
○Takashi Umeda, Mitsuru Abo[1], Hisakazu Yamane, Hideaki Nojiri (BRC, The Univ. of Tokyo, [1]GSALS, The Univ. of Tokyo)

【目的】[2Fe-2S]クラスタを補欠分子族として有するフェレドキシン(Fd)は、[2Fe-2S]クラスタが2つのHis残基と2つのCys残基により配位されるものと、4つのCys残基で配位されるものの二種類が存在する。とりわけ、酸化酵素に電子を供給するFdにおいては前者がproteo-type Fd、後者がRieske-type Fdと呼ばれ、それらの酸化還元電位はそれぞれ、おおよそ-250 mV、-150 mVの値をとることが知られている。Rieske-type FdはHis残基のプロトン化状態の違いにより、pH依存的に酸化還元電位が変化することが知られているが、proteo-type FdはHis残基で配位していないため、酸化還元電位はpHに依存しないことが明らかとなっている。



当研究室で単離された、carbazole (CAR)資化菌 *Novosphingobium* sp. KA1株はCAR代謝の初発酸化酵素としてcarbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO)をもつ。CARDOは酸化酵素の他に電子伝達系としてFdとFd reductaseの三つのコンポーネントから構成される。KA1株由来CARDOのFdはproteo-type Fdに属するが、その酸化還元電位は+107 mVと既知のproteo-type Fdと比べて約300 mV以上高い値を示した。また、結晶構造解析を行ったところ、[2Fe-2S]クラスタ近傍に水分子が存在すること、また、水分子の存在により、[2Fe-2S]クラスタ周辺の水素結合ネットワークが既知のproteo-type Fdと異なる事が明らかとなっている（図）。この水分子は[2Fe-2S]クラスタと水素結合を形成しており（図破線）、これが、水素結合ネットワークの変化と共にKA1株由来Fdの高い酸化還元電位の要因である可能性が示唆された。本研究では、水のプロトン化状態の異なる条件としてpHを様々に変化させた条件、及び水素結合ネットワークに関与するアミノ酸（Thr51、Glu90)の部位特異的置換体での酸化還元電位の測定を行う事で、KA1株由来Fdの高い酸化還元電位の要因を解明することを目的とした。

【方法と結果】KA1株由来Fdの酸化還元電位をpH7からpH9まで変化させて測定した。Thr51、Glu90のAla置換体の測定を行った。他のproteo-type Fdとは異なり、KA1株由来Fdの酸化還元電位はpHが1上昇すると、約60 mV低下した。現在、pHの範囲を広げた測定、及び他のアミノ酸の置換体の酸化還元電位の測定を行っており、その結果も併せて報告する。

ferredoxin, redox potential, carbazole 1,9a-dioxygenase

講演番号：3C09p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎09会場

嫌気性アンモニア酸化（anammox）菌由来NaxLS複合体の結晶構造

Crystal structure of NaxLS complex from an anaerobic ammonium oxidizing bacterium strain KSU-1

○平 大輔、中村照也[1]、山縣ゆり子[1]、古川 憲治[2]、藤井 隆夫（[1]崇城大・応生命、[1]熊大院・薬、[2]熊大院・自然科学）

○Daisuke Hira, Teruya Nakamura[1], Yuriko Yamagata[1], Kenji Furukawa[2], Takao Fujii ([1]Dep. Appl. Life Sci., Sojo Univ. [1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kumamoto Univ. [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Kumamoto Univ.)

【目的】1995年にある種の細菌が「嫌気的アンモニア酸化（anaerobic ammonium oxidation：anammox)」を行うことが発見された。anammoxでは、亜硝酸イオンが電子受容体となり、アンモニアが嫌気的に酸化され窒素ガスが生じる。そのため種々の排水中のアンモニアの革新的な除去法として注目され、anammox菌の排水処理への応用研究が盛んに行われている。一方、その反応過程においてはヒドラジンが中間体となることが明らかとなっているが、anammox反応機構の全容解明には至っていない。そこで我々はanammox菌KSU-1株より、反応に関わると考えられる*c*型ヘムタンパク質を網羅的に精製し、それらをキャラクタリゼーションするとともに、X線結晶構造解析による立体構造解明に取り組んでいる。最近、大・小２つのサブユニットから成る、anammox菌に特有で新奇な25 kDaのヘテロ２量体シトクロム*c*（NaxLSと命名）を精製し、-400 mV以下の低い酸化還元電位を有することなど、その性質を明らかとした。本研究では、NaxLSの立体構造解明を目的とし、X線結晶構造解析を行った。

【方法】精製したNaxLSを試料とし、蒸気拡散法により結晶化を行った。単結晶を用いてSPring-8で回折データ収集を行い、Fe-SAD 法にて立体構造を決定した。

【結果】得られた立体構造から、NaxLSの大サブユニット（NaxL）と小サブユニット（NaxS）はそれぞれClass II、Class Iのシトクロム*c*に類似する３次構造を形成していることが明らかとなった。また、NaxL、NaxSともに１つの*c*型ヘムを有し、そのヘム鉄はHisとCysにより配位されていた。NaxLSの低い酸化還元電位は、このHis/Cys配位が大きな要因となっていると考えられた。さらに、両サブユニットの相互作用によるBuried Surface Areaは約2000 Å^{2}であり、強固な2量体形成の構造的要因が明らかとなった。

anammox, cytochrome c, crystal structure

講演番号:3C09p11
講演日時、会場:3月24日15:49～ C校舎09会場

Rhizobium sp. strain MTP-10005由来フラビン還元酵素のX線結晶構造解析

Crystal structure of flavin reductase from *Rhizobium* sp. strain MTP-10005

○山内 貴恵[1,2]、藤井 知実[2]、吉田 雅博[3]、老川 典夫[3]、畑 安雄[2,1]（[1]京大・生存基盤、[2]京大･化研、[3]関大･化学生命工）

○Takae Yamauchi[1,2], Tomomi Fujii[2], Masahiro Yoshida[3], Tadao Oikawa[3], Yasuo Hata[1,2] ([1]ISS, Kyoto Univ. [2]ICR, Kyoto Univ. [3]Fac. Chem. Mater. and Bioeng. Kansai Univ.)

【目的】*Rhizobium* MTP-10005株由来のレゾルシノール水酸化酵素は、オキシゲナーゼコンポーネント（GraA）と、リダクターゼコンポーネント（GraD）の二成分から構成されている。GraDはFADを補酵素とし、NADHを用いて遊離のFADを還元するフラビン還元酵素であり、その反応はPing-pong bi－bi機構により進行することが知られている。GraDにより還元されたFADは、GraAがレゾルシノールをヒドロキシキノールへと酸化する際に利用される。本研究では、GraDの基質認識機構を解明することを目的に結晶構造解析を行った。

【方法】結晶化は、20℃で13 - 14% (w/v) PEG2000、6 - 9% (v/v) 2-Propanolを沈殿剤溶液とするSitting drop蒸気拡散法で行い、補酵素FAD存在下で正方両錐形の黄色い結晶を得た。高エネルギー加速器研究機構でX線回折実験を行い、分子置換法により分解能1.8Åの結晶構造を決定した。($R = 0.161$, $R_{free} = 0.192$)

【結果】GraDは結晶内で二量体を形成しており、A鎖、B鎖の両方にそれぞれ１分子のFADが結合していた。A鎖ではN末端からC末端までほぼ明瞭に電子密度が観察できたのに対し、B鎖ではFADと相互作用しているN末端14残基の電子密度が不明瞭であった。さらに、基質であるNADHをソーキングしたFAD-GraD複合体結晶のX線回折データを取得し、分解能1.8Åの構造を決定したところ、B鎖に結合したFAD近傍にNADHと考えられる電子密度が確認された。

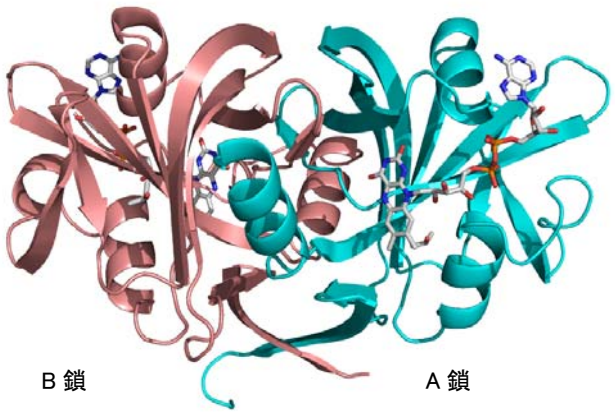


図１． GraD の二量体分子の構造

flavin, reductase, protein crystallography

講演番号：3C09p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ C校舎09会場

新規イソニトリルヒドラターゼの機能解析

Analysis of the novel type of isonitrile hydratase

○佐藤 太祐、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Hiroyoshi Sato, Yoshiteru Hashimoto, Michihiko Kobayashi (Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

【目的】イソニトリルはイソシアノ基を有する化合物の総称で、抗生物質活性を示すものが多く知られており、一方で、その反応性の高さから有機合成の分野でも注目されている。イソニトリルは土壌から海洋まで広く見受けられ、本化合物の代謝酵素として、*N*-置換ホルムアミドに変換するイソニトリルヒドラターゼ(INHase)が報告されている[1),2)]。しかしながら本酵素の報告は極く僅かで、イソニトリル分解酵素に関するさらなる知見が求められることから、今回、新たに取得したイソニトリルヒドラターゼの機能に関して報告する。
【方法】放線菌の一種*Arthrobater pascens* F164株から取得した新規INHaseの諸性質を解明するとともに、各種変異体を作成し、活性残基の検討を行った。
【結果】F164株INHaseは、1例目のN19-2株INHaseとの比較から、その構造が異なることが示唆された。また本酵素遺伝子の解析により、アミノ酸配列において両者は相同性を全く示さないことが判明した。従って、F164株INHaseはこれまで報告されたものとは異なる新たなタイプのイソニトリルヒドラターゼであることが明らとなった。一方で、諸性質の検討から本酵素はいくつかのニトリルに対してニトリラーゼ活性を示すことが明らかとなり、N19-2株INHaseとは異なる活性中心、反応機構を有することが示唆された。イソニトリルヒドラターゼ／ニトリラーゼの両活性を触媒する、本酵素の特徴的な反応機構を解明するため、変異体を作成し、活性に重要なアミノ酸残基を同定した。

1) *JBC*, **276**, 23480-23485 (2001), 2) *JBC*, **277**, 45860-45865 (2002)

isonitrile hydratase, isonitrile, *N*-substituted formamide

講演番号：3C09p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎09会場

ニトリル合成酵素の変異体構築および諸性質の解析

Mutational analysis of nitrile-synthesizing enzyme

○野村 純平、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大生命環境）
○Junpei Nomura, Yoshiteru Hashimoto, Michihiko Kobayashi (Grad. Sch. Life and Environ. Sci., The University of Tsukuba)

[背景]

我々は、バイオコンバージョンによる農薬中間体生産に用いられている *Pseudomonas chlororaphis* B23 株のニトリル（R-C≡N)代謝に関わる研究の一環として、アルドキシム(R-CH=NOH)を脱水しニトリルを合成する酵素、アルドキシムデヒドラターゼ(OxdA)を解析している。OxdA の反応機構は非常に興味深く、以下のような特徴がある。（i）水溶液中での脱水反応を触媒する （ii）脱水反応に疎水的なヘムポケットを利用している （iii）CN 三重結合を形成する （iv）他のヘム酵素（例えばペルオキシダーゼなど）とは異なり、ヘム鉄に直接基質が結合する*。

[目的]

近年、*Rhodococcus* sp. N-771 株が持つアルドキシムデヒドラターゼのホモログ（OxdA とアミノ酸レベルで 77%）である OxdRE の結晶構造が解析された**。その結晶構造から、本来困難な水溶液中での脱水反応を、疎水的なヘムポケット環境が促進していることは示唆されたが、反応機構の詳細は依然として未解明なままであった。今回、我々は OxdRE の立体構造及び変異体解析結果を基に、OxdA でも変異体を構築し、その性質の詳細な解析を行うことで反応機構の解明を目標とした。

[実験内容]

まず、OxdRE の結晶構造情報を基に反応機構に関与する可能性のある OxdA のアミノ酸残基を推定、選択した。該当するアミノ酸のみをアラニンに変異させた各 OxdA 変異の発現プラスミドを、PCR を用いた部位特異的変異導入法により各々作成し、大腸菌を宿主として大量発現を行った。その後、各種クロマトグラフィーを用いて各変異酵素を精製し、最終的に SDS-PAGE 上で単一バンドとなる精製標品を得た。各変異酵素と野生型 OxdA の CD スペクトル解析を行い、その二次構造やα-ヘリックス含量などの性質に影響が生じていないかどうかを確認した。次に、野生型 OxdA の最適基質であるブチルアルドキシムを用いて、各変異酵素の活性測定を行い、野生型酵素と比較し、反応機構に関与していると考えられるアミノ酸について推定した。

* JBC, **278**, 29600 [2003]; JBC, **279**, 47619 [2004]; PNAS, **103**, 564 [2006]

** JBC, **284**, 32089 [2009]

aldoxime dehydratase, nitrile, heme protein

講演番号：3C09p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎09会場

アクリルアミド工業生産酵素の翻訳後成熟化機構モデル

Proposed mechanism of the unique post-translational activation of nitrile hydratase used in the industrial acrylamide production

○鷲澤結実、崔天蔚、周哲敏、橋本義輝、小林達彦（筑波大院・生命環境）
○Yumi Washizawa, Tianwei Cui, Zhemin Zhou, Yoshiteru Hashimoto, and Michihiko Kobayashi (Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba)

【背景】*Rhodococcus rhodochrous* J1菌の持つ高分子量型と低分子量型の二種のニトリルヒドラターゼ(H-NHase、L-NHase)は、どちらもα，βの２種のサブユニットから構成され、コバルト(Co)イオンを活性中心に含む金属酵素である。αサブユニット中のCoに配位結合するアミノ酸残基の内、一部のシステイン残基は翻訳後酸化修飾を受けている。L-NHaseの生成機構を解明する過程で、アポ酵素のαサブユニットが直接翻訳後修飾を受けるのではなく、翻訳後修飾を受けたαサブユニットと置換されることでホロ酵素になる現象を初めて発見し、self-subunit swappingと命名した。Self-subunit swappingでは、まず本酵素の構造遺伝子下流に位置する*nhlE*遺伝子由来のタンパク質eが、L-NHaseのαサブユニットと複合体αe_2を形成する。続いて、本複合体上でαサブユニットは翻訳後修飾を受けて、アポ酵素の活性化能を有するホロαe_2複合体(L-NHaseのホロαサブユニットを含)となり、ホロαe_2とアポ酵素間でαサブユニットの置換が起こることで、アポ酵素からホロ酵素が生成される。
【方法・結果】H-NHaseもL-NHaseと同様に、構造遺伝子下流に位置する*nhhG*遺伝子由来のタンパク質gが、H-NHaseのαサブユニットと複合体αg_2を形成し、self-subunit swapping機構によりアポ酵素の翻訳後活性化が起こることを実証した。さらに、動的光散乱法によりself-subunit swapping中の反応液中の粒子径を測定した結果、アポ酵素より大きい粒子がself-subunit swapping中に確認されたことより、本粒子を、H-NHaseアポ酵素とホロαg_2複合体からなる中間複合体と推測した。この中間複合体は幅広い粒子径分布を示すことから、様々な大きさの中間複合体が存在すると示唆された。これらの結果およびタンパク質gとeの性質を考慮し、self-subunit swappingによる翻訳後成熟化機構モデルを提唱する。

nitrile hydratase、post-translational modification、intermediate

講演番号：3C09p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎09会場

タイトル　結核菌由来ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの機能解析とピラジン酸による抗結核菌活性との関連性

Title Molecular characterization of nicotinate phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and its relevance to antimycobacterial activity of pyrazinoic acid

○森　茂太郎、柴山　恵吾、荒川　宜親[1]（国立感染研・細菌二、[1]名大院・医）

○Shigetarou Mori, Keigo Shibayama, Yoshichika Arakawa[1] (Dep. Bacteriology II, NIID、[1]Grad. Sch. Med., Nagoya Univ.)

【背景】ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼはニコチン酸を基質としてニコチン酸モノヌクレオチドを生成する酵素であり、NADの生合成に関わる重要な酵素である。しかしながら、結核菌由来ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ（Rv1330c）の詳細な機能解析はこれまで行われてこなかった。一方、抗結核薬であるピラジナミドは菌体内でピラジン酸に代謝された後、酸性条件下で抗菌活性を示すことが知られている。このピラジン酸はニコチン酸の構造類縁体であることから、Rv1330cはピラジン酸による抗結核菌活性との関連性が推測されていたものの、その詳細については不明のままであった。そこで本研究では、Rv1330cの酵素学的機能を明らかにするとともに、ピラジン酸の抗結核菌活性との関連性について詳細な検討を行った。

【結果と考察】Rv1330cを大腸菌内で大量発現させて、SDS-PAGE上で単一バンドになるまで精製を行った後、HPLCを用いてその活性を測定した。その結果、Rv1330cの至適温度と至適pHはそれぞれ40℃と6.5であり、結核菌が通常生育する環境条件とほぼ同じであった。また、Rv1330cの活性発現には2価の金属イオンが必須であり、特にマンガン存在下での活性が高かった。一方、Rv1330cはニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ活性以外にATP加水分解活性も示し、活性発現にATPは必須ではないが、ATP存在下で効率的な活性を示した。例えば、基質であるニコチン酸に対するK_{cat}/K_m値（$M^{-1}s^{-1}$）を比較すると、ATP存在下では$1.1x10^3$であったのに対してATP非存在下では$0.04x10^3$であった。従って、Rv1330cはATP加水分解エネルギーを利用して効率的な触媒反応を行っていることが示唆された。

Rv1330cはニコチン酸を基質として利用したが、構造類縁体であるピラジン酸は基質として利用できなかった。一方、ピラジン酸による阻害活性を調べたところ、中性条件下（pH7.0）ではRv1330cの活性をほとんど阻害しなかったが、酸性条件下（pH5.4）ではRv1330cの活性を強く阻害することが明らかとなった。さらに、ピラジン酸存在下ではRv1330cのATP加水分解活性が促進されることも示された。実際に菌体内ATP量を測定したところ、ピラジン酸添加により菌体内ATP量の減少が認められた。ピラジン酸は酸性条件下において抗結核菌活性を示すことから、酸性条件下でRv1330cの活性を阻害してNAD生合成経路に影響を与えるとともにRv1330cのATP加水分解活性を促進させて菌体内ATP量を減少させることが、ピラジン酸の抗結核菌活性につながっている可能性が示唆された。

Keyword1, Keyword2, Keyword3　*Mycobacterium tuberculosis*, nicotinate phosphoribosyltransferase, drug target

講演番号：3C09p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎09会場

大腸菌由来ウンデカプレニル二リン酸合成酵素活性における二価金属イオンおよび界面活性剤濃度の影響

Effect of divalent metal ion and surfactant concentration on undecaprenyl pyrophosphate synthase activity from *Escherichia coli*

○小西 健太、中西 猛、北村 昌也（阪市大・院工・化生）
○Kenta Konishi, Takeshi Nakanishi, Masaya Kitamura (Dept. of Appl. Chem. and Bioeng., Grad. Sch. of Eng., Osaka City Univ.)

【目的】

細菌の細胞壁はペプチドグリカンにより形態を一定に保っているが、このペプチドグリカン形成において炭素数55のウンデカプレノールが脂質キャリヤーとして働いていることが知られている。ウンデカプレノールの前駆体であるウンデカプレニル二リン酸は、ファルネシル二リン酸（FPP, C_{15}）にイソペンテニル二リン酸（IPP, C_5）が順次縮合することにより合成されると考えられており、この反応はウンデカプレニル二リン酸合成酵素（UPPS）により触媒されている。しかし、ヒトなど動物細胞には細胞壁がないため、UPPSは新たな抗菌剤のターゲットとできる可能性を秘めている。

本研究では、大腸菌由来UPPSを用いて、FPPおよびIPPを基質とした酵素反応溶液中の各種成分がUPPSの活性に与える影響について調べた。

【方法】

大腸菌発現系を用いてN末端にHis-tagを付加した組換えUPPSを調製した。FPPと[1-^{14}C] IPPを基質とした反応溶液中の二価金属イオンおよび界面活性剤Triton X-100がUPPSの活性や反応生成物の鎖長に与える影響を調べた。UPPS活性は、生成物に取り込まれたIPP由来の放射能を計測することにより決定した。さらにTriton X-100存在・非存在下におけるUPPSの反応について反応速度論的解析を行った。

【結果・考察】

Mg^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}を用いた場合、濃度依存的な酵素活性を見い出したが、金属イオンの違いは反応生成物の鎖長には影響を与えていなかった。

一方、Triton X-100の濃度を0から5 %として反応を行ったところ、0.05 %の場合に最も活性が高かったが、Triton X-100 非存在下ではさらに鎖長の長い反応生成物が確認できた。Triton X-100非存在下でのK_m、k_{cat}はそれぞれ$K_{m\mathrm{IPP}}$ = 7.23 μM、$k_{cat\mathrm{IPP}}$ = 0.151 s^{-1}、$K_{m\mathrm{FPP}}$ = 0.0625 μM、$k_{cat\mathrm{FPP}}$ = 0.0634 s^{-1}であったのに対し、0.05%Triton X-100存在下ではそれぞれ$K_{m\mathrm{IPP}}$ = 7.02 μM、$k_{cat\mathrm{IPP}}$ = 0.453 s^{-1}、$K_{m\mathrm{FPP}}$ = 1.95 μM、$k_{cat\mathrm{FPP}}$ = 0.32 s^{-1}であった。

これらの結果から、UPPSの反応におけるFPPおよび反応生成物の疎水性との関係について考察した。すなわち、反応溶液中に界面活性剤が存在しない場合、FPPと酵素との親和性が高くなるが、反応生成物が酵素外に放出されにくくなるため$k_{cat\mathrm{FPP}}$が減少したと考えた。

undecaprenyl pyrophosphate synthase, surfactant, kinetics

講演番号：3C09p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ C校舎09会場

ピロリン酸検出を用いた、シトルリン・アルギニン新規定量法の開発

Novel enzymatic assays for citrulline and arginine coupling to pyrophosphate detection

○亀谷　将史[1]、浅野　泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ、[2]JST ERATO）
○Masafumi Kameya[1], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST ERATO)

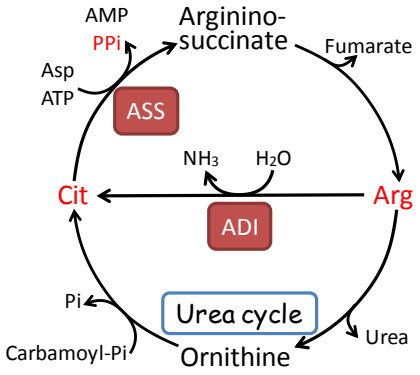
【背景】

生体試料中の各種アミノ酸濃度は、様々な疾病検出のために有用なマーカーとなることが近年明らかとなっている。こうした診断を医療の現場で行うため、簡便・迅速なアミノ酸定量が強く求められている。アミノ酸の分析法としては、HPLCなどの機器分析法が研究室レベルでは広く用いられているが、高価な分析機器や技術を要することから、医療の場での使用は限られているのが現状である。一方、酵素法による定量では迅速・簡便な測定が可能であり、我々の研究グループではこれまでに多くの種類のアミノ酸定量用酵素の開発に成功している。

Citrullineとarginineは尿素サイクル中の代謝物の一つであり、食品や医薬品にも含まれる重要な成分である。また、人体の尿素サイクル代謝異常のバイオマーカーとなることからも、生体試料も測定可能な定量法が望まれている。そこで本研究では、citrullineとarginineを定量可能な新規酵素法を開発した。

【方法】

大腸菌由来argininosuccinate synthetase（ASS）遺伝子と緑膿菌由来arginine deiminase（ADI）遺伝子をクローニングし、発現用プラスミドを構築した。得られた酵素を、当研究室で構築したピロリン酸定量系とカップリングさせることで、各アミノ酸の定量が可能であることを実証した。



本研究で用いた酵素と尿素サイクル

【結果】

ASSとピロリン酸定量系をカップリングさせたところ、citrulline依存的な吸光度変化が観察された。ASSの基質特異性を調べたところ、citrulline以外のアミノ酸や尿素などに反応性は見られず、またcitrulline濃度0～200 μMの反応液できわめて直線性の高い検量線が得られた。よって、ASSとピロリン酸定量系により、選択性の高いcitrulline定量が可能であることが示された。

さらに、上記のcitrulline定量系にADIをカップリングさせたところ、arginineに依存的な吸光度変化が観察された。本カップリング系でも上記定量系と同様に、高い基質特異性と直線性の高い検量線が得られ、arginineについても本法により定量可能であることが示された。

本研究は、ほくりく健康創造クラスター事業の助成を受けて行われた。

citrulline, arginine, pyrophosphate

講演番号：3C09p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ C校舎09会場

生体試料分析のためのピロリン酸定量系の構築

Enzymatic determination of pyrophosphate applicable to biological samples

○氷見　茉莉子[1]、亀谷　将史[1]、浅野　泰久[1, 2]（[1]富山県大工・生工研セ、[2]JST ERATO）
○Mariko Himi[1], Masafumi Kameya[1], Yasuhisa Asano[1, 2]([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST ERATO)

【目的】

生体試料中の物質濃度から疾病を検出できることが知られており、我々のグループでは、迅速・簡便な酵素的定量法の開発に成功してきた。そのような定量法開発の一環として、ピロリン酸定量系と各種酵素をカップリングさせることで多様な代謝産物の定量が可能になると考えた。例えば、アミノ酸とATPを基質としピロリン酸を生成する酵素（Argininosuccinate synthetaseなど）とピロリン酸定量系をカップリングさせることでアミノ酸定量が可能となる。しかし、既知のピロリン酸定量法は、ATPや生体試料に多量に含まれるリン酸の影響を受けるため、上記のような生体試料定量系に適さない。

本研究では、上記問題を克服し生体試料でも分析可能なピロリン酸定量法を開発するために、ピルベートホスフェートジキナーゼ(PPDK, EC 2.7.9.1）に着目した。PPDKは、以下に示したピロリン酸からピルビン酸を生成する可逆反応を触媒する酵素である。2種類の生物種由来のPPDKを用いてピロリン酸定量系を構築し、評価を行った。

Pyruvate phosphate dikinase (PPDK)
EC 2.7.9.1

AMP + Phosphoenolpyruvate + PPi ⇌ ATP + Pi + Pyruvate

【方法および結果】

Propionibacterium freudenreichii、*Thermoproteus tenax*由来PPDK遺伝子を大腸菌に発現させて、精製酵素を調製した。PPDK反応により生成するピルビン酸を分光光度的に測定することで、ピロリン酸の定量を試みた。その結果、いずれの酵素を用いた場合でも、0～200 μMのピロリン酸濃度で直線性の高い検量線が得られ、本系によってピロリン酸定量が可能であることが示された。また、ATPとリン酸共存下でも影響を受けず、実際に血漿を添加したサンプルにおいても直線性の高い検量線が得られた。よって、本定量系は生体試料の分析も可能であることが示された。

本研究で構築したピロリン酸定量系は、各種酵素とカップリングさせることにより、様々なアミノ酸や代謝産物の定量に用いられると期待される。

本研究は、ほくりく健康創造クラスター「アミノ酸メタボロミクスのための酵素チップ開発と診断・予防への応用」の一環として行われた。

pyrophosphate, pyruvate phosphate dikinase

講演番号：3C09p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ C校舎09会場

L-グルタミン酸オキシダーゼより作成したL-ヒスチジンオキシダーゼの性質検討

Characterization of L-histidine oxidase made from L-glutamate oxidase

○稲垣 賢二[1]，中井 隆一郎[1]，内海 友宏[1]，有馬 二郎[1]，日下部 均[2]，田村 隆[1]
（[1]岡山大院・自然科学，[2]（株）エンザイムセンサ）
○Kenji Inagaki[1]，Ryuichiro Nakai[1]，Tomohiro Utsumi[1]，Jiro Arima[1]，Hitoshi Kusakabe[2] and Takashi Tamura[1]
（[1]Grad. Sch. of Nat. Sci. Tech., Okayama Univ., [2]Enzyme Sensor Co. Ltd.）

【目的】L-グルタミン酸オキシダーゼは，L-グルタミン酸の酸化的脱アミノ化反応を触媒するL-アミノ酸オキシダーゼ（LAO）の一種である。本酵素は，基質特異性が極めて厳格なため，L-グルタミン酸の微量定量に有効であり，バイオセンサーへの活用が期待されている． 我々は，本酵素の X 線結晶構造解析及びドッキングスタディーの結果から，基質認識に重要な３つのアミノ酸残基（305 番目のアルギニン，312 番目のヒスチジン，564 番目のトリプトファン）を見出し，これらの中で，305 番目のアルギニンが基質 L-グルタミン酸の認識に最も重要な残基であることを明らかにした．また本酵素の 305 番目のアルギニンに変異を導入することにより，基質特異性を改変した新規なL-アミノ酸オキシダーゼを創出できることを見出した。今回は，こうして作成した基質特異性改変酵素の一つ L-ヒスチジンオキシダーゼ(R305L 変異酵素)の精製を行い，性質検討を行った．
【方法】基質認識に関わる残基に部位特異的変異を導入し，変異酵素を作成した．変異酵素は，本酵素の発現ベクターpGOx-mal1 を有する *E. coli* JM109 の無細胞抽出液を硫安分画後，アミロースカラム，陰イオン交換カラムクロマトグラフィー，ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー，ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製した．酵素活性は，酵素反応生産物のα-ケト酸を MBTH 法により定量することで測定した．
【結果】R305L 変異酵素はL-グルタミン酸にほとんど活性を示さない一方で，L-ヒスチジンに対し最も高い活性を示した。更に，R305L 変異酵素は L-ロイシンや L-フェニルアラニンにも 20～30%の相対活性（L-ヒスチジンを 100%とした）を示した．L-ヒスチジンを基質にした場合に酸素吸収も認められ，本酵素が酸化的に脱アミノ化反応を触媒していることが確認出来た。以上の結果から，L-グルタミン酸オキシダーゼの R305L 変異酵素は新規な L-ヒスチジンオキシダーゼと言える． R305L 変異酵素の最適温度は，40℃であり，60℃までは 80%以上の相対活性を維持した。また，最適 pH は pH 9 であり，pH 8～9 の範囲で 80%以上の相対活性を示した．現在速度論解析を行っている。

L-glutamate oxidase, L-histidine oxidase, substrate specificity

講演番号：3C09p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ C校舎09会場

超好熱アーキア*Pyrococcus horikoshii*によるD-アミノ酸の代謝

D-Amino acid metabolism in the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus horikoshii*

○川上 竜巳、櫻庭 春彦[1]、大島 敏久[2]（佐賀大・分析セ、[1]香川大・農、[2]九州大院・農）
○Ryushi Kawakami, Haruhiko Sakuraba[1], Toshihisa Ohshima[2] (Saga Univ., [1]Kagawa Univ., [2]Kyushu Univ.)

【目的】近年、ヒトをはじめ様々な生物に遊離のD-アミノ酸やD-アミノ酸代謝酵素の存在が報告され、D-アミノ酸が多様な生理機能を担っていることが分かってきている。一方で、第３の生物と呼ばれるアーキアにおいても、細胞内に遊離D-アミノ酸が存在することやアミノ酸ラセマーゼ、D-アミノ酸脱水素酵素などのD-アミノ酸代謝酵素が存在することが知られている。しかしこれらの研究は単発的なものが多く、アーキアにおける総合的なD-アミノ酸代謝に関する研究はない。本研究は、超好熱アーキア*Pyrococcus horikoshii*をモデルとして、アーキアにおいてD-アミノ酸がどのように利用され、代謝されるのかを明らかにすることを目的として、*P. horikoshii*の培養時におけるD-アミノ酸の取込み解析を行った。
【方法及び結果】*P. horikoshii*は通常、酵母エキスやトリプトンなどの天然培地を用いて増殖させるが、D-アミノ酸を取込むことができるかどうかを確認するため、合成培地での培養を試みた。天然培地の代わりに20種類のL-アミノ酸とビタミン溶液を加えた合成培地により、*P. horikoshii*が生育できることを確認した後、L-アミノ酸を1種類ずつ除いた培地を調製して培養することにより、*P. horikoshii*のアミノ酸要求性を調べた。その結果、*P. horikoshii*はThr、Leu、Ile、Val、Met、Phe、Tyr、Trp、His、Argの10種類のアミノ酸に対してアミノ酸要求性を示すことが分かった。次に、要求性を示したL-アミノ酸の代わりにD-アミノ酸を加えて増殖できるか確認することで、D-アミノ酸を菌体内に取り込み、利用できるかどうかを検討した。その結果、Leu、Met、Phe、Tyr、Trp、Argの6アミノ酸についてはそれぞれのアミノ酸源がD-体のみであっても増殖でき、D-アミノ酸が*P. horikoshii*内に取り込まれ、代謝されていることが明らかになった。さらに、これらのうちTrpについて、^{14}Cラベルされた D-Trpを培地中に添加して培養し、その菌体破砕液のSDS-PAGEにより分離した各タンパク質から^{14}C が検出されるか確かめたところ、D-Trp由来の^{14}Cがタンパク質に取り込まれていることを確認できた。これは、それぞれのD-アミノ酸をL-アミノ酸に代謝してタンパク質合成に利用していることを示している。そこで、取り込まれたD-アミノ酸をL-アミノ酸に変換する酵素の候補として、ラセマーゼ活性の検出を試みた結果、Leu、Met、Phe、Serなどに対する活性を検出でき、この活性によりこれらのD-アミノ酸がL-アミノ酸に変換していることが示唆された。一方で、Tyr、Trp、Argに関するラセマーゼ活性は検出できないことから、他の代謝経路によりL-アミノ酸に変換されていることが示唆された。

D-Amino acid, *Pyrococcus horikoshii*, Racemase

講演番号:3C09p21
講演日時、会場:3月24日17:59～ C校舎09会場

ヒト肺細胞由来セレノリン酸合成酵素アイソザイムの相互作用解析

Functional analysis of selenophosphate synthetase isozymes from human lung cell

○奥河内　貴大、田村　隆、稲垣　賢二（岡山大院・自然科学）
○Takahiro Okugouchi, Takashi Tamura, Kenji Inagaki (Grad. Sch. of Nat. Sci. Tech., Okayama Univ)

【目的】

微量必須元素セレンは食品に含まれるバイオファクターである。セレンは抗酸化作用をはじめとして様々な有益な生理活性を発現するが，必要摂取量の10倍程度で過剰症を示してしまうので代謝経路の解明が望まれている。セレンの有益な生理機能はセレノシステイン(Sec)残基を持つセレンタンパク質の触媒機能に基づいて発揮される。セレノリン酸はセレンタンパク質合成に必須の代謝中間体であり，セレノリン酸合成酵素(SPS)によって供給される。哺乳類にはSPS1，SPS2の相同性の高い2つのアイソザイムが存在する。SPS2はそれ自身が活性中心にSecをもつセレン酵素であり，セレノリン酸合成活性を持つ。一方，SPS1では相当するアミノ酸残基がThrに置換されておりSPS活性を示さず，その生理機能は不明である。 SPSアイソザイムの生理的意義を解明することを目的として両酵素の発現系を構築して，機能解析を行った。

【方法】

SPS1とSPS2の相互作用を酵母Two-Hybrid法，GFP-融合タンパク質ゲル濾過法で解析した。また，大腸菌*sps*遺伝子欠損株中でSPS1/SPS2共発現系を構築した。この時，SPS1をアラビノースで発現させ，SPS2をIPTGで誘導した。異なる誘導剤を用いることでSPS1とSPS2の発現量をそれぞれ調節することができた。さらに，大腸菌*selD*欠損の相補により発現するギ酸脱水素酵素の活性を測定することで，SPS1/SPS2共発現時のセレノリン酸合成能を確認した。大腸菌を宿主としたヒト肺細胞由来SPS大量発現系を構築した。得られた精製酵素を用い*in vitro*でのSPSアイソザイム機能解析を行った。

【結果】

酵母Two-Hybrid法により，SPS1/SPS2共発現酵母菌体内でSPS1，SPS2間の相互作用を確認した。また，GFP融合型タンパク質を用いた実験では，GFP融合型SPS1はSPS2と相互作用し，SPS1/SPS2ヘテロダイマーの形成が示唆された。SPS1，SPS2共発現実験により，SPS1の発現量依存的に，SPS2の活性が抑制されることも示唆された。これらの実験結果よりSPS1はSPS2に結合してその機能を抑制していることが示唆され，SPS1はセレン代謝の調節に寄与していることが予測された。また，大腸菌を宿主としたヒト由来SPS1，SPS2大量発現系の構築に成功した。pET28aベクターを用い，Hisタグ融合タンパク質として*sps*遺伝子を発現させた。低温条件下，1 mM IPTGで長時間発現誘導を行った。SPS1，SPS2共にNi-NTAアフィニティークロマトグラフィーで精製し，SPS活性測定など両アイソザイムの相互作用解析を進めている。

selenium, selenocysteine, selenophosphate synthetase

講演番号:3C10a01
講演日時、会場:3月24日09:00～ C校舎10会場

食虫植物ウツボカズラ由来キチナーゼの反応機構

Reaction mechanism of chitinases from *Nepenthes alata*

○ 本多 裕司、石崎 佳奈、新井 祥子、濱田 達朗[1]（石川県大・生資環,[1]石川県大・資源研）

○ Yuji Honda, Kana Ishisaki, Sachiko Arai, Tatsuro Hamada (Ishikawa Prefectural University, [1]Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University)

【目的】ウツボカズラ(*Nepenthes* sp.）をはじめとする食虫植物は、熱帯地方を中心に広く分布している。その生息地の多くは栄養素が乏しい土地であり、食虫植物は昆虫をとらえて消化することで不足した栄養素を補っていると考えられている。食虫植物には様々な補虫様式がみられるが、ウツボカズラは葉の内腔を袋状に変化させたポット型の捕虫器を持ち、その中に蓄えた消化液によって昆虫を消化する。

2008 年、Hatano & Hamada によってウツボカズラ(*N. alata*)消化液のプロテオーム解析が行われ、消化液にはクラスⅣキチナーゼを含む 7 種のタンパク質が主要な成分であることが明らかになった。さらに、最近のプロテオーム解析によって、クラスⅢキチナーゼが本消化液中に含まれていることも判明した。

本研究では、*N. alata* からクローニングされた組み換え体キチナーゼ（NaCHIT1 及び NaCHIT3）の反応機構解析から、ウツボカズラによるキチン分解機構を考察する。

【方法】基質としてキチンオリゴ糖(NAGn, n:重合度)、コロイダルキチン、およびグライコールキチンを用いた。各キチナーゼによる基質の分解反応は 50mM 酢酸緩衝液(pH5.5)中にて 37℃で行った。酵素活性は生成した還元糖の定量あるいは生成物の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析による定量で評価した。HPLC による糖のアノマー分析については TSK-gel Amide-80（東ソー)カラムを、糖の定量分析には Shodex Asahipak NH2P-50（昭和電工)カラムをそれぞれ用いた。

【結果】クラスⅣに属する NaCHIT1 の加水分解活性を調べたところ、キチン（コロイダルキチンやグライコールキチン）よりもキチンオリゴ糖に対する活性が高かった。NaCHIT1 の NAG6 に対する加水分解様式について HPLC を用いて調べてみると、NAG2、NAG3、および NAG4 を生成した。また、生成物のアノマー型を調べたところ、アノマー反転型の反応機構で加水分解が進行することが判明した。

一方、クラスⅢに属する NaCHIT3 の加水分解活性について調べてみると、NaCHIT1 よりもキチンに対する加水分解活性が高かった。さらに NaCHIT3 による NAG6 の加水分解様式を調べてみると、主に NAG2 と NAG4 を生成した。また、加水分解生成物のアノマー型を調べたところ、NaCHIT3 はアノマー保持型酵素であることが判った。

参考文献　N. Hatano ＆ T. Hamada, *J. Proteome Res.*, 7, 809-816 (2008)

chitinase, carnivorous plant, *Nepenthes*

講演番号:3C10a02
講演日時、会場:3月24日09:11～ C校舎10会場

LysMドメイン(CBM50)のキチンオリゴ糖結合様式

Binding of chitin oligosaccharides to the LysM domain

○大沼　貴之、翁長　彰子[1]、　平良　東紀[1]、深溝　慶（近畿大・農、[1]琉球大・農）

○Takayuki Ohnuma, Shoko Onaga[1], Toki Taira, Tamo Fukamizo (Kinki Univ, [1]Univ. of the Ryukyu)

【目的】LysMドメインは、キチンに対する結合能を有するタンパク質ドメインである。このドメインは、様々な生物種由来のタンパク質に見られる。糖質分解酵素においては、糖質結合モジュール（Carbohydrate Binding Module）として機能することが知られている。また、植物の細胞表面ではノッドファクターやキチンオリゴ糖エリシターの受容体として、根粒菌との共生や病原菌に対する生体防御に関与している。本研究ではITC（等温滴定型熱量計）による滴定実験により、LysMドメインのキチンオリゴ糖結合様式を詳細に調べることを目的とした。

【方法】滴定実験は、リュウキュウイノモトソウ由来キチナーゼ（PrChi-A）(Onaga *et al. Glycobiology*, 2008, 18, 414-23) のLysMドメインを用いて行った。ITC200のセルに精製したLysMドメイン溶液を注入し、シリンジからキチンオリゴ糖を滴下した。結合に伴う発熱量の定量と滴定曲線の解析から、結合定数と結合に関する熱力学的パラメータを決定した。また、LysMドメインとキチンオリゴ糖6糖との結合実験を20, 25, 30, 37度の各温度で行うことにより、温度変化に伴う結合のエンタルピー変化量から熱容量変化量を求めた。さらに得られた熱容量変化量から、結合に伴うエントロピー変化量のパラメタリゼーションを行った。

【結果】LysMドメインにキチンオリゴ糖の2～6糖を滴定した結果、3糖以上の滴定により結合に伴う発熱を確認した。このことから、LysMドメインは3糖以上のキチンオリゴ糖を認識することがわかった。結合において有利なエンタルピー変化と、不利なエントロピー変化が確認され、LysMドメインとキチンオリゴ糖の結合はエンタルピー駆動型であることがわかった。また、糖鎖が長くなるほど結合は強くなった。PrChi-AのLysMドメインのキチンオリゴ糖4～6糖に対する解離定数は数mM程度であり、弱い結合親和性を示すことがわかった。イネいもち病菌やトマトの葉かび病菌の分泌するLysMドメインは数μM程度の親和性を示すことから、これらのキチンオリゴ糖に対する結合親和性の違いについて考察した。また、結合に伴うエントロピー変化量のパラメタリゼーションの結果から、結合に伴うLysMドメインの水和状態および立体構造の変化についても報告する。

LysM domain, Chitin oligosaccharide, Isothermal Titration Calorimetry

講演番号：3C10a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎10会場

シダ植物由来LysM-キチナーゼのキチン結合活性および抗真菌活性におけるドメインの役割

Roles of domains in chitin-binding and antifungal activities of LysM-Chitinases from fern.

○新垣　悠平、翁長　彰子、稲嶺　咲紀、伊藤　進、平良　東紀（琉大農・亜熱生資）
○Yuhei Arakaki, Shoko Onaga, Saki Inamine, Susumu Ito, Toki Taira (University of the Ryukyus)

【目的】本研究室ではこれまでに LysMドメイン含有キチナーゼ（LysM-キチナーゼ）として，シダ植物であるリュウキュウイノモトソウ（*Pteris ryukyuensis*）由来 Chitinase-A（PrChi-A）およびスギナ（*Equisetum arvense*）由来 Chitinase-A（EaChi-A）を得ており，植物における LysM-キチナーゼの報告は現在のところ，この 2 例のみである。PrChi-A はキチン結合能を持ち，抗真菌活性を示す。それに対し EaChi-A は，キチン結合能を持つにも関わらず，抗真菌活性が認められない。その原因を調べるために PrChi-A と EaChi-A のドメインスワッピング体を作成し，性質比較を行った。

【方法】野生型の PrChi-A と EaChi-A はN末端側にそれぞれ 2 つおよび 1 つの LysM ドメインを持つ。PrChi-A 由来の 2 つ目の LysM ドメインおよび EaChi-A 由来の LysMドメインをそれぞれ $LysM_{Pr}$ および $LysM_{Ea}$，それぞれの触媒ドメインを Cat_{Pr} および Cat_{Ea} とした。PrChi-A のN末端に位置する LysM ドメインを1つ欠失させた変異体 $LysM_{Pr}$-Cat_{Pr} と野生型 EaChi-A（$LysM_{Ea}$-Cat_{Ea}）およびそのスワッピング体である $LysM_{Pr}$-Cat_{Ea} と $LysM_{Ea}$-Cat_{Pr} を作成し，各種測定に用いた。キチン結合活性測定には結晶性キチン，加水分解活性測定には不溶性基質としてキチンビーズを，可溶性基質としてグリコールキチンをそれぞれ用いた。抗真菌活性測定には *Trichoderma viride* を用いた。

【結果・考察】PrChi-A の触媒ドメイン（Cat_{Pr}）を持つ $LysM_{Pr}$-Cat_{Pr} および $LysM_{Ea}$-Cat_{Pr} は同等の抗真菌活性を示した。それに対し，野生型 EaChi-A およびその触媒ドメイン（Cat_{Ea}）を持つ変異体 $LysM_{Pr}$-Cat_{Ea} は，いずれも抗真菌活性を示さなかった。これらのことから，EaChi-A が抗真菌活性を示さない原因は，触媒ドメインにあることが示唆された。Cat_{Ea} を持つ変異体は，キチン結合能は高いが，加水分解活性は可溶性基質および不溶性基質ともに Cat_{Pr} を持つ変異体よりも低くなっていた。強いキチン結合能によるターンオーバーの低下が加水分解活性を低下させ，結果として抗真菌活性を低下させていると考えられた。

LysM, chitinase, antifungal activity

講演番号：3C10a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎10会場

パイナップル緑葉由来キチナーゼ-Cの翻訳後修飾および抗真菌活性

Posttranslational modification and antifungal activity of pineapple leaf chitinase-C.

○平良　東紀、秋元　理沙（琉大農・亜熱生資）
○Toki Taira, Risa Akimoto (University of the Ryukyus)

【目的】植物キチナーゼは病原性真菌の主な細胞壁成分であるキチンを分解することによって，真菌の侵入および生育を抑制する生体防御タンパク質と考えられている。本研究室ではこれまでにパイナップルの葉よりクラス I キチナーゼである Pineapple Leaf Chitinase-C (PLChi-C)を単離し，本酵素が分子量 39,000 の酸性の糖タンパク質であり，他のクラス I キチナーゼに比べキチン結合能は高いが，抗真菌活性が低いことなどを明らかにしている。本研究では本酵素の翻訳後修飾および抗真菌活性に関わる構造の解析を行った。

【方法】リコンビナント PLChi-C は，ORF のうち N 末端シグナル配列を除く領域を発現ベクター pET22b/大腸菌 Rosseta gami(DE3)の系で発現させた。翻訳後修飾の解析は，ネイティブおよびリコンビナント PLChi-C のトリプシン消化断片の MALDI TOF-MS および逆相 HPLC によるペプチド・マッピングにより行った。付加糖鎖の糖組成分析は，試料の TFA を用いた酸加水分解物を HPAEC-PAD 法に供することによって行った。変異体の作成は QuickChange Multi Site-Directed mutagenesis Kit（ストラテジーン社）を用いて行った。キチン結合活性はキチンアフィニティーカラムを用いて調べた。抗真菌活性の測定には *Trichoderma viride* を用いた。

【結果】ペプチド・マッピングの結果，ネイティブ PLChi-C はリコンビナントよりも C 末端が 4 残基短いことがわかった。アラビノースおよびハイドロキシプロリンを含有する糖ペプチド Thr27－Arg80 が得られた。PLChi-C 遺伝子は翻訳後，N 末端シグナル配列と C 末端が切断され，糖鎖としてアラビノースが付加され成熟型となることが示唆された。ネイティブおよびリコンビナント PLChi-C 性質比較から，糖鎖付加は熱安定性に関わることが示唆された。

抗真菌活性には等電点が係わることが予測されたため，PLChi-C の触媒ドメインの表面電荷に係わると推定されたアミノ酸残基を 5 カ所変えた変異体（M5），M5 にさらに 3 カ所変えた変異体（M8），M8 にさらに 5 カ所変えた変異体（M13）を作成した。野生型，M5，M8 および M13 変異体の等電点はそれぞれ 4.5，5.0，5.4 および 8.1 となった。全ての変異体は *T. viride* の菌糸の伸長を抑制し，等電点の高い変異体ほど活性が強かった。

chitinase, post-translational modification, antifungal activity

講演番号：3C10a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ C校舎10会場

Streptomyces griseus 由来推定キチン結合タンパクの異種発現と機能解析

Heterologous expression and analysis of the putative chitin-binding protein from *Streptomyces griseus*

○工藤 まどか、中川 裕子、鈴木　一史[1]、渡邉　剛志[1]、戸谷　一英（一関高専・物化工、[1]新潟大農・応生化）

○Madoka Kudo, Yuko Nakagawa, Kazushi Suzuki[1], Takeshi Watanabe[1] and Kazuhide Totani (Chem. Eng., Ichinoseki Natl. Coll. Tech., [1]Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Niigata Univ.)

【目的】

カニ殻などのキチン質から環境への負荷を低減させて*N*-アセチルグルコサミンやキチンオリゴ糖を製造するためには、酵素糖化法を用いることが望ましい。我々は酵素糖化法の高効率化と実用化を目指し、キチン分解に相乗効果を与えることが期待されるキチン結合タンパク(CBP)に注目している。キチンを炭素源にして*Streptomyces griseus* HUT6037株を培養すると、キチン結合タンパク (SgCBPs) のmRNA蓄積量が有意に変化する (前年度大会要旨参照)。そこで、CBM33に属する推定キチン結合タンパク (SgCBP4) について異種発現および機能解析を行った。

【方法および結果】

1) SgCBP4のクローニングおよび異種発現

*SgCBP4*を導入した大腸菌発現用ベクターpET-44 Ek/LIC (Novagen) を大腸菌Rosseta-gami™ 2(DE3) pLysS (Novagen) に形質転換した。なお、pET-44 Ek/LIC ベクターは精製用のHis•Tag と、可溶性タンパクの発現を促進するNus•Tag が組み換えタンパクに連結するように設計されている。形質転換体を培養し、isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加して組み換えCBP4 (rSgCBP4) の発現（約85 kDa）を誘導した。菌体は超音波破砕により可溶性タンパクと不溶性タンパクに分画した。両分画に関してSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)、ヒスチジンタグ抗体を利用したWestern blot法を用いたタンパクの検出を行い、rSgCBP4が可溶性画分にあることを確認した。

2) rSgCBP4の精製

形質転換体より得られた可溶性タンパクをニッケルカラムHis GraviTrap、ゲル濾過カラムHiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (共にGE Healthcare) 用いて粗精製した。

3) rSgCBP4 の結合特性の評価

粗精製した rSgCBP4 を Enterokinase (Roche) 処理し、タグを切除した。rSgCBP4 (18 kDa) とキチンを緩衝液中にて 25℃で 1 時間振盪し、その後、キチンに結合しなかったタンパクを含む上清を回収した。残った沈殿は Arakane らの方法 (2003) に従って 4 段階の洗浄を行い、SDS-PAGE を行った。コントロールとして、キチン結合能を持たないウシ血清アルブミン (BSA) と、キチン結合ドメインを持つキチン分解酵素 ChiC を供した。素通りから 3 回目の洗浄まで rSgCBP4 はほとんど溶出せず、大部分が最後の酢酸によって溶出した。このことから、rSgCBP4 がキチン結合能を有することを証明した。

chitin-binding protein, *Streptomyces griseus*, CBM

講演番号：3C10a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ C校舎10会場

Streptomyces griseus 由来のCBM33の機能解析

Study of CBM33s from *Streptomyces griseus*

○中川 裕子、工藤 まどか、Gustav Vaaje-kolstad[1], Vincent G.H. Eijsink[1], 戸谷 一英（一関高専・物化工, [1]Chem. Biotech. Food Sci., Norwegian Univ. Life Sci.）

○Yuko Nakagawa, Madoka Kudo, Gustav Vaaje-kolstad[1], Vincent G.H. Eijsink[1] and Kazuhide Totani (Chem. Eng., Ichinoseki Natl. Coll. Tech., [1]Chem. Biotech. Food Sci., Norwegian Univ. Life Sci.)

【目的】カニ殻などのキチン質から製造される*N*-アセチルグルコサミン（単糖）は関節痛軽減や美肌効果により急速に市場が拡大しているが、製造工程が煩雑で大量の劇物を使用する。我々はこれに代わる酵素糖化法の高効率化を目指し、食用酵素分泌菌*Streptomyces griseus*由来のキチナーゼの解析を行ってきた。キチン分解の際のキチナーゼ間の相乗効果に関しては良く知られていたが、近年キチナーゼと共に基質に作用させると、相乗効果をもたらすCBP21の存在が報告された (Vaaje-Kolstad *et al*. 2010)。CBP21はCBM33 familyに属しており、結晶性キチンの表面に新たなニックを入れる働きをする。そこで、*S. griseus*由来のCBM33を解析し、キチンの酵素糖化への応用を試みた。

【方法および結果】キチンを炭素源にして *S. griseus* を培養すると、CBM33 ファミリーに属するキチン結合タンパク (SgCBPs) の mRNA 蓄積量が有意に変化する (前年度大会要旨参照)。CBP 間で重要な残基は保存されており、SgCBP1 と 4、SgCBP2 と 3 はそれぞれで高い相同性を示す。そこで、*Brevibacillus* の発現系を用いて、4 種の SgCBP のうち、未解析の SgCBP 3 種を異種発現させた。精製には主にキチンアフィニティカラムを用いた。高結晶化度の市販の α-キチン、およびコンバージミルを用いて粉砕した低結晶化度の α-キチンを基質に用い、粗精製した組換えタンパク rSgCBP2-4 の結合能を調べた。その結果、高結晶化度の α -キチンに対して高い結合能を示す傾向が見られ、各 rSgCBP 間でその強弱に違いが見られた。我々はこれまでに、市販の *S. griseus* 由来の粗酵素を用いた際に結晶化度の低い α-キチンの方が高い酵素分解率を示すことを明らかにしている (Nakagawa *et al*. 2011)。高結晶化度のキチンに結合しやすい SgCBP とキチナーゼを併用することによって、キチンの酵素分解への相乗効果が期待される。rSgCBP を各種キチナーゼと共に酵素分解に用いた結果について報告する。

CBM33, chitin, enzymatic degradation

講演番号：3C10a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎10会場

Serratia marcescens キチン分解利用関連遺伝子の遺伝子破壊

Gene disruption of chitin degradation and utilization system in *Serratia marcescens*

高野慎也[1]、佐々木直美[1]、本間祥太[1]、小川知佐奈[2]、杉本華幸[1,2]、鈴木一史[1,2]、○渡邉剛志[1,2]
（[1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大農・応用生化）
Shinya Takano[1], Naomi Sasaki[1], Shota Homma[1], Chisana Ogawa[2], Hayuki Sugimoto[1,2], Kazushi Suzuki[1,2],○Takeshi Watanabe[1,2]（[1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Niigata Univ. [2]Dept.of Appl. Biol. Chem. Facul. of Agric., Niigata Univ.）

【目的】 *S. marcescens* 2170は、キチンまたはキチンオリゴ糖存在下で培養すると３つのキチナーゼ（ChiA, ChiB, ChiC）とキチン結合タンパク質 CBP21 を分泌する。これらの蛋白質の発現には転写調節因子 ChiR が必須である。また、本菌のペリプラズムおよび細胞外にはキトビアーゼが存在し、キチンの分解によって生ずる $(GlcNAc)_2$ を一部または大部分 GlcNAc に変換する。GlcNAc および $(GlcNAc)_2$ の細胞質内への取り込は、それぞれに特異的なPTS系によっておこなわれる。さらに、最近 ChiR 及び *ybfM-ybfN-chitobiase*(*ctb*) オペロンの発現がアンチセンス型 small RNA, MicM によって制御されていることが明らかとなった。

本研究では、*S. marcescens* のキチン分解利用系をさらに詳細に解明するために、*ybfM*, *ybfN*, *micM* などのキチン分解利用関連遺伝子の遺伝子破壊の方法を確立し、それらの遺伝子および遺伝子産物の機能・役割を解析することを目的とした。

【方法・結果】これまで、*S. marcescens* 2170の遺伝子破壊は、標的遺伝子にプラスミドを挿入する方法によっておこなって来た。しかし，標的遺伝子中に長いDNA断片が挿入されるため、この方法は *ybfM-ybfN-chitobiase*(*ctb*) オペロンなどのようにキチン分解利用関連遺伝子がオペロンを形成している場合や、*micM* のように小さな遺伝子を破壊してその影響を解析する場合には適さない。そこで、本菌のキチン分解利用システムにおいてキチン分解産物の取り込みに重要な役割を果たすと考えられるYbfM, YbfN 蛋白質をコードする遺伝子（*ybfM*、*ybfN*）、およびキチン分解利用関連蛋白質の遺伝子発現制御に重要な役割を果たすと考えられる *micM* 遺伝子を標的とし、これらの遺伝子の一部を含むプラスミド pKNG101 を用いてダブルクロスオーバーによってこれらの遺伝子の破壊を試みた。その結果、余分なDNA断片が挿入されていない y*bfM*, *ybfN*, *micM* の３つの遺伝子の欠損株を得ることに成功した。現在、これらの遺伝子のキチン分解利用における機能を調べるために、変異株の性質を解析中である。

1) Toratani, T. *et al*., *Microbiology* **154**,1326-32 (2008).
2) Uchiyama, T. *et al*., *J. Bacteriol.* **185**, 1776-82 (2003).
3) Suzuki, K. *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 338-47 (2001).
4) Suzuki, K. *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 128-35 (1998).
5) Watanabe, T. *et al*., *J. Bacteriol.* **179**, 7111-7 (1997).

gene disruption, chitin, *Serratia marcescens*

講演番号:3C10a08
講演日時、会場:3月24日10:27～ C校舎10会場

NMR法によるライムギ種子Family GH-19キチナーゼの基質結合解析

Substrate binding analysis of a GH-19 chitinase from rye seeds by NMR spectroscopy

○岡崎　蓉子、新家　粧子、近藤　香織[1]、福田　達也、大沼　貴之、沼田　倫征[2]、深溝　慶（近畿大院農・バイオ、[1]近畿大農・バイオ、[2]産技総研バイオ）

○Yoko Okazaki, Shoko Shinya, Kaori Kondo, Tatsuya Fukuda, Takayuki Ohnuma, Tomoyuki Numata[1], Tamo Fukamizo(Kinki Univ., [1]AIST)

【目的】植物Family GH-19キチナーゼとオリゴ糖基質との複合体の結晶構造はまだ報告されておらず、それらの結合様式の詳細は不明である。我々の研究室では、ライムギ種子Family GH-19キチナーゼ(RSC-c)と*N*-アセチルグルコサミンオリゴ糖$(GlcNAc)_n$との結合様式を、クレフト全体にわたって明らかにすることを試みている。本研究では、RSC-c野生型および触媒残基であるGlu67をGlnへ変異した不活性酵素(E67Q)を用い、NMRシグナルに基づく化学シフト摂動法によってオリゴ糖の結合様式を調べた。また基質結合クレフトの+4サブサイトに存在するTrp72をAlaへ変異させ(W72A)、HPLCを用いて基質結合様式の変化を調べた。

【方法】安定同位体ラベル RSC-c は、大腸菌による発現系を用いて ^{13}C-Glucose および ^{15}N-NH_4Cl を含む最少培地で発現させ、イオン交換およびゲル濾過によって精製した。RSC-c に対して($(GlcNAc)_n$(n=2,4,6))を滴定しながら ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを測定し、基質滴定に伴う各シグナルの化学シフト変化量を計測した。また、3 次元 NMR スペクトルを用いて ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトル中の各シグナルの帰属を行い、RSC-c 分子中のどの部位でオリゴ糖との相互作用が行われているかを推定した。さらに、RSC-c 野生型と W72A を用いて$(GlcNAc)_6$および$(GlcNAc)_5$の還元末端に*p*-ニトロフェニル基を導入した *p*NP-$(GlcNAc)_5$の加水分解反応を HPLC によって経時的に測定し、変異導入による基質結合様式の変化を調べた。

【結果】オリゴ糖滴定により化学シフト変化が観察されたRSC-c野生型のアミノ酸残基は、触媒部位からみて還元末端側、すなわちプラス側サブサイトに偏在しており、糖残基に対する主要な親和性はプラス側サブサイトに存在するものと思われた。この結果はＸ線結晶構造解析により得られた結果とほぼ一致した。また、$(GlcNAc)_6$に対する加水分解反応において、RSC-c野生型とW72Aはほぼ同じ分解パターンを示したのに対して、*p*NP-$(GlcNAc)_5$を用いた場合では両酵素は異なる分解パターンを示した。すなわち、RSC-c野生型は*p*NP-$(GlcNAc)_2$に比べ*p*NP-$(GlcNAc)_3$をより多く生産したが、W72Aでは逆に*p*NP-$(GlcNAc)_2$を多く生産した。Trp72と基質還元末端の*p*NP基は、+4サブサイトにおいて強いスタッキング相互作用を行っており、Trp72のAlaへの変異はその相互作用を欠損させ、*p*NP-$(GlcNAc)_5$の結合位置をサブサイト１個分非還元末端側へシフトさせたものと考えられた。このことは+4サブサイトの存在が有意なものであることを示しており、NMR法で得られた結果の妥当性を示唆している。

chitinase, family GH-19, NMR

講演番号:3C10a09
講演日時、会場:3月24日10:38～ C校舎10会場

Family GH-19キチナーゼの触媒中心近傍アミノ酸残基の部位特異的変異

Site-directed mutagenesis of amino acid residues located near the catalytic center of Family GH-19 chitinases

○浦﨑 惇[1], 福田 達也[1], 田中 遼馬[2], 大沼 貴之[1], 平良 東紀[3], 深溝 慶[1] ([1]近大農院・バイオ、[2]近大農・バイオ、[3]琉球大・農・亜熱生資)

○Atsushi Urasaki[1], Tatsuya Fukuda[1], Ryoma Tanaka[2], Takayuki Onuma[1], Toki Taira[3], Tamo Fukamizo[1] ([1]Kinki Uni., [2]Ryukyu Uni.)

【目的】キチンのβ-1,4グリコシド結合を加水分解するキチナーゼは、Family GH-18とGH-19に分類され、それぞれ異なる機構で加水分解反応を触媒することが知られている。GH-18酵素による加水分解反応はアノマー型保持機構で進行し、糖転移反応が高能率に触媒される場合も少なくない。一方、GH-19では生成物のアノマー型は反転され、糖転移活性はみられない。T4リゾチームはGH-24に属するが、GH-19と同様にアノマー反転型で反応を触媒することが知られている。KurokiらはこのT4リゾチームの部位特異的変異を行い、アノマー反転からアノマー保持への触媒機構の変換を報告した[1]。T4リゾチームと同様の触媒クレフト構造をもつGH-19酵素においても、アノマー反転からアノマー保持への触媒機構の変換は可能であると考えられ、変換された酵素は糖転移反応をも触媒し、新規糖質の生産のために有用であると思われる。本研究では、ライムギおよびナガハハリガネゴケ由来Family GH-19キチナーゼ (RSC-cおよびBcChi-A) の触媒部位近傍に存在するアミノ酸残基に変異を導入することにより、触媒機構の変換を試みた。

【方法】BrameldとGoddardは[2]、オオムギ種子由来Family GH-19キチナーゼの結晶構造を用いた分子動力学シミュレーションを行うことによって、触媒塩基として働くグルタミン酸残基を現行の位置よりも、触媒酸(Glu67)側に移動させることによって、アノマー反転からアノマー保持への触媒機構の変換が可能になることを予測した。この予測のもとに、RSC-cのGlu89とGly113、およびBcChi-AのGlu70とGly95にそれぞれ変異をもつ、変異型酵素を設計した(RSC-c E89G/G113D, BcChi-A E70G/G95D)。変異導入はQuikChange Mutagenesis Kitで行い、変異導入されたキチナーゼ遺伝子を含むpET-22bプラスミドを用いて大腸菌に形質転換した。変異型酵素は常法によって発現させ、可溶性画分よりイオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。

【結果】得られた変異型酵素のCDスペクトルを測定し野生型酵素と比べると、RSC-cおよびBcChi-Aともに、大きな変化はみられず、変異導入に伴う構造変化は起こっていないことがわかった。変異導入によるグリコールキチンに対する加水分解活性の変化を調べたところ、両酵素とも活性は大きく低下していた。キチンオリゴ糖を基質として酵素反応を行い、生成物をMALDI TOF-MSで分析した結果、両酵素において基質以上の重合度をもつ転移反応産物が検出された。現在、$(GlcNAc)_6$のアルコール誘導体を基質に用い、加水分解により生成された還元末端のアノマー型解析をHPLCおよびNMRで解析している。

[1] Kuroki R, Weaver LH, Matthews BW. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 8949-8954 (1999)

[2] Brameld KA, Goddard WA 3rd. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 4276-4281 (1998)

chitinase, family GH-19, site-directed mutagenesis

講演番号：3C10a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ C校舎10会場

(GlcNAc)2-Fの酵素合成とグライコシンターゼ反応への利用

Enzymatic synthesis of (GlcNAc)2-F and its utilization for the glycosynthase reaction

○道善 聡[1]、本多 裕司[2]、大沼 貴之[1]、北岡 本光[3]、深溝 慶[1]（近畿大院農・バイオ[1]、石川県大・生資環[2]、農研機構・食総研[3]）

○Dozen Satoshi[1], Honda Yuji[2], Ohnuma Takayuki[1], Kitaoka Motomitsu[3], Fukamizo Tamo[1] ([1]Kinki Univ. Dept. Advanced Bioscience, [2]Dept. of Food Sci. Ishikawa Pref. Univ, Natl. Food Res. Inst)

【目的】有用糖質を得るために糖質加水分解酵素の糖転移活性を利用した糖鎖合成は広く用いられている。その際、フッ化糖のような優れた脱離基を有する合成糖供与体を用いると反応効率が向上することはよく知られている。しかしながら、このような糖供与体を合成するためには、糖残基の水酸基の保護と脱保護を必要とし、とりわけオリゴ糖ベースの糖供与体を合成する場合、極めて煩雑な合成過程を経なければならない。よって、このような糖供与体の合成においても酵素法によって行うことは有効であると考える。我々の研究室では、キチン分解酵素、キチナーゼを用いた有用糖の合成を試みているが、その際キチナーゼの基質である*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)のオリゴ糖、(GlcNAc)nをベースとした糖供与体の合成が必要となってくる。そこで、本研究では *Vibrio proteolyticus* 由来 chitobiose phosphorylase (ChBP) を用いて α-$(GlcNAc)_2$-フルオライド[α-$(GlcNAc)_2$-F]および α-$(GlcNAc)_3$-フルオライド[α-$(GlcNAc)_3$-F]を合成することを試みた。

【方法】初めに、GlcNAc の *O*-アセチル化物に、HF-ピリジンを作用させて、α-GlcNAc-F の *O*-アセチル化物（化合物１）を得た。次に、化合物１にナトリウムメトキシドを作用させてα-GlcNAc-F を得た。ChBP は大腸菌による発現系によって発現させ、Niカラムとゲルろ過カラムを用いて精製した。ChBPとα-GlcNAc-F を反応させて、得られた反応生成物はシリカゲルカラムを用いて精製した後、^{1}H-NMR と ^{13}C-NMR によって構造決定を行った。その後、当研究室で発現精製して得られたコケおよびライムギ種子由来 Family GH-19 キチナーゼ（BcChi-A、RSC-c）と反応させ、その反応性を調べた。

【結果】ChBP を用いた酵素合成によってα-$(GlcNAc)_2$-F を効率よく合成することに成功した。さらに、酵素濃度を上げることにより、α-$(GlcNAc)_3$-F を得ることもできた。得られたα-$(GlcNAc)_2$-F とα-$(GlcNAc)_3$-F を用い、BcChi-AおよびRSC-cとの反応性を調べた。その結果、BcChi-Aでは F^- 遊離活性を確認できたが、RSC-cでは F^- 遊離活性を確認できなかった。このことから、RSC-cを用いたグライコシンターゼ反応には、さらに長鎖のドナー基質が必要であることが分かった。

chitobiose phosphorylase, chitin oligosaccharide fluoride, GH-19 chitinase

講演番号:3C10a11
講演日時、会場:3月24日11:10～ C校舎10会場

Ralstonia sp. A-471由来Family GH-23キチナーゼの触媒中心近傍に位置する酸性アミノ酸残基の役割

The role of acidic amino acid residues located near the catalytic center of Family GH-23 chitinase from *Ralstonia* sp. A-471

○川本 乃理子、上田 光宏、中澤 昌美、宮武 和孝、西村 重徳、深田 はるみ、玉田 太郎[1]、有森 貴夫[1]、大沼 貴之[2]、深溝 慶[2]（阪府大院・生環科、[1]原子力機構・量子ビーム、[2]近畿大・農）
○Noriko Kawamoto, Mitsuhiro Ueda, Masami Nakazawa, Shigenori Nishimura, Harumi Fukada, Taro Tamada, Takao Arimori, Takayuki Ohnuma, Tamo Fukamizo(OPU, [1]JAEA, [2]Kinki univ.)

【目的】キチナーゼは、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)がβ-1,4-グリコシド結合で連なった多糖であるキチンを加水分解する酵素であり、Henrissat らによる糖質加水分解酵素の分類においてFamily GH-18 と GH-19 に分類されている。当研究室では、これまで好熱性細菌 *Ralstonia* sp. A-471 からキチン分解活性を指標に、キチナーゼ（以下、Ra-ChiC）を精製し、その遺伝子の配列を調べてみたところ、本酵素のアミノ酸配列、並びにその結晶構造はグース型リゾチームのものと類似し、GH-18 や GH-19 ではなく、Family GH-23 に分類されるということがわかった[1,2]。本酵素はキチナーゼ活性だけを示し、リゾチーム活性は示さない。このような新規酵素の活性部位には、GH-18、GH-19、GH-23 Family 酵素にはみられない特殊な機能構造が存在すると思われる。本研究では、Ra-ChiC の触媒中心近傍に存在する 3 つの酸性アミノ酸残基(Glu141、Glu162、Asp226)に変異を導入し、変異酵素の酵素機能について野生型酵素と比較を行った。
【方法と結果】$(GlcNAc)_{3\sim6}$の加水分解産物をHPLCで解析したところ、本酵素はアノマー反転型酵素であり、+1サブサイトにおいてβアノマー選択性をもつことがわかった。また、グルタミン酸残基の変異に伴うグリコールキチン分解活性の変化を調べたところ、プロトン供与体と思われたGlu141の変異は予想通り著しく活性を低下させた。一方、プロトン受容体と思われたGlu162のAlaへの変異は活性の低下をもたらしたが、グルタミンへの変異体(E162Q)においては、活性の低下はみられなかった。そこで、E162QとE162Aの反応生成物のHPLCの解析を行ったところ、Glu162は基質との結合にも関与することがわかった。さらに、Glu162の基質結合について定量的な知見を得るため、不活性変異体E141AとE141A/E162Qの等温滴定型熱量計による結合実験を行ったところ、E141A/E162Q では、E141Aに比べ、$(GlcNAc)_6$の滴定に伴う結合のエンタルピー変化ΔHは40%低下した。また、E141AとE141A/E162Qの変性の転移温度(T_m)を示唆走査性熱量計で調べてみたところ、結合状態におけるT_mとfreeな状態における変性のT_mの差(ΔT_m)が、E141A/E162QではE141Aに比べ、6℃低下した。したがって、Glu162は確かに基質認識に関与すると結論した。他方、触媒中心近傍に位置するAsp226の変異は著しい活性の低下をもたらした。よって、触媒塩基として働くアミノ酸残基は、Glu162というよりもむしろAsp226である可能性が高い。
[1]*M. ueda et al, Appl Microbiol Biotechnol, 81, 1077-1085*(2009)
[2]*Okazaki et al, Acta Crystallogr. sectF. Struct. Biol. Cryst. Commun, 67, 494-7(2011)*

chitinase, *Ralstonia*, Family GH-23

講演番号：3C10a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ C校舎10会場

タイトル　真菌細胞壁を表層で分解する*Paenibacillus*キチン分解酵素ChiWの生化学的諸性質
Title　Biochemical properties of *Paenibacillus* chitinase degrading fungal cell wall on the surface

○ 杉本 郁美、伊藤 貴文、日ビ 隆雄、鈴木 史子、藤井 豊[1]、武藤 明[2]、木元 久
（福井県大院・生物資源、[1]福井大・医、[2]福井工大・工）
○Ikumi Sugimoto, Takafumi Itoh, Takao Hibi, Fumiko Suzuki, Yutaka Fujii[1], Akira Taketo[2], and Hisashi Kimoto (Fukui Prefectural University, [1]University of Fukui, [2]Fukui University of Technology)

【目的】*Paenibacillus* sp. FPU-7 株は真菌細胞壁の分解能力に優れたグラム陽性細菌である。これまでに我々は、本菌に含まれる強力な細胞壁分解酵素の利用を目的として、分泌型キチナーゼ 6 種を大腸菌によるショットガンクローニングで単離してきた。今回、次世代シーケンサによる本菌のゲノムドラフト解析を行った結果、自身の細胞壁に結合するための Surface layer homology (SLH)ドメインと 2 つの触媒ドメインを有する新規な菌体結合型キチナーゼをコードする遺伝子 *chiW* を新たに同定することができた。そこで、本酵素の機能解析を目的として、*chiW* をサブクローニングし、大腸菌大量発現系を構築し、精製を行った。さらに触媒残基を部位特異的に変異した酵素を作製し、これらの生化学的諸性質を解析したので報告する。
【方法】コールドショック発現ベクターpColdI に、SLH 領域を除く *chiW* 遺伝子を挿入した発現プラスミドを作製した。このプラスミドを用いて、大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、ChiW の発現を確認した。次に、ヒスチジンタグとニッケルキレートカラムを用いて酵素を精製した。ChiW は互いに相同性が高い触媒ドメイン(約 70%)を 2 つ持つ。この 2 つの触媒ドメインの機能解析を行うため、触媒残基と推定される E691 と E1177 をグルタミンへと置換した部位特異的変異体を作製し、前述と同様に酵素の精製を行った。酵素活性測定には *p*-ニトロフェニル誘導体による合成発色基質を用い、諸性質を解析した。
【結果】精製したChiWと合成発色基質を用いた酵素活性測定法により、至適温度を測定した結果、50℃で最大活性を示した。また、至適pHは4.5付近にあり、酵素活性は40℃まで安定であった。さらに、金属イオンの中でも、反応液中に$FeCl_3$が共存する事で、金属イオン無添加の場合と比較した相対活性は40%にまで減少した。現在、その他の生化学的諸性質について、詳細な解析を行っている。

Chitinase, *Paenibacillus*, Chitin

講演番号：3C10a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ C校舎10会場

不溶性キチンを分解する*Paenibacillus*キチン分解酵素ChiWの触媒領域の立体構造

Crystal structure of the catalytic region of *Paenibacillus* chitinase ChiW, responsible for the degradation of insoluble chitin

○伊藤 貴文、日ビ 隆雄、杉本 郁美、鈴木 史子、藤井 豊[1]、武藤 明[2]、木元 久
（福井県大院・生物資源、[1]福井大・医、[2]福井工大・工）

○Takafumi Itoh, Hibi Takao, Ikumi Sugimoto, Fumiko Suzuki, Yutaka Fujii[1], Akira Taketo[2] and Hisashi Kimoto
(Fukui Prefectural University, [1]University of Fukui, [2]Fukui University of Technology)

【目的】*Paenibacillus* sp. FPU-7 株は真菌細胞壁の分解能力に優れたグラム陽性細菌である。本細菌はキチナーゼ群を菌体外に分泌することが明らかとなっているが、キチナーゼ ChiW も同時に細胞表層に提示している。ChiW は、FPU-7 株が捕食標的である真菌に取り付く際に、真菌細胞壁キチンを分解するための重要な役割を担っていることが示唆されるが、その分子機構は明らかになっていない。我々は、その仕組みを明らかにし、環境負荷の少ない不溶性多糖の効率的な分解方法の開発を目指している。そこで、本酵素の立体構造解析に着手した。
【方法】ChiW は自身の細胞壁に結合するためのドメイン(SLH)と 2 つの触媒ドメインを持つ。全長での結晶化は困難であったため、2 つの触媒ドメインのみからなる酵素の結晶化を検討した。酵素は大腸菌体中に大量に発現させた後、Ni-IMAC により精製した。結晶は 1 M リン酸アンモニウムを含む溶液から取得した。放射光実験施設 SPring-8 にて X 線回折強度データを取得し、2.15 Å 分解能で解析した。*Bacillus* 由来キチナーゼ A1 触媒ドメイン (PDB: 1ITX)をモデルとした分子置換法により位相を決定後、*R* 因子 20%で立体構造を決定した。
【結果】2つの触媒ドメインは典型的なTIMバレルフォールドを基本骨格とし分子置換に利用した還元末端側から2糖を遊離するキチナーゼと立体構造的に高い相同性を持っていた。また、多糖キチンを結合するための深いクレフトを形成していた。さらに、この2つの触媒クレフトはリンカーを挟んで互いに直交する位置に配置されていた。一般的に不溶性のキチンを分解するキチナーゼは、触媒ドメインの他にキチン結合ドメインを有す。しかし、ChiWの場合では、アミノ酸配列の相同性検索および立体構造解析の結果からは、典型的なキチン結合ドメインを見出すことはできなかった。現在、詳細な解析を行っている。また、当日は生化学的な解析の結果と比較して報告したい。

Chitinase, *Paenibacillus*, Chitin

講演番号：3C10a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ C校舎10会場

変異型キトサナーゼのキトサン検出への利用

Application of a chitosanase mutant for chitosan-detection

○菊地 彩美[1]、齋藤 明広[1,2]、富田 真世[1]、伊福 伸介[3]、相馬 亜希子[4]、安藤 昭一[1]（[1]千葉大院・融合科学、[2]静理工大・理工、[3]鳥取大院・工学、[4]千葉大院・園芸）

○Ayami Kikuchi[1], Akihiro Saito[1,2], Masayo Tomita[1], Shinsuke Ifuku[3], Akiko Soma[4], Akikazu Ando[1] ([1]Graduate School of Advanced Integration Science, Chiba University, [2]Faculty of Science and Technology, Shizuoka Institute of Science and Technology, [3]Graduate School of Technology, Tottori University, [4]Graduate School of Horticulture, Chiba University)

【目的】キトサンを検出するためのプローブは未だ極めて少ない。*Bacillus circulans* MH-K1 株由来キトサナーゼは、キトサンを加水分解する酵素である。その活性中心残基の一つ Glu37 を Gln に置換した変異型キトサナーゼ E37Q は、キトサン結合活性はあるがキトサン加水分解活性はほとんどない。本研究では、E37Q を利用したキトサン検出用プローブの開発を目的とした。

【方法と結果】E37Q の N 末端に GFP を融合したタンパク質（以下、GFP-E37Q とする）を大腸菌で生産し、精製した。GFP-E37Q と、小麦胚芽レクチンを Cy5 で標識したもの（以下、Cy5-WGA とする）で多糖を二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。粉末キチン、粉末キトサン、粉末セルロース、キチンナノファイバー、キトサンナノファイバー、セルロースナノファイバー、コロイダルキチンおよびコロイダルキトサンを染色したところ、キチン類とキトサン類がすべて GFP-E37Q および Cy5-WGA で染色された。キチン類は主に Cy5-WGA で強く染色され、キトサン類は主に GFP-E37Q で強く染色される傾向が見られた。粉末セルロースとセルロースナノファイバーはまったく染色されなかった。一方、細胞壁にキトサンを持つとされる接合菌と、キトサンをほとんど含まないとされる子嚢菌に対して、同様の二重染色を行った。接合菌は GFP-E37Q で染色され、子嚢菌は Cy5-WGA で染色された。

chitosanase, chitosan, probe

講演番号:3C10a15
講演日時、会場:3月24日11:54～ C校舎10会場

*Vibrio*属細菌の分泌するキチンオリゴ糖デアセチラーゼの精製と諸性質の決定

Purification and characterization of chitin oligosaccharide deacetylase produced by *Vibrios*

○前原 佑哉[1]、上原 理絵[2]、坂木 祐太[2]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化）

○Yuya Maebara[1], Rie Uehara[2], Yuta Sakaki[2], Takako Hirano[2], Wataru Hakamata[1,2] and Toshiyuki Nishio[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci., Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】*Vibrio*属はキチナーゼ分泌によって、海底土壌中に蓄積されたキチンからキチンオリゴ糖、中でも主に$(GlcNAc)_2$を生成し、栄養源としている。また近年、一部の*Vibrio*属がキチンオリゴ糖デアセチラーゼ(COD)を分泌することで、$(GlcNAc)_2$の還元性末端側のみを脱アセチル化してヘテロ二糖(GlcNAc-GlcN)を生成することが明らかとなっている。我々はこれまでに、GlcNAc-GlcNはCOD生産菌にとっては栄養源だけでなく、細胞の遊走性、キチナーゼ生産誘導といった生理作用を示すことを解明した。CODはこのGlcNAc-GlcN生産におけるキーエンザイムであるが、極微量しか分泌されないためCOD生産菌自体の報告も少なく、単離され酵素化学的性質を調べられた菌株は僅かである。しかし、我々は既報のCOD遺伝子と高い相同性を有する遺伝子を数種の*Vibrio*属細菌から新たに発見した。そこで、この中から2菌株由来のCOD遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いて大量発現を行い、発現タンパク質の精製と酵素化学的性質の決定を目的とした。

【方法と結果】これまでに我々は、*Vibrio parahaemolyticus* KN1699 と *Vibrio* sp. SN184 由来 COD のリコンビナント体の生産と精製方法を確立し、報告してきた。今回は、新たに COD 遺伝子を有することが判明した *Vibrio campbellii* NBRC15632 とゲノム配列中に COD 遺伝子と相同性が高い配列を有する *Vibrio harveyi* ATCC BAA-1116 由来 COD のリコンビナント体の生産と精製方法の確立を行った。まず、各菌株に適したプライマーを設計し、各々のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、シグナル配列を含む目的遺伝子を得た。この遺伝子をタンパク質発現用ベクターへ組み込み、大腸菌に形質転換した。これを培養し、培地中に分泌されたリコンビナント COD(rCOD)を得た。続いて、rCOD を培養上清から硫安塩析、透析によって回収し、陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーにより電気泳動的に単一になるまで精製した。また、*V. parahaemolyticus* KN1699 と *Vibrio* sp. SN184 リコンビナント体においても同様にタンパク質精製を行った。本発表では、これらの精製 rCOD の酵素化学的性質の決定とその比較について報告する。

chitin oligosaccharide deacetylase , purification , characterization

講演番号：3C10p01
講演日時、会場：3月24日13:49～ C校舎10会場

酵母におけるプロリン合成の鍵酵素グルタミルキナーゼの機能解析

Functional analysis of γ-glutamyl kinase from *Saccharomyces cerevisiae*

○立橋 祐樹、田坂 侑美、戒能 智宏、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Yuki Tatehashi, Yumi Tasaka, Tomohiro Kaino, Hiroshi Takagi (Nara Institute of Science and Technology)

【目的】 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のプロリン（Pro）合成は、γ-グルタミルキナーゼ（GK）の活性が最終産物の Pro によってフィードバック阻害を受けることで制御されている。酵母など多くの微生物の GK は N 末端側のキナーゼドメインと C 末端側の pseudouridine synthase and archaeosine transglycosylase（PUA）ドメインから構成されている。一方、*Campylobacter jejuni* や *Streptococcus thermophilus* などの GK には PUA ドメインが存在していないが、GK 活性を示す。PUA ドメインは RNA 結合モチーフの一つであり、多くの生物に広く保存されたドメインである。そのほとんどは pseudo1uridine synthase や tRNA-guanine transglycosylase などの RNA 修飾酵素やリボソーム合成タンパク質に存在しているが、GK における PUA ドメインの機能には不明な点が多い。本研究では、酵母 GK における PUA ドメインや両ドメイン間のリンカー領域（67 残基）を含む C 末端領域の機能解析を行った。

【方法】 PUA ドメインやリンカー領域が GK 活性に与える影響を調べるため、野生型および PUA ドメインとリンカー領域を含む C 末端領域を削除した種々の GK 遺伝子を構築し、大腸菌と酵母の発現用ベクターにクローニングした。各プラスミドを大腸菌と酵母の GK 遺伝子破壊株（大腸菌：KC1325*ΔproB*, 酵母：BY4741*Δpro1Δcar2*）にそれぞれ導入し、得られた形質転換体について Pro 要求性の相補実験を行った。また、野生型および C 末端領域を削除した GK を組換えタンパク質として精製し、GK 活性の測定を行った。

【結果】 Pro 要求性大腸菌に各プラスミドを導入したところ、野生型 GK および PUA ドメインのみを削除し、リンカー領域を完全に残した GK（kd+67）では、Pro を含まない最少培地で生育が見られ、Pro 要求性を回復した。しかし、kd+67 では野生型 GK より生育の遅延が見られ、酵素活性も野生型 GK の約 1%に低下していた。一方、キナーゼドメインと PUA ドメインを繋ぐリンカー領域を削除した GK（kd+PUA）では Pro 要求性を回復しなかった。また、C 末端を削除した GK を発現させたところ、すべての組換えタンパク質が可溶性画分に検出されたが、機能相補しなかったタンパク質では存在量が少なかった。次に、PUA ドメインを完全に残してリンカー領域の長さを種々に変えた GK を作製し、Pro 要求性酵母を用いて同様の実験を行った。その結果、PUA ドメインを残してもリンカー領域が一部でも欠けると、Pro を含まない最少培地で生育できず、GK の機能を相補しなかった。以上の結果から、両ドメイン間のリンカー領域が GK 活性に必須であることが判明した。また、PUA ドメインは GK 活性の発現に必須ではないが、高い活性の維持に重要な役割を担っていることが示唆された。現在、GK の PUA ドメインと RNA 間に相互作用があるかどうか検討中である。

gamma-glutamyl kinase, PUA domain, proline

講演番号：3C10p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ C校舎10会場

タイトル: *Streptomyces* sp. A5株のエンドグルカナーゼ遺伝子（*celA*）のクローニングと発現
Title: Cloning and expression of the endoglucanase gene, *celA* from *Streptomyces* sp. strain A5.
○伊藤 史浩、渡邉 貴謙[1]、福森 文康（東洋大院・生命、[1]東洋大・生命）
○Fumihiro Ito, Takanori Watanabe[1], Fumiyasu Fukumori (Grad. Sch. and Fac. [1] of Life Sci., Toyo Uni.)

【目的】これまでに、*Bacillus*属や真菌の生産する多くのエンドグルカナーゼ(EG)の生化学的性質が報告され、それらをコードする遺伝子がクローニングされている。放線菌のEGについては、ゲノム解析により多くのDNA情報がもたらされているが、生化学的な解析のなされたものは限られ、アルカリ域で活性を示すEGに関する報告例は極めて少ない。我々は、環境試料から単離した*Streptomyces* sp. A5株が、アルカリ域でもカルボキシメチルセルロース(CMC)の分解活性をもつ約30kDaのEG (CelA) を生産し、コンゴレッド染色による活性染色により、CelAがガラクトマンナン分解性を併せ持つ可能性が高いことを見いだしている。本研究では、A5株のCelAの基質特異性と、その存在意義についての知見を得ることを目的に、*celA*遺伝子のクローニング、および大腸菌を用いた*celA*遺伝子の発現を試みたので報告する。
【方法・結果】Q-TOF-MS/MSによるCelAの内部ペプチド配列の解析結果に基づいて縮重プライマーを作製し、PCRによりCelAの内部をコードするDNA断片の増幅を行った。得られたDNAがコードするアミノ酸配列が既知の放線菌のEGのものと高い相同性を示したため、インバースPCR法により*celA*遺伝子全長を含む周辺領域をクローニングした。A5株の*celA*遺伝子は388アミノ酸をコードしており、CelAのN末端アミノ酸配列との比較から、87アミノ酸からなるシグナルペプチドをもつものと考えられた。成熟CelAは約33kDaの分子質量をもつと推定され、SDS-PAGEによる解析結果と一致していた。CelAのアミノ酸配列は、既知のEG、特に*Streptomyces*や*Nocardiopsis*に属する放線菌の生産する多数のセルラーゼと、その全域において60%を超える高い相同性を示したが、最も類似したものは*S. pristinaespiralis*のキトサナーゼ（相同性72%）であった。CelAがCMC以外の基質を分解するか否かを確認するために、pETシステムを用いて大腸菌における大量発現を試みた。大腸菌BL21(DE3)株において、CelAのC末端にHisタグを付加するように*celA*をpET-30に組み込みCelA-Hisの発現を試みたが、SDS-PAGEではCelA-Hisと考えられるタンパク質の存在が確認できなかった。リアルタイム定量PCRにより、*celA*-His mRNAが極めて大量に合成されることが確認されたことから、CelA-Hisが蓄積しない理由として、同タンパク質が不安定であり速やかに分解される、あるいは放線菌固有のコドン頻度により翻訳が不完全であることが考えられた。大腸菌のレアコドンをもつ転移RNAを補完した大腸菌BL21(DE3)を用いて同様に発現を試みたところ、CelA-Hisの大量発現は認められなかったが、*celA*遺伝子を含む組換え大腸菌をCMC含有のプレート上で培養して活性染色を行ったところ、CMCの分解が確認された。現在、大腸菌におけるタグなし、およびN末端側にHisタグや他のタグを付加したCelAの大量発現を試みている。CMC以外の多糖の分解性等の酵素化学的性質も、併せて報告する予定である。

Keyword1 endoglucanase, Keyword2 *Streptomyces* sp. , Keyword3 expression

講演番号：3C10p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ C校舎10会場

*Lumbricus rubellus*由来エンドグルカナーゼのクローニング

cDNA Cloning of an endoglucanase gene from earthworm, *Lumbricus rubellus*

赤澤 真一、○横山 圭佑、五十嵐 佑樹、雪 真弘[1]、森川 康[1]、小笠原 渉[1]、（長岡高専・物質工、[1]長岡技科大・生物系）

Shin-ichi Akazawa, ○Keisuke Yokoyama, Yuki Ikarashi, Masahiro Yuki[1], Yasushi Morikawa[1], Wataru Ogasawara[1], (Dept. Mat. Eng., Nagaoka Natl. Col. Tech., [1]Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech.)

【目的】近年，エネルギー源の多様化が求められており，太陽光，風力，バイオマス等が新エネルギー源として考えられている．中でもバイオマスを用いた新エネルギー開発は，脱石油を目指した研究であり，エネルギー源になるだけでなく，バイオマスから化成品を作る「バイオリファイナリー」に繋がる意味でさらに注目されている．しかしながら，バイオリファイナリーのコア技術であるバイオマスの酵素糖化は困難であり，さらに使用酵素のコストが掛かることから，より高機能な新規糖化酵素（セルラーゼ）が求められてきた．そこで，近年シロアリやアワビ等動物セルラーゼの解析が進められ，動物セルラーゼは微生物由来のものより高い比活性を有し，セルロース結合ドメインを持たない等, 特徴的な性質を有することが明らかとなってきた. そこで，我々は糖質加水分解酵素群を豊富に有するアカミミズ（*Lumbricus rubellus*）に着目し研究を進め，2種のエンドグルカナーゼ（EG）(*Lr*EG1，*Lr*EG2)を単離精製し諸性質を決定してきた[1]．その結果，特に*Lr*EG1はシロアリ等と比べてもカルボキシメチルセルロース（CMC）に対し高い比活性を有することを明らかにした．そこで，本研究ではさらに詳細に解析するため*LrEG1*のクローニング及び大腸菌での発現解析を試みた．

【方法・結果】アカミミズ*L. rubellus*，シマミミズ*Eisenia andrei*，フトミミズ*Pheretima hilgendorfi* の*β*-1,4-endoglucanase遺伝子の部分配列を基にプライマーを設計し，1,100 bpの断片を取得した．次に，5’RACE，3’RACEを行い，*LrEG1*の全長cDNA配列 (1,371 bp) を決定した．推定アミノ酸配列中に，精製酵素より同定した内部アミノ酸配列が含まれていたことから，クローニングした遺伝子が*LrEG1*であることが確認された．系統解析の結果，*Lr*EG1は明らかに糸状菌等とは異なるグループに属していた．現在，大腸菌に*Lr*EG1を融合タンパク質として発現させ，本酵素と相互作用するタンパク質の解析を試みている．

本研究は科学技術振興機構研究成果最適展開支援事業（A-STEP）の一環として行われた．

[1] 赤澤真一，五十嵐佑樹，遣水潤，横山大地，中澤光，森川康，小笠原渉．*Lumbricus rubellus* に含まれるエンドグルカナーゼの諸性質とバイオマス糖化能力の検討．日本生物工学会．2010年10月．要旨集p. 70．宮崎．

Keywords: *Lumbricus rubellus*, endoglucanase, earthworm

講演番号：3C10p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎10会場

ミミズ（*Eisenia foetida*）由来の低温適応性エンド 1,4-β-グルカナーゼ遺伝子の発現

Expression and characterization of a cold-adapted endo-1,4-β-glucanase gene from *Eisenia foetida*

○上田光宏、伊藤彰紘、中澤昌美、宮武和孝、坂口実[1]、井上國世[2]
（阪府大院・生環科、[1]大薬大・薬、[2]京大院・食生科）
○Mitsuhiro Ueda, Akihiro Ito, Masami Nakazawa, Kazutaka Miyatake, Minoru Sakaguchi[1], Kuniyo Inouye[2] (Osaka Prefecture Univ, [1]Osaka Univ. of Pharm. Sci., [2]Kyoto Univ.)

【目的】植物バイオマスの糖化は高温条件でなく低温条件で糖化する方が加温するためのエネルギーを節約できることから、低温条件での糖化が望まれる。しかしながら、高温条件で耐熱性酵素を用いて糖化されているのが現状である。そこで、これまでの酵素の弱点を補える能力を有するとともに、工業的に利用価値の高い酵素のスクリーニングを行ったところ、土壌動物であるシマミミズ（*Eisenia foetida*)に目的に見合う糖質分解酵素が存在することを見出した[1、2、3)]。ミミズ破砕後の粗抽出液中には結晶性セルロースやヘミセルロースに対する分解能力が高く、しかも低温･酸性条件下でも高活性を示す酵素が存在することを見出した。そこで、まずCarboxymethyl cellulase（CMCase）を精製し、その性質を調べた。本酵素は、低温（20℃)、酸性条件下で高い比活性を有することやセルロソーム様の複合体を形成していることを見出した[2)]。次に*E. foetida* 由来の エンド-1, 4-β-グルカナーゼ（EF-EG2）遺伝子のクローニングを行った。BLASTによる相同性検索を行った結果、本酵素は無脊椎動物由来のGH family 9に属する エンド-1,4-β-グルカナーゼと高い相同性が見られた。本研究では、ミミズ由来のエンド-1,4-β-グルカナーゼ遺伝子の発現を行ったので報告する。

【方法】*E. foetida* 由来の EF-EG2 遺伝子の mature タンパク質をコードする領域を pCold 1 ベクターに挿入し、発現ベクターの構築を行った。このプラスミドを用いて *E. coli* ArcticExpress を形質転換し、低温条件下で発現を行った。培養後の大腸菌を回収し、破砕後の上清を粗酵素液とした。Ni-Sepharose 6 Fast Flow 並びに陰イオン交換クロマトグラフィーにより酵素を精製した。

【結果】各種クロマト操作により精製した EF-EG2 を用いて酵素の性質を調べた。本酵素の分子量は 50,000 で、可溶性の基質である CMC に対して高い活性が見られたが、不溶性のセルロースパウダー、アビセルに対してはほとんど活性が見られなかった。本酵素の最適 pH は 5.5、最適温度は 40℃で低温活性も見られた。また、TLC を用いてセロオリゴ糖の分解産物を調べた。その結果、本酵素はエンド型であることを示す結果を得た。

1) M. Ueda et al., Comp. Biochem. Physiol. B., 151, 381-385 (2008).
2) M. Ueda et al., Comp. Biochem. Physiol. B., 157, 26-32 (2010).
3) M. Ueda et al., Carbohyd. Polymer, 46, 1711-1716 (2011).

1,4-beta-glucanase, cold-adapted enzyme, earthworm

講演番号:3C10p05
講演日時、会場:3月24日14:33～ C校舎10会場

黒穂病菌由来の新規グリコシルホスファチジルイノシトールアンカーβ-1,3-グルカナーゼ

A novel glycosylphosphatidylinisotol-anchored β-1,3-glucanase from *U. esculenta*.

○中島将博、山下哲郎[1]、竹田匠（岩手生工研、[1]岩手大・農）
○Masahiro Nakajima, Tetsuro Yamashita[1], Takumi Takeda (Iwateseikouken, [1]Iwatedai)

【目的】黒穂病菌(*Ustilago esculenta*)はイネ科植物であるマコモに感染し、秋の出穂期における花茎の異常な伸長肥大成長を引き起こす。伸長肥大成長には植物細胞壁の部分分解による緩みが必要である。また肥大成長期には黒穂病菌の菌糸の伸長も見られる。したがって、肥大成長部位では宿主および病原菌由来細胞壁分解を行う様々な酵素が分泌されると考えられる。黒穂病菌の純粋培養を行うとβ-1,3-グルカンに対して最も高い分解活性が認められたため、本研究では培養上清中のβ-1,3-グルカン分解酵素の同定と機能解析を行った。
【方法】ラミナリン（β-1,3-グルカン）分解活性を指標に培養上清中のβ-1,3-グルカナーゼの部分精製を陰イオン交換、弱陽イオン交換および強陽イオン交換の３つのカラムにより行った。SDS-PAGEにより分離したタンパク質のキモトリプシン消化を行い、得られたペプチドをLC/MS/MSで解析し、目的酵素の同定と遺伝子クローニングを行った。この酵素をコードする遺伝子を麹菌に導入し、リコンビナント酵素の局在を免疫ブロット法により調べた。そして、多糖、ラミナリオリゴ糖に対する基質特異性を調べた。また、各肥大成長段階の肥大成長部位におけるこの遺伝子の発現をRT-PCRにより調べた。
【結果】培養上清の部分精製により、活性画分のSDS-PAGE上に60, 40と30kDaのバンドが検出された。LC/MS/MSの結果、60kDaのバンドからは*Sporisolium reilianum*β-グルカナーゼ(Glycoside hydrolase family(GH) 16)と高い相同性を示すペプチドが得られたが、他の２つからは得られなかった。この遺伝子配列を基に60kDaタンパク質をコードする遺伝子のクローニングを行いGH16に属するβ-グルカナーゼ(*UeLam16A*)を同定した。UeLam16Aは理論分子量39kDaの酵素であり、C末にグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーシグナル配列の存在が予想された。そこで、リコンビナントUeLam16Aの局在を調べたところ、UeLam16Aは膜画分と培養上清画分に検出され、細胞壁画分には検出されなかった。次にUeLam16AのGPIアンカーシグナル配列を欠失させると膜画分への局在が全く検出されなかった。さらに、膜画分に結合したUeLam16Aをホスファチジルイノシトール依存的ホスホリパーゼCで処理すると膜画分のUeLam16Aがすべて遊離した。以上の結果から、UeLam16AのC末はGPIアンカーシグナル配列であることが明らかとなった。UeLam16Aの基質特異性を調べると、β-1,3-グルカンのみに活性を示し、他の多糖には全く活性を示さなかった。ラミナリオリゴ糖を基質にすると、5糖以上の基質に対して高い活性を示した。UeLam16Aの局在と基質特異性から、この酵素は黒穂病菌自身の細胞壁の構成、分解に関与することが推察された。また、*UeLam16A*遺伝子は肥大成長の初期に発現することから、花茎の肥大成長の引き金となることが推測された。

Ustilago esculenta, glycosylphosphatidylinositol, β-1,3-glucanase

講演番号:3C10p06
講演日時、会場:3月24日14:44～ C校舎10会場

Pestalotiopsis sp. AN-7由来エンドグルカナーゼのpH及び温度安定性の解析

Stability toward pH and temperature of endoglucanase from *Pestalotiopsis* sp. AN-7

○水野 正浩、森川 祐介、野﨑 功一、天野 良彦（信州大院工・物質工）
○Masahiro Mizuno, Yusuke Morikawa, Kouichi Nozaki, Yoshihiko Amano (Shinshu Univ.)

【目的】海洋環境より単離された不完全性子嚢菌*Pestalotiopsis* sp. AN-7が生産するエンド型セルラーゼ endo-β-1,4-glucanase（Cel5A）は、325アミノ酸酸残基からなるGH family 5に分類されるセルラーゼである。野生菌から精製されたCel5Aは、今までの研究から、比較的高い温度安定性や耐塩性を有することが明らかとなっているが、これらの性質に関する詳細は未だに明らかになっていない。本研究では、Cel5Aを麹菌で異種発現させた組換えCel5A（rCel5A）を用いて、基礎的な酵素学的諸性質を測定すると同時に、熱及びpHに対する安定性について解析を行った。
【方法】形質転換した麹菌を4日間培養し、培養上清から硫安沈殿によってタンパク質を回収した。その後、陰イオン交換及びゲル濾過カラムによって精製を行った。基質特異性として、カルボキシメチルセルロース（CMC）、*p*-ニトロフェニル誘導体（pNPG1、pNPG2、pNPL）、リン酸膨潤セルロース（PASC）、不溶性セロオリゴ糖（ICOS）、Avicel、バクテリアセルロース(BC)及び、キシランに対する比活性を測定した。pNP基質については生成pNP量を420 nmにおける吸光度測定により、それ以外の糖質については生成還元糖量をSomogyi-Nelson法によって測定した。至適反応温度は30℃から70℃の範囲で変化させて10分間酵素反応を行った。至適反応pHは3から10の範囲で変化させ、反応温度40℃で還元糖量を測定した。好塩性の解析では、終濃度で0から2.0 mol/lのNaClを添加し、40℃、pH4.0の条件で酵素反応を行い、DNS法により生成還元糖量を測定した。また温度及びpH安定性は、温度やpHを組み合わせた処理条件にて酵素溶液をインキュベーションした後、40℃、pH4.0の反応条件で活性測定を行うことで決定した。温度安定性としては、30℃から100℃について、pH4.0または7.5の条件下で30分処理した。なお30℃以上の熱処理を行った場合は、処理後10分間の氷冷を行った後酵素反応に用いた。pH安定性としては、pH3から11について、4℃の条件下で24時間処理した。
【結果】rCel5AはCMCに対して最も高い比活性値31.6 U/mlを示し、それ以外ではPASC、ICOS、Avicel、BCの順で活性が低くなった。これは結晶性の高い基質ほど反応性が低いことを示している。また、各種pNP基質及びキシランに対しては活性を示さなかった。至適反応条件は55℃、pH4.0であった。好塩性に関して、反応系内のNaCl濃度が300 mMのとき200%以上の活性の上昇を示し、2 MのNaCl存在下においても約180%の活性上昇が認められた。温度安定性はpH4.0で熱処理を行った場合は30℃から50℃で80%以上の活性を保持したものの、60℃以上では完全に失活した。一方、pH7.5で熱処理を行った場合、70℃以下で90%、100℃でも10%ほどの活性を維持する結果になった。以上のことから、本酵素の熱安定性は、pHによって大きく影響を受けることが明らかとなった。pH安定性は、pH2.5から10.3で80%以上の活性を保持しており、広い範囲で安定であることが分かった。

cellulase, endoglucanase, thermostability

講演番号：3C10p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎10会場

タイトル　シイタケより精製された新規GHファミリーGH128に属するβ-1,3-グルカナーゼ
Title　β-1,3-glucanase purified from *Lentinula edodes* belongs to New GH family, GH128
○坂本　裕一、中出　啓子[1]、金野　尚武（岩手生工研、[1]株式会社ツムラ）
○Yuichi Sakamoto, Keiko Nakade, Yuichi Sakamoto[1]（IBRC, [1]TUMURA Co.）

【目的】シイタケは、収穫後急速に老化し、自己分解を起こす。自己分解過程では、主に細胞壁の溶解が起こっている。シイタケの細胞壁成分は主にキチンとβ-1,3-1,6-グルカンからなっており、β-1,3-1,6-グルカンの一部はレンチナンとして抗がん治療に用いられている。レンチナンは収穫後に起きる自己分解過程で、細胞壁分解酵素により分解されてしまうことから、収穫後にその含量が急速に減少することが明らかになっている。そこで、我々はレンチナン分解酵素を明らかにし、レンチナン分解を抑制する目的で、シイタケ収穫後に発現しているβ-1,3-1,6-グルカナーゼの解析を行っている。すでに、エキソ型β-1,3-1,6-グルカナーゼEXG2とエンド型β-1,3-1,6-グルカナーゼTLG1の精製を行っている。さらに一昨年度新規β-1,3-1,6-グルカナーゼGLU1を報告したが、新たに本酵素が新規GHファミリーGH128に登録されたことを報告する
【方法】酵素の精製は、25℃で保存した4日目のシイタケ子実体より行った。液体窒素で粉砕したシイタケ子実体をリン酸バッファーで懸濁し、タンパク質を抽出した後、疎水クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過にて精製を行った。得られた精製酵素GLU1のN末端決定後、遺伝子のクローニングを行った。得られた配列を用いて、相同性検索等の各種解析を行った。リアルタイムPCR法にて、*glu1*遺伝子の発現量の解析を行った。ペプチド抗体を作成し、ウェスタン解析を行った。また、精製酵素を用いて、各種酵素学的解析に供した。
【結果】シイタケ保存4日目の子実体からは、少なくとも2種類のエンド型β-1,3-グルカナーゼが検出され、一つはTLG1であり、もう一方は新規のβ-1,3-グルカナーゼGLU1であった。TLG1、GLU1ともに分子量が約25kDaであったが、両遺伝子をクローニングした結果、全く異なるグルカナーゼであることが明らかになった。TLG1は既にβ-1,3-グルカナーゼ活性が報告されていたThaumatin-like proteinと相同性が高かったが、GLU1は既知の糖質加水分解酵素とは高い相同性を示さなかった。一方、多くの菌類などのゲノム配列に存在するhypothetical proteinと低いながらも相同性を示した。それら一群の遺伝子配列中にはβ-1,3-1,6-グルカナーゼと関連するモチーフは検出されなかった。しかしながら、精製したGLU1、*Phichia pastoris*で発現させた組換え酵素ともに明らかにβ-1,3-1,6-グルカナーゼ活性を示した。そこで、GLU1を含む酵素群は、糖質関連酵素データベース（CAZy）に新たな糖質加水分解酵素（GH128）として登録された[1)]。GLU1は低いながらもレンチナン分解活性を持ち、収穫後に急激に発現量が上昇することから、TLG1、EXG2とともに、収穫後のレンチナン分解に関わっていることが示唆された。

1) Sakamoto et al. (2011) Applied and Environmental Microbiology: 77:8350-8354

シイタケ，β-1,3-グルカナーゼ，レンチナン、糖質加水分解酵素、CAZy

講演番号:3C10p08
講演日時、会場:3月24日15:16～ C校舎10会場

グルコースにより活性化されるユニークなメタゲノム由来BGL

Glucose activation of an unique beta-glucosidase from metagenomic library

○矢追　克郎[1]、城　俊徳[2]、伏信　進矢[2]、若木　高善[2]、宮崎　健太郎[1,3]（[1]産総研生物プロセス、[2]東大院農生科、[3]東大院新領域）

○Katsuro Yaoi[1], Jo Toshinori[2], Fushinobu Shinya[2], Wakagi Takayoshi[2], Kentaro Miyazaki[1,3]([1]BPRI, AIST,[2]Biotechnology, Univ Tokyo,[3]Frontier Sciences, Univ Tokyo)

【目的】セルロース系バイオマスの酵素糖化において、現在最も利用されているのが糸状菌トリコデルマが産生する酵素製剤である。トリコデルマ酵素製剤は、最も強力であるもののひとつであるが、ベータグルコシダーゼ（BGL）の活性が低いことが弱点の一つとして挙げられている。そこで我々は、環境中の微生物遺伝子資源を培養することなく利用するメタゲノム手法を用いて、新規で有用なBGLの探索を行った。BGLの弱点として、生成物阻害（グルコースによる活性阻害）が挙げられるため、得られたクローンから特にグルコース耐性に着目して絞り込みを行った。その結果、優れたグルコース耐性でバイオマス酵素糖化に有用な効果を示すだけでなく、非常にユニークな性質を有するBGLを獲得したので紹介する。

【方法と結果】堆肥や温泉などの様々な環境からDNAを抽出し、大腸菌を宿主としたメタゲノムライブラリーを作製した。そこから、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルコピラノシドの分解活性を指標に発現スクリーニングを行った。得られた膨大なクローンの中から、グルコース存在下でも活性なクローンを絞り込み、グルコース耐性BGLを多数獲得した。それらを高発現系にサブクローニングし、酵素活性の詳細な性状解析を行ったところ、そのうちのGH1の属する１つのクローンでは、優れたグルコース耐性だけではなく、グルコース存在下では逆に活性が向上するという非常にユニークな性質が見いだされた。この活性賦活化はグルコース特異的であり、他の単糖やオリゴ糖では認められなかった。本酵素のX線立体構造解析を行ったところ、リガンドフリー、イソファゴミン（阻害剤）、フコースの存在下で、いずれも1.6Å以上の高分解能での構造決定に成功した。特に、フコース複合体では1.1Å分解能という高い分解能での解析に成功した。現在は、立体構造を基にした変異導入やランダム変異導入などの手法により、このユニークな性質の分子メカニズム解明を試みている。

glucosidase,　metagenome

講演番号：3C10p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎10会場

Trichoderma reesei 3種β-グルコシダーゼの生理的役割

Physiological role of three β-glucosidases in *Trichoderma reesei*

○鈴木 尊久、長戸 拓也、齋藤 勇司、小松 光子、落合 伸廣、中澤 光、小笠原 渉、岡田 宏文（長岡技科大・生物）

○Suzuki Takahisa, Nagato Takuya, Saito Yuji, Komatsu Mitsuko, Ochiai Nobuhiro, Nakazawa Hikaru, Ogasawara Wataru, Okada Hirofumi (Nagaoka Univ Technol)

【目的】セルラーゼを大量に分泌生産する糸状菌*Trichoderma reesei*は、10種のβ-グルコシダーゼ(BGL)遺伝子を持つことがゲノム配列により明らかになっている。このうちBGL I (Cel3A)、BGL II (Cel1A)およびCel3Cの3種が、微結晶性セルロース (Avicel)を炭素源として培養した時に発現していることが分かっている。この中でBGL Iはシグナル配列を有しているために菌体外へ分泌され、BGL IIおよびCel3Cは菌体内において発現していると考えられる。また、Avicel培養時におけるBGL IIおよびCel3Cの転写量は、BGL Iの発現量の約3倍であり、BGL活性の多くが菌体内に存在していると考えられる。これまでに我々はBGL IおよびBGL IIを大腸菌で発現させ、その酵素学的性質を解明している。本研究では、これらBGLの*T. reesei*における生理的役割を明らかにするため、*T. reesei* QM9414株を野生株として、この3種BGL遺伝子破壊株を用いて培養を行い、野生株との生育や酵素活性の比較を行った。

【方法】野生株*T. reesei* QM9414株および各BGL遺伝子破壊株を、CellobioseあるいはAvicelを炭素源とした*T. reesei*液体培地で培養した。遠心分離により、培養上清と菌体とに分離して回収し、菌体はガラスビーズにより破砕して菌体破砕液を得た。これら培養上清のCarboxymethylcellulose (CMC)分解活性と、培養上清および菌体破砕液のCellobiose分解活性、*p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (*p*NPG)分解活性およびタンパク質量を測定した。また、Avicelを炭素源とした培養では、培養上清の*p*-nitrophenyl-β-D-lactoside (*p*NPL)分解活性も測定した。

【結果】Avicelを炭素源とした培養では、各破壊株の培養上清および菌体破砕液のCellobiose分解活性および*p*NPG分解活性は、各酵素の局在性と基質特異性を反映するものであった。また、Δ*bgl2*株のみ培養上清および菌体破砕液のタンパク質量が減少した。

Cellobioseを炭素源とした培養では、上清のCMC分解活性はAvicel培養時よりも約1/100であり著しく低い値であったが、各破壊株の全体の傾向はAvicel培養時と同様であった。これらの結果から、各BGLの生理的な役割について考察した。

β-glucosidase, Trichoderma reesei, Cellulase

講演番号：3C10p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎10会場

分裂酵母を用いた *Aspergillus aculeatus* 由来 β-glucosidase I 生産系の構築

Expression of β-glucosidase I from *Aspergillus aculeatus* in fission yeast

禅院 進、岡田 和士、○東田 英毅（旭硝子・ASPEX事業部）
Susumu Zen-in, Katsunori Okada, ○Hideki Tohda（ASPEX Div., Asahi Glass Co., Ltd.）

【目的】セルロース系バイオマスから発酵原料としての単糖、さらにはバイオエタノールや乳酸などのバイオ燃料・化成品を生産するためには、植物細胞壁の主要な構成成分であるセルロースを効率よく分解する必要がある。近年のバイオテクノロジーの隆盛を背景に、セルロースを効率よく分解する目的で、酵素糖化法の研究開発が盛んに行われている。その反応過程において複数のセルラーゼが必要とされており、エンドグルカナーゼ・セロビオハイドラーゼとともに、セロビオースをグルコースに分解するβ－グルコシダーゼの存在が、効率的な分解には欠かせない。*Aspergillus aculeatus* はバイオマス糖化に優れた糖化酵素を分泌することが知られており、なかでも β-glucosidase I（BGL1）は、セロビオースの糖化に優れているため注目されている。また分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は組換えタンパク質生産用宿主として産業利用が行なわれているとともに、ミニマムゲノムファクトリーをはじめとする種々の有用宿主が作製されている。そこで、分裂酵母を宿主として *A. aculeatus* 由来 BGL1（AaBGL1）の発現を試みた。
【方法と結果】分裂酵母の高発現遺伝子型コドン使用頻度に合わせた AaBGL1 遺伝子を全合成し、染色体組込型ベクター（pSL6AaBGL1）および、分泌シグナルを分裂酵母高分泌型に置換したベクター（pSL6P3AaBGL1）を作製した。これらを用いて AaBGL1 の発現を試みた結果、シグナル置換により発現量が 7 倍増加し、pNPG 分解活性として約 40U/ml の発現を確認した。また分裂酵母のプロテアーゼ欠損株・分子シャペロン共発現株・糖鎖修飾欠損株を宿主として同様の検討を行なったところ、糖鎖修飾欠損株において発現量が 4 倍増加し、同時に BGL1 の分子量が 220 000 から 133 000 へ低下した。さらにエラープローン PCR などの変異導入手法を用い、AaBGL1 への耐熱性およびグルコース阻害耐性の付与を試みた。8 段階の変異導入を経て、耐熱性（67 ℃ 10 分処理後の残存活性率）、およびグルコース耐性（50 mM-グルコース存在下の残存活性率）が向上した変異酵素の取得に成功した。

現在、得られた変異BGL1の安定性、至適条件、活性阻害、基質特異性および比活性等の諸性質を解析するとともに、実バイオマスの糖化工程における、本酵素の汎用セルラーゼ製剤への添加効果に関して検討を進めている。

β-glucosidase, Aspergillus aculeatus, Schizosaccharomyces pombe

講演番号:3C10p11
講演日時、会場:3月24日15:49～ C校舎10会場

Aspergillus aculeatus 由来 β-glucosidase 1 のセロオリゴ糖分解能について

Hydrolysis of cellooligosaccharides by β-glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*

○馬場　祐太朗、谷　修治、炭谷　順一、川口　剛司（阪府大院・生環科）
○Yutaro Baba, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi (Grad Sch Life & Env Sci, Osaka Pref Univ)

【目的】当研究室では GH3 に属する *A. aculeatus* 由来 β-glucosidase 1 について研究を進めており、セロオリゴ糖の鎖長の上昇に従って比活性が上昇し、セロペンタオースに対して最も高い比活性を示すことや、セロビオースの分解を経時的に追跡すると、TLC では糖転移産物を検出することなくグルコースを生成すること等を明らかにしている。このようにセロオリゴ糖に対する比活性が高いことや、糖転移産物が少ないことから β-glucosidase 1 はセルロース系バイオマスの酵素糖化において非常に有用な酵素である。しかし上記 2 つの利点が糖転移産物を含めたオリゴ糖の高い分解能に起因するのか、低い糖転移活性そのものに起因するのかは不明である。現在のところ β-glucosidase 1 の基質特異性や酵素反応速度論、さらには糖転移産物についての詳細な解析は行われていなかったため、本研究では糖転移産物の特定や β-glucosidase 1 の基質となり得る β 結合の各種 2 糖を始めとするオリゴ糖に対する kinetic parameter を算出し、2 つの利点について酵素反応速度論的な観点から考察することを目的とした。
【方法と結果】まずは 2 糖としてラミナリビオース（β-1,3）、セロビオース（β-1,4）、ゲンチオビオース（β-1,6）、キシロビオース（β-1,4）を選択し、β-glucosidase 1 について GOD 法、および HPAEC-PAD を用いて各基質に対する kinetic parameter を算出した。
セロビオースとキシロビオースに対する kinetic parameter を算出した結果、K_m はそれぞれ 2.68±0.08、3.35±0.40 mM であり、k_{cat} はそれぞれ 219±2.9、0.47±0.09 s^{-1} であった。またセロビオースの分解過程において結合様式不明の 3 糖と、少し遅れてゲンチオビオースの生成がわずかに確認されたが、セロビオースが完全分解される頃には両者ともに分解されていることがわかった。このことからゲンチオビオースや 3 糖に関してもかなり効率よく分解していることが予想される。今後は他のオリゴ糖分解時に生成する糖転移産物の特定や、それらに対する kinetic parameter を算出し、β-glucosidase 1 の高いセロオリゴ糖分解能について考察する予定である。

Keyword1;β-glucosidase, Keyword2;*Aspergillus*, Keyword3;biomass

講演番号：3C10p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ C校舎10会場

麹菌由来β-グルコシダーゼの配糖体分解活性および発現誘導解析

Glycosides hydrolytic activity and gene expression analysis of beta-glucosidases from *Aspergillus oryzae*.

○工藤 佳那子，氏家 成隆，渡部 昭，新谷 尚弘，五味 勝也（東北大院農・生物産業創成）
○Kanako Kudo, Seiryu Ujiie, Akira Watanabe, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Grad Sch Agric Sci, Tohoku Univ)

【背景・目的】

我々は麹菌ゲノムデータベースをもとに作製したβ-グルコシダーゼ遺伝子の網羅的高発現株から、新規なβ-グルコシダーゼを精製して酵素学的諸性質の解明を行っている。そのうちBglAはGH family 3に属しており、同ファミリーに属する既知β-グルコシダーゼと類似した反応至適条件等を示した[1)]。しかし合成基質*p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside（pNPG）に対して極めて高い分解活性を示すにもかかわらず、一般的なβ-グルコシダーゼの基質であるセロビオースをほとんど分解しないという特徴が見出された。このことからBglAはセロビオースではなくpNPGと構造的類似性を持つ配糖体に対して高い分解活性を有する可能性が考えられた[2)]。そこで、本研究では麹菌由来のβ-グルコシダーゼと配糖体の関係について、各種配糖体に対する分解活性の有無を解析するとともに、発現誘導基質となりうるかについても解析したので報告する。

【方法・結果】

麹菌由来の既知β-グルコシダーゼのうち、セロビオースの分解活性が低くpNPGの分解活性が高いことが報告されているタイプ[3)]ならびに、それとは反対にセロビオースの分解活性が高くpNPGの分解活性が低いタイプ[4)]を新たに精製し、BglAと併せて各種配糖体に対する分解活性を測定した。その結果、pNPGの分解活性が高い酵素はアルブチンをはじめとする各種配糖体に対しても高い分解活性を有することが明らかとなった。また、これらの酵素遺伝子について炭素源に応じた発現プロファイルを調べたところ、興味深いことに配糖体はその分解活性をもつβ-グルコシダーゼ遺伝子の発現誘導基質でもある可能性が示唆された。

1) 工藤佳那子ほか：2010年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p. 256
2) 工藤佳那子ほか：2011年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p. 44
3) Ito *et al.*, *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **55**, 69-75 (2008)
4) Langston *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1774**, 972-978 (2006)

beta-glucosidase, glycoside, gene expression

講演番号：3C10p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎10会場

Aspergillus niger E-1 株由来のendo-1,4-β-xylanase (Xyl III) の精製および特性解析

Purification and characterization of endo-1,4-β-xylanase (Xyl III) from *Aspergillus niger* E-1

○高橋 結、後藤 正幸[1]、小宮 輝之[2]、村上 周一郎[1] (明治大院農・農化、[1]明治大農・農化、[2]恩賜上野動物園)

○Yui Takahashi, Masayuki Goto[1], Teruyuki Komiya[2], Shuichiro Murakami[1] (Meijidaiin, Meijidai, Onshiuenodobutsuen)

【目的】これまでに多くのセルロースおよびヘミセルロース分解真菌が自然界から分離されてきた。そこで我々はハイイロジェントルキツネザルの糞から植物細胞壁分解真菌の分離を試み、分離菌株の中からセルラーゼおよびキシラナーゼの生産性に優れていた*Aspergillus niger* E-1 株を得た[1)]。E-1 株の培養上精をザイモグラム分析に供した結果、本菌が少なくとも3種のキシラナーゼ（Xyl I、Xyl II、Xyl III）を生産していることを見出した。本研究では、これらの酵素の中で詳細な特性解析がなされていないXyl IIIを精製し、その特性解析を行った。
【方法】キシランおよびコハク酸塩を炭素源とする培地で培養し、得られた培養上清を粗酵素液として、凍結乾燥後、各種クロマトグラフィーを用いてXyl IIIを精製し、種々の特性を調べた。
【結果】最終調製物を Native-PAGE に供したところ、移動度の小さい位置に単一なバンドが観察され、本酵素が均一に精製されていることを確認した。精製酵素の至適温度は 55°C、至適 pH は 5.5 であり、SDS-PAGE における分子質量は 35 kDa であった。本酵素のアミノ酸配列を LC/MS/MS により分析した結果、*A. niger* 由来のエンド-1,4-β-キシラナーゼ A であることが明らかになった。現在、他の酵素化学的特性に関して解析中である。

1）高橋ら：日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集 p.159

Aspergillus niger, xylanase, xylan degradation

講演番号：3C10p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎10会場

タイ国汽水域ココナッツ農園土壌から分離したセルロース・ヘミセルロース分解能を有する新属・新種の好アルカリ好熱嫌気性細菌*Amorocellulobacter alkalithermophilum*

Amorocellulobacter alkalithermophilum gen. nov., sp. nov. an anaerobic alkalithermophile, cellulolytic-xylanolytic bacterium, newly isolated from soil in brackish area of coconut garden Thailand

○ Watthanalamloet Amornrat[1,2]、小杉 昭彦[1]、Sermsathanaswadi Junjarus[2]、Prawitwong Panida[1]、Deng Lan[1]、森 隆[1]、Ratanakhanokchai Khanok[2]（国際農研センター[1]、キングモンクット工科大[2]）

○ Amornrat Watthanalamloet[1,2], Akihiko Kosugi[1], Junjarus Sermsathanaswadi[2], Panida Prawitwong[1], Lan Deng[1], Yutaka Mori[1], Khanok Ratanakhanokchai[2](JIRCAS[1], KMUTT[2])

Lignocellulose, consisting of the three major polymers, i.e. cellulose, hemicellulose and lignin, is expected to be utilized as an abundant renewable resource. However, the plant cell wall is difficult to hydrolyze because the cellulose is surrounded by a lignin seal that has a covalent association with hemicellulose, and cellulose has a tightly packed crystalline structure. To find new saccharification system for lignocellulose, we carried out screening anaerobic microorganisms under alkali-thermophilic condition (pH9.5, 60 °C) using microcrystalline cellulose.

An obligately anaerobic, alkali-thermophilic and xylanolytic-cellulolytic bacterium, A6T strain, was isolated from soil in Thailand[1)]. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences revealed that the strain represented a new phyletic sublineage within the family Clostridiaceae, with 92.6% 16S rRNA gene sequence similarity to recognized species. On the basis of the phenotypic, genotypic and physiological evidence, strain A6T is proposed as representing a novel species of a new genus, for which the name *Amorocellulobacter alkalithermophilum* gen. nov., sp. nov. Physical analysis was characterized as an obligate anaerobe, a thermophile (growth at 50–65 °C; optimum 55 °C), an alkaliphile (growth at pH 8.0–10.0; optimum pH 9.5). In addition, *A. alkalithermophilum* can grow on Avicel, xylan and corn hull as carbon sources under alkali-thermophilic conditions (55°C, pH 9.5). These results suggest that cellulases and hemicellulases from *A. alkalithermophilum* A6T have the potential to make new saccharification process for lignocellulosic biomass using alkali-thermophilic conditions.

1) Watthanalamloet, A et-al., *IJSEM*, in press.

Cellulose, Thermophilic anaerobic bacteria , *Amorocellulobacter*

講演番号：3C10p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎10会場

Paenibacillus curdlanolyticus B-6が生産する酵素複合体のキシラナーゼサブユニットXyn11Aのグリシン/アスパラギンリンカー配列はキシラン分解能に重要である

Glycine and asparagine-rich linker of Xyn11A, major xylanase subunit in the multienzyme complex from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6, has an important role for xylan degradation ability.

Sermsathanaswadi Junjarus[1,2]、○小杉 昭彦[2], Watthanalamloet Amornrat[1,2]、Prawitwong Panida[2]、Deng Lan[2]、Ratanakhanokchai Khanok[1]、森 隆[2] (キングモンクット工科大[1], 国際農研センター[2])

Junjarus Sermsathanaswadi[1,2], ○Akihiko Kosugi[2], Amornrat Watthanalamloet[1,2], Panida Prawitwong[2], Lan Deng[2], Khanok Ratanakhanokchai[1], Yutaka Mori[2] (KMUTT[1], JIRCAS[2])

Paenibacillus curdlanolyticus B-6 showed effective degradation activities for xylan and cellulose, and produced an extracellular multienzyme complex containing several xylanases and cellulases. To characterize the multienzyme complex, we purified the complex from culture supernatants by four kind of chromatography[1)]. The purified multienzyme complex was composed of a 280 kDa protein with xylanase activity, two xylanases of 40 kDa and 48 kDa, and 60 kDa and 65 kDa proteins having both xylanase and CMCase activities. Cloning of the 40 kDa major xylanase subunit named Xyn11A revealed that Xyn11A contained two functional domains which belonged to glycosyl hydrolase family-11 and to carbohydrate binding module family-36, respectively, and a glycine and asparagine-rich linker.

To understand enzymatic properties of the multienzyme complex, we characterized the major xylanase subunit Xyn11A. Recombinant Xyn11A (rXyn11Aw) showed high endo-type xylanase activity for birchwood xylan and oat-spelt xylan. The catalytic activity of rXyn11Aw derivatives lacking CBM36 (rXynAx) or both CBM36 and the linker sequence (rXynAl) was assessed. Although there is no difference in xylanase activity between rXyn11Aw and rXynAx, rXynAl exhibited dramatically less xylan degradation ability. These results indicate that the glycine and asparagine-rich linker sequence of Xyn11A plays a key role in the xylan hydrolysis activity.

1) Pason, P et-al, Appl Microbiol Biotechnol. (2010) 85:573-580.

Keywords: Xylanase, *Paenibacillus curdlanolyticus*, linker sequence

講演番号：3C10p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎10会場

ヤマトシロアリ後腸共生原生生物由来GHF26 β-マンナナーゼの発現および酵素学的性質の解析

Heterologous expression, purification, and characterization of GHF26 β-mannanases from symbiotic protists in the hindgut of termite, *Reticulitermes speratus*

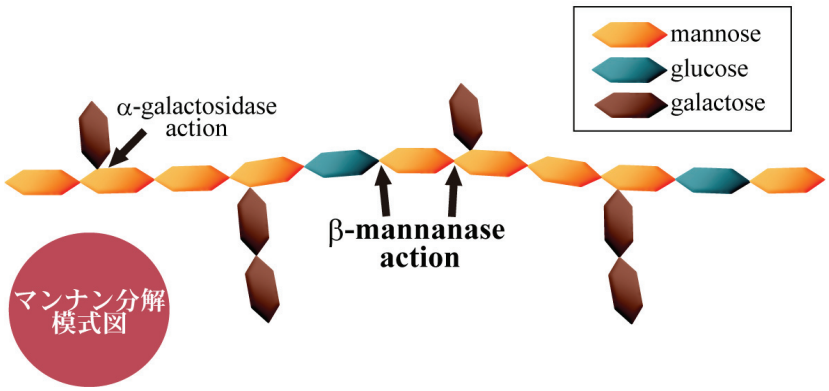
○塚越 光[1]、松井 真[1]、北本 勝ひこ[1]、守屋 繁春[2,3]、有岡 学[1]（[1]東大院・農生科、[2]横浜市立大、[3]理研基幹研）

○Hikaru Tsukagoshi[1], Makoto Matsui[1], Katsuhiko Kitamoto[1], Shigeharu Moriya[2,3], Manabu Arioka[1] ([1]Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, [2]Yokohama City Univ., [3]RIKEN ASI)

【目的】近年、地球温暖化や化石燃料の枯渇問題が表面化する中で、再生可能なエネルギー資源の一つとしてバイオマスが注目を集めている。なかでも非可食性の木質系バイオマスをバイオ燃料生産などへ利活用することが期待されるが、木質系バイオマスはセルロース、リグニン、ヘミセルロースから成る複雑な構造を有するため、分解が難しいことが障壁となっている。

シロアリは非常に高いバイオマス資化能力を持つ生物である。シロアリのバイオマス分解系においては、シロアリ自身の分泌する糖質加水分解酵素に加えて、腸内に共生する原生生物がバイオマスの分解に大きく寄与している。シロアリは内在性のヘミセルラーゼを持たないため、ヘミセルロースの分解に関しては腸内共生系が非常に重要な役割を果たすものと考えられる。本研究では、シロアリ腸内共生系の有する木材分解酵素のうち、ヘミセルロースの主要構成要素の一つであるマンナンを分解するβ-マンナナーゼに着目し、共生原生生物の木質系バイオマス分解システムにおけるこの酵素の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】ヤマトシロアリ*R. speratus*の腸内共生系原生生物由来の複数のGHF26 β-マンナナーゼについて、N末端にc-Mycおよび6×Hisタグを付加させメタノール資化性酵母*Pichia pastoris*を宿主に用いて生産を行った。その結果、いずれも*P. pastoris*形質転換体の培養上清中にβ-マンナナーゼ活性が確認された。続いて、Ni^{2+}アフィニティカラムクロマトグラフィーによって培養上清から各β-マンナナーゼを精製し、酵素液を取得した。現在、精製したβ-マンナナーゼ酵素液を用いてその酵素学的な性質を解析し、酵素間の比較検討を行っている。精製したβ-マンナナーゼによる基質マンナンの分解産物の解析、また木材分解活性についても現在検討を行っている。



cellulose, mannanase, termite

講演番号：3C10p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ C校舎10会場

放線菌マンナナーゼの分子構造の違いによるCBMの機能解析

Analysis of the function of the molecular architecture of CBM fused actinomycetes mannanase

○熊谷　祐也、臼木　博一[1]、川上　賀代子、向原　隆文、畑中　唯史
（岡山生物研、[1]学振・特別研究員）
○Yuya Kumagai, Hirokazu Usuki[1], Kayoko Kawakami, Takafumi Mukaihara, Tadashi Hatanaka
(RIBS Okayama, [1]JSPS PD)

【目的】マンナナーゼはヘミセルロース中のマンナンを加水分解する主要な酵素で植物バイオマスの分解に有効であり、それによって生じたオリゴ糖は家畜の腸内細菌叢の改善効果を示すものである。我々はバイオマス分解菌である放線菌のマンナナーゼの利用を目指して性状解析を行っており、これらのマンナナーゼは触媒ドメイン、リンカー、及びCarbohydrate-binding module（CBM）から成る構造を持つ。それら（全長）と触媒ドメインのみから成る酵素（MandC）の触媒効率を比較したところ、基質によりMandCの酵素においてk_{cat}及びK_mの変化に違いがあることが分かった。本演題では、これらのマンナナーゼの分子構造の違いに着目してその現象を明らかにすることを目的とした。
【方法】放線菌マンナナーゼの遺伝子は、*Thermobifida fusca*（TfMan）のものはゲノムDNAをテンプレートとしてPCRにより得た。また、*Streptomyces. thermolilacinus*（StMan）及び*S. thermoluteus*（StManII）はInversePCRによりそれぞれ得た。マンナナーゼの触媒ドメインから成るもの、リンカーとCBMをシャッフルしたコンストラクトはPCRにより制限酵素サイトを導入することにより作製した。これらは発現用ベクターpET28aに組み込み、宿主大腸菌として*E. coli* BL-Goldを形質転換することにより誘導発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。タンパク質濃度はBradford法により求めた。これらの酵素活性はマンナンを基質とし、還元糖量を3,5-dinitro salicylic acid（DNS）法により測定した。また触媒効率（k_{cat}/K_m）はLineweaver-Burk法又はnon-linear curve fitting法により評価した。
【結果】3種のマンナナーゼ及びそれらの触媒ドメインのみの酵素における不溶性マンナンに対する触媒効率を求めたところ、TfManにおいてK_mが大きく上昇したが、StMan及びStManIIではほとんど変わらなかった。また、3種の酵素においてk_{cat}は1.3から1.9倍増加することが分かった。そこで、これらの一次配列を比較したところ、StMan及びStManIIは、TfManに比べ約60アミノ酸長いリンカーを有することが明らかとなった。そこで、TfManの触媒ドメインにStManのリンカーとCBMを結合したコンストラクト（Tf-sLC）を作製して触媒効率を求めた結果、Tf-sLCのk_{cat}はTfManよりも約50%高い値を示すことが明らかとなった。一方、StManの触媒ドメインにTfManのリンカーとCBMを結合したもの（St-tLC）では、k_{cat}が触媒ドメインのみのものとほぼ同じ値を示すことがわかった。このことから、分子構造の違いによりCBMの機能が異なることが示された。

Carbohydrate-binding module, mannanase, linker structure

講演番号:3C10p18
講演日時、会場:3月24日17:26～ C校舎10会場

*Trichoderma reesei*由来CBHIによる結晶性セルロース分解でのトリプトファン40残基の重要性

Tryptophan 40 residue of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Ⅰ is necessary for degradation of crystalline cellulose

○中村 彰彦、五十嵐圭日子、古田 忠臣[1,2]、Jerry Stählberg[3]、Anu Koivula[4]、Merja Penttilä[4]、鮫島正浩（東京大農生科・生材科、[1]東工大バイオセンター、[2]理研、[3]スウェーデン農科大、[4]フィンランド技研）

○Akihiko Nakamura, Kiyohiko Igarashi, Tadaomi Furuta[1,2], Jerry Stählberg[3], Anu Koivula[4], Merja Penttilä[4], Masahiro Samejima(The University of Tokyo, [1]Tokyo Institute of Technology, [2]RIKEN, [3]Swedish University of Agricultural Sciences, [4]VTT Technical Research Centre of Finland)

【目的】*Trichoderma reesei*由来の糖質加水分解酵素ファミリー7に属するセロビオヒドロラーゼⅠ(*Tr*Cel7A)は、4つのループ領域で覆われた約50 Åのトンネル型のアクティブサイトを持ち、結晶性セルロースを効率よく分解する。しかしながら、アクティブサイトの入り口に位置しサブサイト-7を構成する40番目のトリプトファンをアラニン残基に変えた変異体（W40A）では、非晶性セルロース分解能を有しているにも係らず結晶性セルロース分解能が殆ど失われる(1)。そこで天然型酵素（WT）とW40Aについて、オリゴ糖に対する活性を比較するとともに、分子動力学シミュレーションを行ってその理由を考察した。

【方法】200μMのセロテトラオース、セロペンタオースまたはセロヘキサオースを0.1μMの酵素と20mM酢酸緩衝液（pH 5.0）30℃で経時的に反応させ，生成物を解析した。また、セロヘキサオースについては、2つの酵素について同様の条件で0-400μMのセロビオース共存下での阻害実験を行った。さらに，分子動力学シミュレーションによりセロノナオースの取り込みを計算し、W40A変異の影響を推察した。

【結果】重合度が異なる３種のセロオリゴ糖に対する活性を比較したところ、W40Aはセロテトラオースの還元末端からのセロビオース生成初速度がWTの20%、グルコース生成初速度は35%であった。同様にセロペンタオースについてはセロビオース生成初速度が45%、グルコース生成初速度は112%となり、セロヘキサオースについてはそれぞれ70%と69%だった。すなわち、W40Aはセロテトラオースの分解が遅くなり、また還元末端からのセロビオース生成初速度が低下していた。また、セロペンタオース分解に対するセロビオース阻害の影響については、天然型が全ての生成物の生産速度が下がるのに対し、W40Aは初期セロビオース濃度に対するグルコースとセロトリオース生産初速度の減少が44%であり、天然型と比較して阻害を受けにくかった。そして、分子動力学シミュレーションによりこの2つの酵素についてサブサイト-7にセロオリゴ糖の還元末端を配置した状態で計算を開始した所、天然型酵素ではセルロース鎖を取り込むのに対しW40A変異体ではセルロース鎖を取り込む事が出来なかった。

(1)Igarashi K. et al. (2009) J. Biol. Chem. 284, 36186-36190

cellulase, *Trichoderma reesei*, cellobiose inhibition

講演番号：3C10p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ C校舎10会場

*Clostridium thermocellum*由来セルロソームの無細胞合成と試験管内再構成

Cell-free protein synthesis and *in vitro* reconstitution of the cellulosome from *Clostridium thermocellum*

○二瓶 哲、富塚 俊平、長谷川 裕樹、平野 展孝、春木 満（日大・工・生命応用化）
○Satoshi Nihei, Shunpei Tomitsuka, Hiroki Hasegawa, Nobutaka Hirano, Mitsuru Haruki (Nihon Univ. College of Eng. Dept. of Chem. Bio. & Appl. Chem.)

好熱性嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* が生産するセルラーゼ・ヘミセルラーゼ超分子複合体（セルロソーム）は、結晶性固体セルロースに対して高い分解活性を示すことが知られている。セルロソームは嫌気性細菌の細胞表層に提示される酵素複合体であり、骨格蛋白質中の Cohesin ドメインと、多種多様な糖質分解酵素の C 末端領域に存在する Dockerin ドメインが、微生物種特異的に結合した分子量数百万の超分子複合体である。セルロソームが結晶性セルロースに対して高分解活性を発揮するためには、骨格蛋白質を介した超分子複合体形成が必須であることが知られているが、全長骨格の調製が困難なため、超分子構造を持つセルロソームの試験管内再構成は未達成である。そこで本研究では、高分子量蛋白質の合成と多検体合成に適した小麦胚芽無細胞蛋白質合成系を用いて、*C. thermocellum*ATCC27405 株由来一次骨格蛋白質（CipA）、及び主要セルラーゼ群の無細胞合成を行い、超分子構造を持つセルロソームの試験管内再構成と、その機能解析を目的とした研究を行った。セルロソームを再構成する因子として、結晶性セルロース（Avicel）を単一炭素源に本菌株を培養した際に高発現される 12 種類の構成因子（エキソグルカナーゼ 3 種（CbhA, CelK, CelS）、エンドグルカナーゼ 7 種（CelA, CelB, CelF, CelQ, CelR, CelT, Cthe0821）、ヘミセルラーゼ 1 種（XynA）、セリンプロテアーゼ・インヒビター1 種（Serpin））の無細胞合成・精製後、同様に調製した全長骨格 CipA を用いて、ゲルシフト・アッセイによる複合体形成の確認を行った。また、全長骨格を用いて再構成したセルロソームを用いて、結晶性セルロース（Avicel）分解活性を測定した結果、CipA:Enzymes=1:9~1:18（Type-I cohesin:Type-I dockerin=1:1~1:2）のモル比で混合した際に、結晶性セルロース分解活性が最も上昇する結果を得た。

cell-free protein synthesis, cellulosome, *Clostridium thermocellum*

講演番号:3C10p20
講演日時、会場:3月24日17:48～ C校舎10会場

QCM-Dによる精製セルラーゼの結晶性セルロース分解評価

Cellulose degradation by single component cellulase on QCM-D

○紙野 圭、安 善榮、堀川　祥生[1]、杉山　淳司[1]（製品評価機構、[1]京大・生圏研）
○Kei Kamino, Sonyon An, Yoshiki Yoshiki[1], Jyunji Sugiyama[1] (NITE, [1]RISH)

セルロース系バイオマスは自然界に存在する最大のバイオマスであり、その利用の拡大は近年ますます重要性を増している。セルロースの利用には、低分子化を経たバイオエタノール生産／バイオリファイナリーや高分子複合材料としての利用等の複数の方向がある。特にバイオエタノール生産においては、前処理工程と糖化工程を経る必要があるが、効率的／安価なプロセス構築にはそれぞれの工程の理解の促進と改良が求められる。特に酵素糖化処理は、結晶性でかつヘテロな固体基質に対して、複数の分解酵素が協同的に作用する複雑な過程であり、そのブラックボックスの存在が最適化に妨げとなっている。現状では、どの酵素系あるいは酵素パーツが本当に有用なのかを定量的に見極めることも困難である。

結晶性セルロース基質の酵素分解の解析手法は大きく２つに分けることができる。分解により遊離する糖を定量する方法と、逆に不溶性基質の減少を測定する方法である。ほとんどすべての測定法は前者に依っている。後者には、一定時間処理を施した不溶性基質を回収し、乾燥重量を測定するという方法があるが、測定に時間がかかり、また微量分析には適応しない。いずれにせよ、どの方法もバッチ式測定法であり、リアルタイム測定法ではない。演者らは、QCM-D(quartz crystal microbalance with dissipation mode)を結晶性セルロースの酵素分解過程のリアルタイムモニタリング手法として広範に利用するための研究を行っている。

本研究では、主要セルラーゼであるセロビオヒドロラーゼ(CBH) Iを天然の子嚢菌、担子菌の培養上清より精製し、Avicelから調製した結晶性セルロースミクロフィブリルおよびアモルファスセルロースを固相化したQCMセンサーを用いて分解挙動を調べた。通常のセルラーゼ活性測定データやAFMによる可視化データと併せて報告する予定である。

なお、本研究はバイオマスエネルギー先導技術開発／酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究（PL：森川康）の一貫として、NEDOより委託を受けて実施されたものである。

Cellulase, QCM-D, Biomass

講演番号:3C10p21
講演日時、会場:3月24日17:59～ C校舎10会場

テングサ残渣の酵素による糖化

Enzymatic saccharification for Agar weed residues

○齋藤　将成、苅田　修一（三重大学院・地域イノベ）
○Masanari Saito, Shuichi Karita(Grad. Regional Innov. Mie Univ.)

【目的】

バイオ燃料を生産する原料となるバイオマスとして、海藻が多くの注目を集めている。しかし海藻に含まれる構造多糖は加水分解されにくく、バイオ燃料として利用される単糖の状態にするまでの分解過程が課題となっている。そこで本研究では、好熱嫌気性セルロース分解細菌 *Clostridium thermocellum* を利用して、海藻セルロースを特異的に分解するセルラーゼについて検討した。

【方法】

紅藻類の海藻であるテングサ（*Gelidiaceae*）から寒天を抽出した残渣を炭素源として培養した *C.thermocellum* の培養液から得られた培養濾液を、テングサ残渣に添加し、60℃で 72 時間インキュベートした後、薄層クロマトグラフィーによってその分解産物を調べた。また、ボール・ミル処理したセルロース（BMC）とテングサ残渣のそれぞれを炭素源として生育させた *C.thermocellum* の培養液に含まれるタンパク質について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および活性染色を行った。更に、発現したタンパク質の違いを調べるために、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF/TOF mass spectrometry）を用いて解析を行った。

【結果】

テングサ残渣を酵素反応した産物を薄層クロマトグラフィーで展開したところ、ブドウ糖とセロビオースおよびセロテトラオースを検出した。これは *C.thermocellum* が産生した酵素によってテングサの構造多糖が分解されたことを示している。また、SDS-PAGE と活性染色の結果、BMC とテングサ残渣では、現れたバンドに違いが見られた。このことは、テングサ残渣に特異的な酵素タンパク質の存在を示している。

Agar weed residues, *Clostridium thermocellum*, Cellulase

講演番号：3J11a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ J校舎11会場

腸管免疫細胞の活性化モニターリングマウスの樹立

Establishment of the activation-monitoring mouse for immune cells in intestine

○安達貴弘（東京医歯大・難研）
○Takahiro Adachi (TMDU, MRI)

【目的】特定の食物に対してのアレルギー反応の有無は比較的簡単に調べられるが、その発症機序、さらには食物アレルギー発症およびその進行過程での免疫担当細胞の動態、活性化については不明な点が多い。そこで本研究では、食物アレルギーをはじめ、食物から抗原を取り込んだ時の食物アレルギーの発症およびその進行過程での免疫反応を詳細に解明するために、腸管での免疫担当細胞の動態、活性化状態を生体イメージングでモニターできるマウスの作製を目的とした。
【方法】蛋白性のカルシウムイオンプローブであるCameleon(理研・宮脇先生より供与していただいた)を特定の細胞に発現させられるように、CAGプロモーターの制御下にタンデムなLoxP配列で挟んだネオマイシン耐性遺伝子、さらに下流にCameleonを発現するYC3.60遺伝子を持つfloxed YC3.60コンストラクトを作製した。このコンストラクトをC57BL/6の卵母細胞にインジェクションを行い、トランスジェニック（Ｔｇ）マウスを作製した。さらに得られたfloxed YC3.60Ｔｇマウスと Creリコンビナーゼを各種免疫担当細胞特異的に発現するプロモーター制御下に置いた遺伝子組換えマウスと交配し、Ｂ細胞など特異的にCameleonを発現するマウスを作製した。カルシウムイオンの動員はフローサイトメーターあるいは共焦点レーザー顕微鏡で行った。
【結果】全長のコンストラクトが挿入されたfloxed YC3.60 Ｔｇマウスが3系統(No.1, No.2, No.18)樹立された。得られたfloxed YC3.60 Ｔｇマウスをおもに Ｂ細胞特異的にCreを発現するCD19-Creマウスと交配し、floxed YC3.60 x CD19-Creマウスを作製した。１系統(No.18)ではCameleonの発現は見られなかったが、他の2系統ではＢ細胞のCameleon陽性率に差はあるが予想通りＢ細胞特異的にCameleonの発現がみられた。約80％以上のＢ細胞でCameleonを発現するマウス(No.2)を用いて生体イメージングにより腸管を蛍光顕微鏡で観察すると、パイエル板や腸間膜リンパ節でCameleonを発現する細胞の集積がみられた。また、共焦点レーザー顕微鏡観察により、腸管にホーミングしている細胞が1細胞レベルで検出できた。このTgマウスの脾臓より調製した細胞を用いて、抗原受容体架橋によるカルシウムイオンの動員を調べたところ、フローサイトメーターで検出できることが明らかとなった。さらにこのマウスを用いて、生体イメージングを行ったところ、Cameleonによるカルシウムイオンの動員の検出にも成功した。これらの結果より、このTgマウスを用いれば、食物アレルギーの発症や進行過程における免疫細胞の動態および活性化を調べることが可能であると考えられる。

signaling, imaging, food allergy

講演番号：3J11a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ J校舎11会場

腸内共生菌が粘膜系Ｂ細胞応答に与える影響

Gut commensal bacteria modulate mucosal B cell responses

○相澤 竜太郎、細野 朗[1]、鈴木 あみ、八村 敏志[1]、百瀬 愛佳[2]、平山 和宏[2]、伊藤 喜久治[2]、高橋 恭子、高橋 宜聖[3]、上野川 修一（日大・生資科、[1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]東大院農生科・獣医、[3]感染研・免疫）

○Ryuutarou Aizawa, Akira Hosono, Satoshi Hachimura[1], Yoshika Momose[2], Kazuhiro Hirayama[2], Kikuji Itoh[2], Kyoko Takahashi, Yoshimasa Takahashi[3], Shuichi Kaminogawa (Dep. of Food Bioscience and Biotechnology, Nihon Univ., [1]Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural and Life Science, Univ. of Tokyo, [2]Dep. of Veterinary Public Health, Graduate School of Agricultural and Life Science, Univ. of Tokyo, [3]Dep. of Immunology, NIID)

【目的】粘膜免疫系Ｂ細胞における最も重要な感染防御応答の一つに免疫グロブリンA(IgA)の産生が挙げられる。特に、腸管免疫系のIgA産生は腸内共生菌の存在が強く関与していることが知られているが、菌種の違いやその免疫修飾作用については不明な点が多い。また、腸内共生菌が他の粘膜免疫系のIgA産生に与える影響についてはほとんど明らかになっていないことから、本研究においては、腸内共生菌の菌種の違いが腸管以外の他の粘膜免疫系のIgA産生応答に与える影響について明らかにすることを目的とした。

【方法】マウス腸内共生菌のうちグラム陰性菌の*Bacteroides acidifaciens* type A43 (BA)、グラム陽性菌の*Lactobacillus johnsonii* 129 (LJ)を、それぞれ無菌アイソレーター内で飼育しているBALB/cマウスの無菌（GF）マウス4～5週齢に10^7～10^8 cfu経口投与することによって、それぞれの菌体を単独定着させたノトバイオートマウス（BA・LAマウス）を作製した．そして、それぞれのマウスについて気管支肺胞洗浄液（BAL）と鼻腔洗浄液を採取し、総IgA量などの抗体産生量をELISAにより定量した。

【結果】BAおよびLJマウスにおける総IgA量はBALにおいてGFマウスよりも有意に高く、鼻腔洗浄液の総IgA量については、BAマウスがGFマウスと比較して有意に高かった。このことから、腸内共生菌は腸管粘膜のみならず上気道および鼻腔粘膜組織のIgA産生に対しても強く影響を与えており、特に*Bacteroides*は腸管粘膜以外にも高いIgA産生能を有している可能性が示唆された。よって、腸内共生菌の菌種の相違は、粘膜免疫系において異なる特性を持つIgA産生を誘導する可能性があると考えられた。さらに、粘膜免疫系B細胞の腸内共生菌体による修飾作用について比較検討を行っている。

Bacteroides, IgA, B cell

講演番号：3J11a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ J校舎11会場

腸内共生菌によるマウスα-ディフェンシン遺伝子の発現調節機構

Regulatory Mechanisms of the Mouse α-Defensin Gene Expression by Gut Microbiota

○栗原　健太、高橋　恭子、杉　由高、中野　興、細野　朗、上野川　修一（日大・生資）
○Kenta Kurihara, Kyoko Takahashi, Yutaka Sugi, Kou Nakano, Akira Hosono, Shuichi Kaminogawa (Nichidai)

【目的】ヒトの腸内には数百種類以上100兆個以上の腸内細菌が共生し腸内フローラを構成している。この腸内共生菌は宿主細胞と相互作用し健康や疾患と密接に関係していると言われているが詳細なメカニズムは十分明らかにされていない。腸管の管腔と体内は単層の腸管上皮細胞で隔てられている。腸管上皮細胞は、共生菌からの刺激を最前線で受け取り、粘膜固有層に存在する免疫細胞へそれらの情報を伝達し、免疫応答の誘導・調節に重要な役割を担う。我々は昨年度までに、通常および無菌マウスより調製した小腸および大腸上皮細胞におけるmRNA発現解析の結果、α-ディフェンシン1および5の発現が小腸上皮細胞では共生菌により増大するのに対し、大腸上皮細胞では逆に共生菌により抑制されることを報告している。本研究では、腸内共生菌によるα-ディフェンシン1および5遺伝子の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】BALB/cマウスの腸管上皮細胞より抽出したゲノムDNAを鋳型としたPCRにより、α-ディフェンシン1および5遺伝子の開始コドン上流約1000bpをそれぞれ取得した。これらの遺伝子断片をそれぞれルシフェラーゼレポータープラスミドに挿入してクローニングした。構築したプラスミドを腸管上皮細胞株に導入し、一過性の発現試験を行った。主要な腸内細菌としてグラム(+)菌*Lactobacillus*および*Enterococcus*、グラム(-)菌*Bacteroides*および*Escherichia coli*、菌体成分リガンドとしてLPSおよびPam3CSK4、腸内共生菌代謝産物として酢酸および乳酸を添加し、α-ディフェンシン1および5遺伝子5’領域の転写活性能に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイにより評価した。
【結果】結腸上皮細胞株Caco-2においてα-ディフェンシン1遺伝子の5’領域は、単球株THP-1と同程度の弱い転写活性化能を示した。一方、α-ディフェンシン5遺伝子の5’領域は、THP-1に比べてCaco-2で数十倍強い転写活性化能を示した。さらに、α-ディフェンシン5遺伝子は5’領域に複数の多型を含む多コピーでゲノム上に存在する可能性が示され、それらの5’領域の転写活性化能に違いはみられなかった。また、乳酸をはじめとする腸内細菌由来のいくつかの刺激により、Caco-2細胞においてα-ディフェンシン5遺伝子の5’領域の転写活性化能が無刺激時に比べて抑制された。これらの結果より、α-ディフェンシン1および5遺伝子の腸内共生菌による発現制御の腸管の部位による違い、腸管上皮細胞のタイプによる違いに関する分子機構を明らかにするにあたり、まず、Caco-2細胞をモデルとして、大腸上皮細胞におけるα-ディフェンシン5遺伝子の共生菌による発現抑制機構の解析が可能であると考えられ、さらに詳細な機構を解析中である。

intestinal epithelial cell, commensal bacteria, α-defensin

講演番号：3J11a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ J校舎11会場

腸管関連リンパ組織におけるストローマ細胞の解析

Analysis of stromal cells in gut-associated lymphoid tissue

○塩河　亜弥[1,2]、八村　敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ）
○Aya Shiokawa[1,2], Satoshi Hachimura[1,2]（[1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo）

【目的】リンパ節におけるストローマ細胞は細胞遊走物質であるケモカインを産生し、T細胞や樹状細胞の位置を決定することが知られているが、支持組織としての役割に加えて免疫細胞の性質に影響を与えることが報告されるようになってきた。腸管は抗原に絶えず暴露されているため正と負の免疫応答が厳密に制御される必要があり腸管特有の免疫制御機構が存在する。これまでに腸管免疫系の成立における腸管特有の樹状細胞のサブセットや機能が報告されているが、ストローマ細胞も腸管特有の性質を持ち腸管免疫系の成立に寄与している可能性が考えられる。そこで本研究では腸管組織におけるストローマ細胞を解析し、これらの免疫制御機構を解明することを目的とした。
【方法】マウスから腸間膜リンパ節 (MLN)、パイエル板(PP)、小腸粘膜固有層(LP)を採取し、MACS法または蛍光セルソーターを用いてCD45-細胞を分離し、これらをストローマ細胞とした。ストローマ細胞サブセットはCD45-gp38+CD31- cellsをFibroblastic reticular cells(FRC)、CD45-gp38-CD31- cellsをdouble-negative cells (DN cells)として解析した。
【結果】MLN CD45- cellsはCOX2, Raldh2を高発現しており、PPおよびLP CD45- cellsはIDO1を高発現していた。MLN, PP, LPにおけるストローマ細胞サブセットの割合を確認したところ、MLNにおいてはFRCが多く存在するのに対し、LPではMLNと比較してFRCの割合が低く、PPではほぼDN cellsで構成されていることが分かった。Raldh2発現はMLN, PP, LPにおけるFRCがDN cellsよりも高発現しており、FRCの割合の違いにより各組織のRaldh2発現が異なることが示唆された。またMLN FRCはMLN DN cells, PPおよび LPの両サブセットと比較してCOX2を高発現しており、PPおよびPP DN cellsはPPおよび LPのFRC, MLNにおける両サブセットと比較してIDO1を高発現していた。このことから、同じサブセットにおいてもその存在組織により遺伝子発現が異なることが示された。以上の結果より、腸管各組織のストローマ細胞サブセットはそれぞれ異なるメカニズムにより免疫系を制御している可能性が示唆された。

stromal cells

講演番号：3J11a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ J校舎11会場

腸管樹状細胞のTLRを介した免疫調節機構の解析

Regulation of immune responses of intestinal dendritic cells via TLRs

○上滝 隆太郎[1, 2]、輪島 隼一[1, 2]、塩河 亜弥[1, 2]、八村 敏志[1, 2]（[1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ）

○Ryutaro Koutaki[1, 2], Shun-ichi Wajima[1, 2], Aya Shiokawa[1, 2], Satoshi Hachimura[1, 2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo)

【目的】樹状細胞（DC）は、腸管免疫系において、IgA産生やT細胞分化誘導といった免疫応答に中心的な役割を担っており、感染防御や免疫寛容といった反応の制御に重要なはたらきをしている。この中で、Toll様受容体（TLR）を介した微生物の認識が、DCによる種々の免疫応答に重要であるということが明らかになっている。これらのことから、腸管由来DCの免疫応答性を解明することは、プロバイオティクスが腸管免疫系に及ぼす作用を理解する上で重要である。当研究グループは、小腸のパイエル板（PP）DCのTLRリガンド刺激に対する応答性について解析してきた。これまでの研究で、PP DCの特徴として、CpGオリゴDNA（CpG ： TLR9 リガンド）およびPam_3CSK_4（P3C ： TLR2/1リガンド）への選択的かつ特異的な応答性が見出されている。そこで、本研究ではCpGおよびP3Cで共刺激した際のPP DCの応答性に着目してその応答性を解析したと同時に、小腸粘膜固有層（LP）DCの応答性についても同様に解析した。

【方法】BALB/cマウスよりMACS法を用いてPP/LP DCを精製し、CpGおよびP3C単独刺激もしくは共刺激下で培養した際のPP DCのIgA産生誘導やT細胞分化誘導に関わる因子のmRNAの発現をreal time RT-PCR法により解析した。

【結果】*Il6, Aldh1a2, Ebi3*（IL-27サブユニット）のmRNA発現は、P3C, CpGいずれの刺激によっても誘導された。その一方で、*p40*（IL-12/IL-23サブユニット），*p28*（IL-27サブユニット）の発現はCpG刺激によってのみ強く誘導された。P3Cは、CpGとの共刺激において、CpG単独刺激により誘導される*p40*および*p28*のmRNA発現上昇を抑制した。さらに、LP DCについても同様な結果が得られた。以上より、腸管免疫系においてDCは様々なTLRリガンドやその組み合わせに対して特異的に応答することで、腸管の恒常性維持に働いていることが示唆された。また、P3C以外のTLR2リガンドについても現在検討中である。

dendritic cell, Toll-like receptor, small intestine

講演番号：3J11a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ J校舎11会場

粘膜組織に存在するIgA産生促進$CD3^-IL\text{-}2R^+$細胞のユニークな性状

Unique phenotypes of $CD3^-IL\text{-}2R^+$ IgA-helper cell in mucosal tissues

○横井勇祐[1,2,3]、高橋宜聖[2]、小川晋平[1,3]、梅田幸子[1]、石井俊祐[4]、山田潔[1]、戸塚護[1]、佐藤隆一郎[1]、細野朗[4]、上野川修一[4]、八村敏志[1,3]（[1]東大院農生科・応生化、[2]感染研・免疫、[3]東大院農生科・食の安全研セ、[4]日大生資科・食品生命）

○ Yusuke Yokoi[1,2,3], Yoshimasa Takahashi[2], Shimpei Ogawa[1,3]、Yukiko Umeda[1]、Shunsuke Ishii[4]、Kiyoshi Yamada[1]、Mamoru Totsuka[1]、Ryuichiro Sato[1]、Akira Hosono[4]、Shuichi Kaminogawa[4]、Satoshi Hachimura[1,3]（[1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Dept. Immunol., NIID, [3]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [4]Dept. Food Bioscience Biotechnol. Nihon Univ.）

【目的】我々はこれまでに、腸管においてIL-5分泌能が高くIL-2受容体を発現している独特の非T非B細胞群($CD3^-IL\text{-}2R^+$細胞)が存在することを見出している。この細胞群は、IL-5を介しB細胞のIgA産生を増強する機能を有しており、感染防御に関わる一方で、TLR等を介して食品成分を認識する可能性が考えられる。今回このIgA産生を促進する細胞(IgAヘルパー細胞)のより詳細な表現型と局在性を検討した。

【方法】消化管粘膜リンパ組織であるパイエル板と、気道粘膜組織である肺において、IgAヘルパー細胞の従来の表現型である$CD25^+CD3^-CD4^-B220^-$細胞について、細胞表面分子および遺伝子発現を解析した。さらに肺のIgAヘルパー細胞について、インフルエンザウイルス感染による変化を解析した。

【結果】肺にも同じ表現型を有する細胞が存在し、パイエル板より多くのIL-5を産生することが確認された。また、IgAヘルパー細胞で高発現する表面抗原を見いだし、IgAヘルパー細胞の新たなマーカー候補分子となる可能性が示唆された。さらに、ウイルス感染後、発現遺伝子に変化が認められたことから、ウイルス感染に応答して何らかの機能変化を行う可能性が推察された。

IgA, mucosal tissue, Peyer's Patch

講演番号：3J11a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ J校舎11会場

異なる部位の腸管関連リンパ組織におけるIgA産生応答の特徴

Characteristics of IgA production induced in the different mucosal lymphoid tissues of intestine

○鈴木 誠、細野 朗、鈴木 あみ、柳橋 努、八村 敏志[1]、高橋 宜聖[2]、百瀬 愛佳[3]、平山 和宏[3]、伊藤 喜久治[3]、高橋 恭子、上野川 修一（日大生資科・食科工、[1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]感染研・免疫、[3]東大院農生科・獣医）

○Makoto Suzuki, Akira Hosono, Ami Suzuki, Tsutomu Yanagibashi, Satoshi Hachimura[1], Yoshimasa Takahashi[2], Yoshika Momose[3], Kazuhiro Hirayama[3], Kikuji Itoh[3], Kyoko Takahashi, Shuichi Kaminogawa (Department of Food Bioscience and Biotechnology, Nihon University, [1]Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo, [2]Deparatment of Immunology, NIID, [3]Department of Veterinary Public Health, Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo)

【目的】腸管免疫系は腸内共生菌の影響を強く受けていることが知られている。しかし、これまでは主に小腸を中心とした解析によって多くの報告があるが、大腸部位では腸内共生菌がどのように IgA 産生を制御しているのかは不明な点が多い。特に、腸内共生菌の多くは大腸部位に存在し、腸管免疫関連リンパ組織の形成や IgA 産生に影響を与えながら腸内細菌自身は免疫系によって排除されることなく大腸内に共生できることから、大腸における免疫系と腸内共生菌の相互作用を解明することは非常に重要であると考えられる。そこで本研究では、大腸および小腸各部位の腸管関連リンパ組織に注目し、部位の違いが IgA 産生応答に与える影響について明らかにすることを目的とした。

【方法】BALB/c マウスについて、通常マウス及び無菌マウスより小腸パイエル板・盲腸リンパ節・結腸リンパ節を採取してそれぞれ細胞を調製し、マウス腸内細菌から分離されたグラム陰性菌の *Bacteroides acidifaciens* type A43、グラム陽性菌の *Lactobacillus johnsonii* 129 の加熱死菌体との共培養を行った（7 日間）。そして、培養上清中の総 IgA 量を ELISA で測定した。

【結果】腸内共生菌を有する通常マウスに比べて無菌マウスでは小腸パイエル板や盲腸リンパ節の組織はサイズが小さく、細胞数も著しく少ないのに対し、結腸リンパ節は通常マウスと無菌マウスにおいてはそこに大きな差はみられなかった。通常マウスにおいては、パイエル板や盲腸リンパ節に比べて結腸リンパ節の方が菌体刺激による総 IgA 産生量が高い傾向がみられた。さらにこのとき、*Lactobacillus* よりも *Bacteroides* の菌体刺激の方が高い IgA 産生を誘導する傾向がみられた。一方、無菌マウスにおいては結腸リンパ節細胞が *Bacteroides* 菌体の刺激によって IgA の産生を誘導したが、その応答性は小腸パイエル板に比べると低応答性を示した。以上より、腸管の部位によってそのリンパ組織の菌体に対する応答性は異なっており、常在する腸内共生菌の影響も強く受けて免疫応答も変化するものと思われる。

Bacteroides, *Lactobacillus*, IgA

講演番号：3J11a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ J校舎11会場

レンチナンの腸管炎症抑制機構：小腸上皮様Caco-2細胞のTNFR1の局在に及ぼす影響について

Intestinal anti-inflammatory activity of lentinan: influence on TNFR1 distribution in intestinal epithelial-like Caco-2 cells

○西谷 洋輔、水野 雅史[1]（神戸大・自然先端、[1]神戸大院・農）
○Yosuke Nishitani, Masashi Mizuno[1] (Adv. Sci. Technol., [1]Agric. Sci., Kobe Univ.)

【目的】レンチナンはシイタケ由来のβ-1,3-1,6-グルカンである。これまでに我々は、DSS誘導性腸炎マウスモデルにおけるレンチナンの炎症抑制効果を明らかにしている。さらに、マクロファージ様RAW264.7細胞と小腸上皮様Caco-2細胞の共培養により確立した*in vitro*腸炎モデルにおいて、レンチナンの管腔側への前処理が、RAW264.7細胞からのTNF-α産生に影響を与えることなくCaco-2細胞のIL-8 mRNA発現およびNF-κBの核内移行を抑制することを見出した。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察から、レンチナン処理によりCaco-2細胞において基底膜側に存在するTNFR1の分布が顕著に減少すること、さらに氷上の培養条件では分布に影響が見られないことから、レンチナン処理によりTNFR1がインターナリゼーションを起こすことが示唆されている。本研究では、レンチナン特有の現象か否かとインターナリゼーション機構について検討した。
【方法】RAW264.7細胞とCaco-2細胞の共培養状態に、ラミナリンを管腔側から処理し培養を行った。培養後、トランズウェル膜上のCaco-2細胞について抗TNFR1抗体を用いた免疫染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。さらに、エンドサイトーシス阻害剤であるdansylcadaverineとcytochalasin Dを前処理し、レンチナンを管腔側から処理・培養した後、Caco-2細胞におけるIL-8 mRNA発現をリアルタイムPCR法により調べた。
【結果】顕微鏡観察の結果、ラミナリン処理では、無処理区と同様にCaco-2細胞内のTNFR1が管腔側から基底膜側にかけて一様に存在が確認され、分布には影響が見られないことが明らかとなった。また、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤であるdansylcadaverine前処理のみで、レンチナンによるCaco-2細胞のIL-8 mRNA発現の抑制が解除された。以上の結果より、Caco-2細胞におけるTNFR1のインターナリゼーションにはβ-グルカンの構造のうちβ-1,6分岐が必要であることが示唆された。また、レンチナンはアクチン依存性ではなくクラスリン依存性エンドサイトーシスを促すことでTNFR1のインターナリゼーションを起こすことが示唆された。これらのことから、レンチナンは細胞表層のTNFR1の発現を低下させることによって、Caco-2細胞のTNF-αに対する感受性を鈍くし、抗炎症作用を発揮しているのではないかと考えられた。

lentinan, TNFR1, anti-inflammatory

講演番号：3J11a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ J校舎11会場

ノルアドレナリンによるアドレナリン受容体を介したストレス反応へのフラボノイドの影響

Effects of flavonoids on adrenergic receptor mediated stress response by noradrenaline

○山崎 隼輔[1]、榊原 啓之[1,2]、下位 香代子[1,2]（[1]静岡県大・院・生活健康、[2]静岡県大・環境研）
○ Shunsuke Yamazaki[1], Hiroyuki Sakakibara[1,2], Kayoko Shimoi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Nutr. Environ. Sci, Univ.of Shizuoka, [2]Institute Environ. Sci., Univ.of Shizuoka)

【目的】ストレスに過度にあるいは慢性的に曝露され続けると、生体機能に異常をきたし、その結果様々な疾患が誘発される（Kuo et al., *Nat. Med*, 13, 803-811, 2007)。例えば、日常生活で曝露されるストレスが乳がんの発症を増加させる可能性が指摘されている（KLillberg et al., *Am. J. Epidemiol.*, 157, 415-423, 2003)。17ß-estradiol（E_2）の長期曝露は、乳がんの重要なリスク因子であるが、E_2の代謝物である4-OHE_2は発がん性を有する。一方、ストレスが負荷した時の生体内では、カテコールアミン類（アドレナリン、ノルアドレナリン）が増加し、アドレナリン受容体を介してストレス反応を起こすことが知られている（Thaker et al., *Nat. Med.*, 12, 939-944, 2006)。これまでに我々は4-OHE_2とノルアドレナリン共存下で細胞を処理すると、一般的にはDNA二本鎖切断の指標とされるヒストンH2AXのリン酸化（γ-H2AX）が誘導されることを見いだし、この誘導はα_2-アドレナリン受容体とATM（ataxia telangiectasia mutated）を介していることを明らかにした。ところで、我々は日常生活において植物性食品から摂取しているフラボノイドには抗酸化作用などさまざまな機能性があることが報告されている（Shirley et al., *Plant. Physiol.*, 126, 485-493, 2001)。そこで本研究では、ストレス反応を緩和させる植物成分を探索する目的で、α_2-アドレナリン受容体を介したγ-H2AXの誘導を指標として数種類のフラボノイドのストレス反応への影響について検討した。

【方法】ヒト乳がん細胞であるMCF-7細胞にノルアドレナリン(3 nM)、フラボノイド類（フラボン、ゲニステイン、ルテオリン（0.1、1、10 μM）を1時間作用させた後、4-OHE_2（30 μM）を添加した。1時間のインキュベート後、に回収した細胞からタンパクを抽出し、γ-H2AXをWestern blot法により検出した。

【結果】MCF-7細胞をノルアドレナリンと4-OHE_2で処理した１時間後に、γ-H2AXが誘導顕著に誘導された。この誘導を、ルテオリンは低濃度（0.1 μM）で有意に抑制したが、フラボンとゲニステインには高濃度（10 μM）でも抑制効果は見られなかった。本結果は、ノルアドレナリンと4-OHE_2存在下で誘導されるγ-H2AXの抑制には、カテコール構造が重要である可能性を示唆している。現在、メトキシフラボノイドや他のフラボノイド、或いはカテコール構造を有するフェノール酸を用いて、構造活性相関について検討中である。また、正常乳腺細胞であるMCF-10Aにおける影響についても解析中であり、これらの結果を合わせて報告する。

flavonoid, γ-H2AX , α_2-adrenoceptor

講演番号：3J11a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ J校舎11会場

ピーナッツ渋皮抽出物の脳機能改善作用

Improvement of brain function by peanuts skin ectract

○森　大輔[1]、木村　雄輝[1]、古川　昭栄[2]、福光　秀文[2]（[1]岐阜セラツク、[2]岐阜薬大）

○Daisuke Mori[1], Yuuki Kimura[1], Syouei Furukawa[2], Hidehumi Fukumitsu[2]（[1]Gifu Shellac, [2]Gifuyakudai）

【目的】高齢社会によりアルツハイマー病（AD）患者の増加し、問題となりつつある。BDNF様作用、もしくはBDNFの産生を促進する働きを持つピーナッツ渋皮抽出物（PSE）のADモデルマウスに対するAD予防効果を検証した。

【方法】アミロイドβ（Aβ）を脳室内に投与して作成したADモデルマウスに14日間PSEを経口投与した。最終投与日の翌日に自発的交替行動試験を、その翌日に新奇物体認識試験を実施し、記憶力の改善を評価した。また、最終投与から1週間後に海馬を摘出し、ERK1/2のリン酸化レベルをウエスタンブロッティング法にて評価した。

【結果】PSEを14日間投与したマウスでは、脳室内へのAβ投与による記憶力の低下を有意に抑制することを確認した。また、脳室内へのAβ投与により海馬におけるERK1/2のリン酸化レベルが低下が起こり、PSEを14日間投与したマウスではそれが抑制されていた。

peanut, brain foods, BDNF

講演番号：3J11a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ J校舎11会場

脳延髄縫線核におけるオキシトシン受容体による体温調節能の解析

Analysis of body thermoregulation function by oxytocin receptor in the medullary raphe

○立石　木綿子、佐藤　佳亮、笠原　好之、水上　浩明[1]、西森　克彦（東北大・農、[1]自治医大・分子病態治療研究センター）

○Yuko Tateishi, Keisuke Sato, Yoshiyuki Kasahara, Hiroaki Mizukami[1], Katsuhiko Nishimori(Touhoku Univ., [1]Jichi medical Univ.)

【目的】オキシトシン(OXT)は脳下垂体後葉から分泌され、神経投射及び拡散により神経伝達物質、神経修飾因子として働くことが明らかとなり注目されている。OXT の受容体(OXTR)は、脳をはじめとする広範囲の組織で発現している。我々が作製した OXTR 欠損マウスの解析により、OXTR の欠損は寒冷時の体温調節能異常を引き起こすことが明らかになり、OXT/OXTR システムが哺乳類の体温調節能に関与することが示された。さらに OXTR 欠損マウスにおいて、寒冷時の体温調節能を司るとされる褐色脂肪組織(BAT)の形態異常も見出された。本研究では OXT/OXTR システムによる BAT を介した寒冷時の体温調節能の詳細を解析することを目的とする。

【方法】我々は OXTR を発現するニューロンの局在を GFP 変異体の Venus によって可視化できる $Oxtr^{Venus/+}$マウスを作製した。この $Oxtr^{Venus/+}$マウスの解析により、体温調節能に関与するとされる延髄縫線核領域で OXTR が発現しているかを確認し、さらに寒冷時に OXTR が活性化するかを解析した。

一方、OXTR 欠損マウスの延髄縫線核にアデノ随伴ウイルス(AAV-Oxtr)ベクターをインジェクションし、延髄縫線核特異的に OXTR の発現をレスキューしたマウス(+AAV-Oxtr)を作製した。このマウスを寒冷条件下に曝露して体温を測定することで、OXTR の発現回復により寒冷時の体温調節能の低下が生理的にもレスキューされるかを解析すると共に、BAT の形態に変化があるかも観察した。

【結果】OXTRは脳延髄において発現しており、さらに寒冷時に活性化することが明らかになった。また、延髄縫線核特異的にOXTRを発現した+AAV-Oxtrマウスは寒冷条件下において体温調節能の低下とBATの形態異常というOXTR欠損マウスで見られた表現型が消失する傾向にあることが示された。この結果から、寒冷時の体温調節能には延髄縫線核のOXTRが関与しており、重要な働きを担っている可能性が示唆された。

Oxytocin, Thermoregulation, Brown adipose tissue

講演番号：3J11a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ J校舎11会場

オルニチンの成長ホルモン分泌機構

Mechanism underlying the growth hormone-releasing activity by ornithine

○ホー イーイン、水重 貴文、秋月さおり[1]、大日向 耕作（京大院農・食品生物、[1]協和発酵バイオ）

○Yee Yin Ho, Takafumi Mizushige, Saori Akiduki[1], Kousaku Ohinata (Kyoudai, [1]KYOWA HAKKO BIO)

【Background】Decrease of growth hormone (GH) has been observed in elderly people, and this decrease might be associated with aging. Previously, we found that a pentapeptide, acting as an agonist for ghrelin receptor, increased GH release after intravenous (i.v.) and oral administration [1]. Ornithine (Orn) is one of the amino acids that can be produced on an industrial scale. We have then focused on Orn, and investigated the mechanism underlying the GH-releasing activity of Orn administration.

【Methods】The secretion of GH was investigated after the i.v. or intraduodenal (i.d.) administration of Orn. Nine-week-old male Wistar rats (SLC, Shizuoka, Japan) were anesthetized intraperitoneally with sodium pentobarbital (50 mg/kg). Orn dissolved in saline was administered through a femoral vein or intraduodenal cannula, and blood samples were sequentially collected from the femoral artery cannula. Plasma GH levels were measured using a rat GH enzyme immunoassay kit.

【Results】I.d. administered Orn increased plasma GH concentrations at a dose of 5 g/kg. The peak of GH was observed at 10-15 min after i.d. administration of Orn. On the other hand, i.v. administered Orn was inactive. Ghrelin is an endogenous bioactive peptide derived from the stomach, which stimulates GH release and food intake in animals and human. To investigate whether ghrelin is involved in the mechanism of GH release as an effect of Orn administration, we have used [D-Lys^3]-GHRP-6, a ghrelin antagonist. The GH-releasing activity induced by i.d. administration of Orn was blocked by i.v. pretreatment of [D-Lys^3]-GHRP-6. These results suggest that the Orn-induced GH release was mediated by the ghrelin system. It is known that the ghrelin signal was transmitted via the afferent vagus nerve. We are investigating the involvement of the nerve system in GH-releasing activity of Orn using vagotomized rats.

In conclusion, we found that i.d. administered Orn stimulates GH release in a manner that is dependent on the ghrelin system.

1. Ohinata K, Kobayashi K, Yoshikawa M. Peptides. 2006; 27(7):1632-7.

Ornithine, Growth hormone, Ghrelin

講演番号：3J11a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ J校舎11会場

くも膜リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素はδオピオイドペプチドrubiscolin-6の経口投与による摂食促進作用を仲介する

Leptomeningeal lipocallin-type prostaglandin D synthase mediates the orexigenic activity of δ opioid peptide rubiscolin-6 after oral administration

○金子 賢太朗、ラザルス ミハエル[1]、宮本 知京、大石 陽[1]、永田 奈々恵[1]、吉川 正明、有竹 浩介[1]、裏出 良博[1]、大日向 耕作（京大院・農・食品生物、[1](財)大阪バイオ研・分子行動生物）
○ Kentaro Kaneko, Michael Lazarus[1], Chihiro Miyamoto, Yo Oishi[1], Nanae Nagata[1], Masaaki Yoshikawa, Kosuke Aritake[1], Yoshihiro Urade[1] and Kousaku Ohinata (Kyoto Univ. [1]Osaka Bioscience Institute)

【目的】わが国ではメタボリックシンドロームだけでなく、高齢者の食欲不振や若い女性の精神性摂食障害（拒食症）が問題となっており、食欲を正常化し体重を適正範囲内に回復する摂食促進素材の開発が期待されている。これまでに我々は、緑葉の主要タンパク質Rubiscoに由来するδオピオイド受容体アゴニストペプチドrubiscolin-6（YPLDLF, 0.3 mg/kg）の経口投与により普通食摂取を促進することを見出した。またrubiscolin-6 の摂食促進作用には、中枢δオピオイド受容体の下流で、新しい摂食促進経路であるプロスタグランジン（PG）D_2ーニューロペプチドY系[1]を活性化することを見出している。そこで本研究では、rubiscolin-6 による摂食促進作用にPGD_2の合成酵素であるリポカリン（L）型および造血器（H）型PGD合成酵素（PGDS）のいずれを介しているのかをそれぞれのノックアウト（KO）マウスを用いた。さらに作用部位を特定するため、コンディショナルPGDS KOマウスを使用し作用機構を検討した。
【方法】実験動物として、7週齢雄性C57BL/6、L-およびH-PGDS KOマウスを用いた。さらにnestinプロモーターを使用しCre/loxPシステムにて、ニューロンおよびオリゴデンドログリア細胞のL-PGDS遺伝子を選択的にノックアウトしたL-PGDS^{flox}/Nescreマウスを作製した。L-PGDS^{flox}/NescreマウスにおけるL-PGDSの脳内局在性を免疫染色法により調べた。これらのマウスにrubiscolin-6を経口あるいは脳室内投与し、経時的に摂食量を測定した。
【結果】rubiscolin-6の経口投与による摂食促進作用は、野生型およびH-PGDS KOマウスでは認められたが、L-PGDS KOマウスでは認められなかった。またrubiscolin-6投与により視床下部におけるL-PGDSのmRNA発現量が増加したことから、rubiscolin-6の摂食促進作用はL-PGDSを介していることがわかった。一般に脳内PGD_2は、脳を包むくも膜や脳実質のオリゴデンドログリアに局在するL-PGDSにより産生されているが、L-PGDS^{flox}/Nescreマウスでは、脳実質のL-PGDSを選択的に欠損し、くも膜のL-PGDSだけが発現していることを免疫染色法により確認した。興味深いことにrubiscolin-6は、L-PGDS^{flox}/Nescreマウスにおいても摂食促進作用を示したことから、くも膜のL-PGDSを介して摂食促進作用を示すことが判明した。
　以上の結果より、rubiscolin-6は経口投与によりL-PGDS、特に、くも膜に局在するL-PGDSを介して摂食促進作用を示すものと考えられる。[1] Ohinata et al. *FEBS Lett* (2008)

food intake, δ opioid peptide, PGD_2

講演番号：3J11a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ J校舎11会場

Evaluation of the inhibitory effect of flavonols and catechins on monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria

○Yauhen Bandaruk, Toshiyuki Nakamura, Rie Mukai, Junji Terao
(Graduate School of Nutrition and Bioscience, the University of Tokushima)

Introduction. Monoamine oxidase-A (MAO-A) is a flavine enzyme located in the outer membrane of mitochondria. It plays the crucial role in the regulation of the level of neurotransmitter serotonin in the brain by catalyzing its oxidative deamination to 5-hydroxyindole acetaldehyde (5-HIAL), NH_3 and H_2O_2, which is responsible for the induction of oxidative stress in the central nervous system. It is suggested that quercetin and other plant flavonoids exerts antidepressant effect by attenuating MAO-A activity in the brain. However, the structure-activity relationship between flavonoids and MAO-A inhibition has not been fully clarified. Therefore the aim of this study was structure-functional analysis of different flavonols and catechins as MAO-A regulators.

Methods. Mouse brain mitochondria fraction was obtained from C57BL/6j mice by the conventional centrifugation method. MAO-A activity of the mitochondrial fraction was measured by two independent methods. One was the measurement of H_2O_2 generation during MAO-A reaction using Amplex Red Monoamine Oxidase Assay Kit (Invitrogen, USA). The other one was the direct measurement of 5-HIAL by HPLC analysis which was newly developed by our group (1). Five flavonols (quercetin, 8-prenyl quercetin, isorhamnetin (3'-*O*-methyl quercetin), tamarixetin (4'-*O*-methyl quercetin) and luteolin), four catechins ((-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin and (-)-epigallocatechin gallate) and flavone were selected to evaluate the contribution of structure features to MAO-A inhibition. IC_{50} of each tested flavononoid was obtained from the sigmoidal curve between the remained activity and concentration of tested flavonoids.

Results and Discussion. Among the tested flavonols and catechins, quercetin exerted the highest inhibitory effect in both methods. However, IC_{50} of quercetin measured by Amplex Red Assay Kit was 1 μM while measured by HPLC was 31 μM. This could be explained by the idea that quercetin inhibits the formation of H_2O_2 efficiently by acting as an antioxidant. Interestingly, IC_{50} of flavone that had no antioxidant activity was 46 μM and 43 μM by of Amplex Red Assay Kit method and HPLC method respectively. Therefore, flavone structure may be responsible for the most part of the inhibitory effect. Inhibitory effect of isoramnetin/tamarixietin measured by the HPLC method was lower than that of quercetin, indicating that *O*-methylation in the B-ring attenuates the effect of quercetin. We are now investigating the relationship between the inhibitory effect of each compound and the affinity to the enzyme active site of the enzymes.

(1) Yoshino et al. Nutrition 27:847-852 (2011)

flavonoid, monoamine oxidase-A, inhibition

講演番号：3J11a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ J校舎11会場

食用菊「もってのほか」成分による PC12細胞中のＭＡＰキナーゼ活性化作用

○仁科淳良、木村博一[1]（米沢女子短大・健康栄養、[1]国立感染研）

【目的】認知症やストレス性のうつは神経細胞の死滅が原因で引き起こされることが分かっている。一方、神経細胞中のマップキナーゼ（MAPK）が活性化されることにより、分化誘導や神経細胞死抑制が誘導される。我々は、山形県産農産物から種々の溶剤を用いて抽出物を調製し、各抽出物のPC12細胞に対する作用を予備実験的に測定した。結果、山形県特産の食用菊「もってのほか」の極性画分がPC12細胞のMAPKを活性化することが分かった。今回、もってのほか抽出物の、主にMAPKに対する作用を明らかにすることを目的とした。【方法と結果】陽性対照のNGFはPC12細胞のERK1/2、Akt、JNK1/2/3のリン酸化を促進し、p-38MAPKに対する作用は微弱であった。もってのほかのクロロホルム抽出物（Ｉ）はERK1/2のリン酸化を促進した。Ｉのオープンカラム分画物のPC12細胞に対する作用を測定した結果、クロロホルム：メタノール＝６０：４０画分は、ERK1/2、Akt、JNK2/3のリン酸化を促進することが分かった。また、当該画分はPC12細胞の血清枯渇誘導アポトーシスを微弱ながら抑制した。今後、活性成分の同定を目指す。

講演番号：3J11p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ J校舎11会場

LPS誘発の炎症反応における大麦焼酎粕抽出物の抗炎症効果

Antiinflammatory effect of fermented barley extract in response to LPS

○小口 一起、Giriwono PE、外薗 英樹[1]、白川 仁、駒井 三千夫（東北大・院農、[1](株)三和酒類）
○Kazuki Oguchi, Giriwono PE, Hideki Hokazono, Hitoshi Shirakawa, Michio Komai (Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [1]Sanwa Shurui Co.,Ltd.)

【目的】焼酎粕は、焼酎製造過程において、もろみを蒸留した後に残る不揮発性物質である。従来、飼料や肥料（一部は廃棄）など限定的に利用されているのみで、その高い付加価値利用が期待されている。大麦焼酎粕の水溶性画分である発酵大麦エキス（FBE）は、アルコール性肝障害抑制作用や脂肪肝抑制作用などを有し、機能性に富むことが示唆されている。本研究室では、FBEを摂取することにより、LPS誘発の肝障害が抑制されることを明らかにした。FBEを含む試験飼料を10日間給餌したラットに、リポポリサッカライド（LPS）を投与すると、LPS誘導の血漿AST、ALT活性が有意に減少し、肝障害が抑制されることが明らかになった。また、血漿および肝臓SODやカタラーゼ活性の増加が観察された。以上のことから、FBEはLPS誘発の炎症反応を抑制し、その一部はFBEが持つ抗酸化作用によることが示唆された。しかし、FBE中の抗炎症作用物質の分離・同定は行われていない。そこで本研究では、FBEを分画して得られた各フラクションの抗炎症作用を実験動物、および培養細胞を用いて解析した。
【方法】FBEの分画：スチレン系吸着樹脂を用いてFBEを分画した（PおよびS画分）。また、FBEを同様の樹脂に吸着させ、エタノールでステップワイズ溶出させた（P-10、P-20、P-99画分）。動物実験：Wistar系ラット8週齢雄に、FBEおよび分画した画分（5 mg/kg体重）を単回経口投与し、LPS（0.5 mg/kg体重）を腹腔内投与した。18時間後解剖に供し、肝障害マーカーである血漿ALT,AST活性、炎症マーカーである血漿IL-6濃度を測定した。培養細胞試験：P画分のサブフラクション（1 mg/ml）でマウス由来マクロファージ様細胞（RAW264.7）を処理した後、LPS（1μg/ml）で処理した。一定時間後、Total RNAを回収し、炎症性サイトカインのmRNA発現量を定量RT-PCR法で測定した。また、各フラクションの細胞毒性をWST-1 assay法で測定した。
【結果】FBEをラットに単回投与した場合、LPSによる血漿AST,ALT活性、IL-6濃度の上昇が抑制された。しかし、FBEを分画したPおよびS画分の単独投与では、抗炎症作用は見られなかった。RAW細胞を用いた細胞実験において、P画分のサブフラクションであるP-10、P-20は、LPS処理によるIL-1β、IFN-βのmRNA発現量を有意に抑制した。一方、S画分はIL-1β、IFN-βのmRNA発現抑制効果は見られなかった。以上より、FBEによる抗炎症作用はP-10、P-20画分中の成分に起因しており、S画分は活性成分の安定性や消化管からの吸収に関与している事が示唆された。また、細胞実験においてP-10とLPSを同時添加した際にもIL-1β、IFN-βのmRNA発現が抑制されたことから、細胞内変化を介さない抑制機構によることが示唆された。一方、P-20画分では、同時添加で効果が見られず、LPS刺激前に6時間以上のプレインキュベーションが必要であったことから、P-10に含まれる成分とは異なる成分が抗炎症作用を示すことが示唆された。

fermented barley, lipopolysaccharide , inflammation

講演番号：3J11p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ J校舎11会場

クマリン類の抗炎症作用における分子機序の類似性とアルキルオキシ基の寄与

Similarity in molecular mechanisms of anti-inflammatory coumarins and importance of the alkyloxy group in those action

○川畑 球一、奥村 真由、宮下 美希、杉山 友太、高橋 正和、大東 肇（福井県大・生物資源）
○Kyuichi Kawabata, Mayu Okumura, Miki Miyashita, Yuta Sugiyama, Masakazu Takahashi, Hajime Ohigashi (Dept. of Biosci., Fukui Prefec. Univ.)

【目的】慢性炎症は、がんや動脈硬化を発症する危険性を高めることから、食品成分の抗炎症作用が大きく注目されている。クマリン類は、柑橘類に豊富な化合物群であり、その一つであるauraptene（7-geranyloxycoumarin）は強力な抗炎症作用を有することが知られている。その分子機序は、翻訳段階での抑制であることが明らかにされているが、他のクマリン類に関する知見は得られていない。そこで本研究では、クマリン類の抗炎症作用および分子機序について、aurapteneのそれと比較検討することを目的とした。【方法】クマリン類の抗炎症活性は、リポ多糖（LPS）刺激により活性化したマウスマクロファージRAW264細胞の一酸化窒素（NO）産生を指標として評価した。RAW264細胞は、クマリン類を添加した無血清培地中で30分間培養した後、LPSを添加してさらに24時間培養した。NO産生量は、培地中のNO_2^-をGriess法で検出することにより測定した。誘導型NO合成酵素（iNOS）の発現は、LPS処理後24時間（タンパク質）と4時間（mRNA）の細胞を用いて、それぞれWestern blot法とReal Time RT-PCR法により解析した。【結果】クマリン類は、5-geranyloxy-7-methoxycoumarinを含め、いずれもauraptene（IC_{50} = 17.5 μM）と比較して弱いNO産生抑制活性を示し（IC_{50} > 200 μM）、一方、フラノクマリン類では、bergamottin（5-geranyloxypsoralen, IC_{50} = 10.2 μM）とimperatorin（8-dimethylallyloxy-psoralen, IC_{50} = 17.1 μM）が、aurapteneと同程度のNO産生抑制活性を示した。この結果から、活性発現におけるアルキルオキシ基の存在とその位置の重要性が示唆された。BergamottinとimperatorinのNO産生抑制作用機構を検討した結果、どちらもiNOSのmRNA発現量に影響を与えることなく、タンパク質量を減少させていたことから、aurapteneと同様に翻訳段階を抑制していることが明らかとなり、クマリン類は類似の分子機序で抗炎症作用を発揮する可能性が強く示唆された。現在、分子機序の詳細な解析とともに、数種の7位アルキルオキシクマリンを合成し、抗炎症活性とアルキルオキシ基の炭素鎖長との関係について検討を進めている。

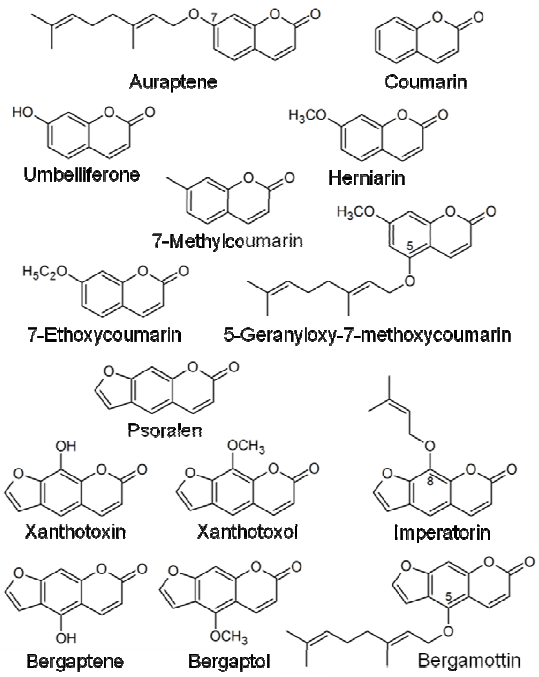


図　試験したクマリン類（14 種）

Coumarins, Anti-inflammatory activity, Alkyloxy groups

講演番号:3J11p04
講演日時、会場:3月24日14:22～ J校舎11会場

キンギンカ抽出液のNF-κB活性化抑制作用

Inhibitory effect of Lonicera japonica extract on NF-kappaB activation

○横田 紗綾、伊賀 和宏（三省製薬）
○Saya Yokota, Kazuhiro Iga(SANSHO SEIYAKU)

【背景・目的】NF-κBは、炎症に関わる様々な遺伝子の発現を誘導する転写因子で、皮膚では表皮細胞や線維芽細胞に存在している。紫外線や炎症などの刺激により過剰に発現すると、サイトカインの産生を誘導し、メラノサイトの活性化や表皮細胞の過増殖、コラーゲンの分解などが起こり、皮膚の色素沈着や光老化に繋がることが報告されている。我々が開発した医薬部外品美白有効成分コウジ酸は、高いNF-κB活性化抑制作用を有しており、コウジ酸の高い美白・抗老化作用のメカニズムのひとつであると考えている。これらのことから、皮膚においてNF-κBの活性化を抑制することができれば、コウジ酸のような美白や抗老化の効果が期待できる。キンギンカ（*Lonicera japonica*、和名スイカズラ）について、水抽出物の同作用を評価したところ高い効果が認められた。キンギンカはスイカズラ科のつる性植物で、その花蕾は清熱、解毒作用などがある生薬として知られている。抗酸化作用、抗炎症作用などの薬理活性も確認されており、多くの研究報告がなされている。我々はキンギンカの、紫外線で誘導した皮膚炎症の抑制効果、およびNF-κB活性化抑制作用を指標に、キンギンカ水抽出物中の活性成分を調べた。
【方法】１．キンギンカ水抽出物を4%配合した乳液をヒト皮膚に塗布し、紫外線を照射して皮膚の炎症度および色素沈着度を評価した。２．キンギンカ水抽出物を限外ろ過膜による分子量分画、もしくは吸着樹脂によるカラム分画に供し、得られた画分のNF-κB活性化抑制作用およびDPPHラジカル消去作用を測定した。前者作用の測定は、線維芽細胞を用いたレポータージーンアッセイにより行った。
【結果】１．プラセボと比較し、キンギンカ水抽出物塗布部位では炎症が抑えられ、結果的に色素沈着を抑えることが確認された。２．分子量分画では1,000以下、SP207によるカラム分画では10%～30%エタノール溶出画分に強い活性を認めた。現在、これらの画分に含まれる成分の同定を試みている。

Lonicera japonica, NF-kappaB

講演番号：3J11p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ J校舎11会場

マクロファージにおけるポリフェノールの抗炎症作用機構の解析

Molecular Mechanism for Anti-inflammatory Effects of Polyphenols in Macrophages

○神原 哲士、河合 慶親、柴田 貴広、内田 浩二（名大院生命農・応用分子生命科）
○ Tetsuji Kambara, Yoshichika Kawai, Takahiro Shibata, Koji Uchida (Grad.Sch.of Bioagric.Sci., Nagoya Univ.)

【目的】近年注目されている機能性食品成分の一つにポリフェノールが挙げられる。食品中のポリフェノールの多くは、フラボノールやカテキン、アントシアニジン色素などのフラボノイド類やこれらの重合物である。疫学調査や動物実験などから、ポリフェノールの心血管疾患に対する効果が報告されており、その作用機構として、in vitroにおいて観察される抗酸化性や、様々な酵素活性への作用などが予想されているが、その詳細については不明な点が多い。特に、i）ポリフェノールの多様性・種類の違いによる生体利用性の差異や、ii）in vivoにおけるポリフェノールの存在形態や標的部位についてはほとんど明らかになっていない。ポリフェノールによる心血管疾患抑制のメカニズムの一つとして、抗炎症作用が考えられている。特に、ケルセチンにおいてはマクロファージへの蓄積や抱合体からアグリコンへの活性化が示唆されおり、マクロファージがその作用標的の一つと考えられる。これまでに様々なポリフェノールの抗炎症作用が報告されているが、その作用機序や標的分子など未だ解明されていない課題は多い。そこで本研究では、食事由来の主要なフラボノイドの一つであるケルセチンのマクロファージに対する作用に着目し、ケルセチンの抗炎症作用に関わる作用機序の解析を進めることとした。
【方法と結果】RAW264細胞（マウスマクロファージ様細胞）にLPSとケルセチンあるいはその構造類縁体をそれぞれ同時投与し、4時間培養後、炎症応答の指標となるシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2），誘導型NO合成酵素（iNOS）の発現をウエスタンブロットで評価した。その結果、ケルセチンによってこれらの発現量は有意に抑制され、特にiNOSにおいて顕著な抑制作用が認められた。C環3位の水酸基を欠くルテオリンやA環5位の水酸基を欠くフィセチンにおいても顕著なiNOS抑制作用が認められたが、B環5’位に水酸基が付加したミリセチンでは抑制作用が減弱した。よって、フラボノイドのB環構造がiNOS抑制作用に重要であることが示唆された。ケルセチンはLPSによって誘導されるシグナル伝達経路のうち、JNK並びにその上流因子であるMKK4のリン酸化を有意に抑制したが、ERK、p38、NFκB経路については抑制しなかった。一方、LPSによるiNOS発現はJNK阻害剤であるSP600125により抑制された。以上の結果より、ケルセチンはJNK経路を選択的に阻害することでiNOSの発現を抑制している可能性が示唆された。現在、ケルセチンやその類縁体の作用機構について詳細な解析を行っている。

polyphenol, inflammation

講演番号：3J11p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ J校舎11会場

タイトル　スダチ果皮ポリメトキシフラボンの抗炎症作用に関する研究

Title　Effect of the polymethoxyflavone in *Citrus sudachi* on antiinflammation

○播田 元輝、湯浅 恵造、多田 かおり、藤本 智美、津嘉山 正夫、辻 明彦(徳島大・STS研究部)
○Genki Harita, Keizo Yuasa, Kaori Tada, Tomomi Fujimoto, Masao Tsukayama, Akihiko Tsuji
(Dept. of Biol. Sci. & Tech., Univ. of　Tokushima, Grad. Sch.)

柑橘類の果皮に含まれているフラボノイド成分であるポリメトキシフラボン類は、抗酸化作用、発ガン抑制作用、抗菌抗ウイルス作用、抗アレルギー作用、メラニン生成抑制作用など様々な機能性を有している。徳島県の特産物であるスダチの果皮には他の柑橘類には全く含まれてないスダチチン（Sudachitin,5,7,4’-trihydroxy-6,8,3’-trimethoxyflavone）が含まれているが、このポリメトキシフラボンの機能性については未だほとんど解析がなされていない。

本研究では、マウスマクロファージ様細胞であるRaw264細胞を用いて、スダチチンの抗炎症作用について検討した。まず、スダチチンのRaw264細胞の増殖に及ぼす影響をMTTアッセイにより評価した。30μMの濃度ではRaw264細胞の増殖にはほとんど影響を与えず、その濃度においては細胞毒性を示さないことが明らかとなった。次に、スダチチンのエンドトキシン（LPS）刺激によるTNF-αとNO産生に及ぼす効果について検討した。スダチチンで前処理したRaw264細胞にLPSを添加し、その後、培養上清のTNF-αについてはELISA法で測定し、NOは2,3-diaminonaphthalene法で測定した。その結果、LPS刺激によって誘導されたTNF-αとNO産生がスダチチン濃度依存的に抑制されることが明らかとなった。さらに、LPS刺激によって発現上昇するTNF-αと誘導型NO合成酵素（iNOS）の遺伝子発現に及ぼす効果についても検討した。リアルタイムPCR法によってLPSによって上昇したiNOS mRNAが30μMスダチチン処理によって約55%減少した。同様に、LPSによって上昇したTNF-α mRNAは30μMスダチチン処理によって約27%減少した。以上の結果から、スダチチンはTNF-αとiNOS発現の抑制を通してLPSによって誘導されたNO産生を減少することが判明した。一方、シークワーサー果皮由来のノビレチン（Nobiletin、5,6,7,8,3’,4’-hexamethoxyflavone）は同様の実験においてスダチチンと比較して効果は低かった。TNF-αおよびiNOS遺伝子の発現はNF-κBによって調節されていることから、スダチチンはNF-κBシグナル伝達経路に作用して抗炎症作用を有することが考えられた。

これまでに、NF-κBシグナル伝達経路がcAMP-PKAシグナルによって抑制されることが報告されている。一方、ポリフェノールがcAMP分解酵素であるホスホジエステラーゼ（PDE）を阻害することが知られている。現在、NF-κBシグナル伝達経路に関わるとされるPDE1とPDE4に対するスダチチンの阻害効果について検討しており、合わせて報告したい。

polymethoxyflavone,anti-inflammation,phosphodiesterase

講演番号：3J11p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ J校舎11会場

黒ウコンに含まれるポリメトキシフラボノイドの抗炎症作用機序の解析

Studies on anti-inflammatory mechanism of polymethoxyflavonoids from *Kaempferia parviflora*

○堀籠 悟[1,2]、原田 哲平[1]、永井 武[1]、鈴木 美そら[1]、三嶋 隆[1]、渡辺 章夫[1]、吉田 泉[1]、川本 康晴[1]、穏田 友子[1]、吉安 友二[1]、勝田 真一[1]、山口 昭弘[1]、渡井 正俊[1]、白川 仁[2]、駒井 三千夫[2]（[1]日本食品分析セ、[2]東北大院農・生物産業創成・栄養学）

○Satoru Horigome[1,2], Teppei Harada[1], Takeshi Nagai[1], Misora Suzuki[1], Takashi Mishima[1], Akio Watanabe[1], Izumi Yoshida[1], Yasuharu Kawamoto[1], Tomoko Onda[1], Tomoji Yoshiyasu[1], Shin-ichi Katsuda[1], Akihiro Yamaguchi[1], Masatoshi Watai[1], Hitoshi Shirakawa[2], Michio Komai[2] ([1]Japan Food Research Laboratories, [2]Grad.Sch.Agri.Sci.,Tohoku Univ)

【目的】黒ウコン(黒ショウガ, *Kaempferia parviflora*)はショウガ科の植物であり，我が国ではサプリメントとして利用され，タイにおいては抗炎症薬や胃腸薬，調味料として伝統的に用いられている。これまでの研究から，黒ウコンの機能性として，脱顆粒抑制作用，抗炎症作用などが知られている。我々はこれまで，黒ウコンにはポリメトキシフラボノイドが含まれていること，そのうち，5,7-dimethoxyflavone(DME)，5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone(TME)が，シークヮーサーの抗炎症成分であるノビレチン(Nob)を上回る強い脱顆粒抑制作用，炎症性サイトカイン類のmRNA発現抑制及びタンパク質分泌抑制作用を有することを確認した。そこで，沖縄産黒ウコンに含まれ，脱顆粒抑制作用を示すこれらの成分がIgE受容体シグナル伝達経路に与える影響を調べた。

【方法】黒ウコン1gにヘキサン/PBSまたは50%エタノールを加え，それぞれ抽出した。抽出液をラット好塩基球性白血病細胞株RBL-2H3に添加し，抗原刺激した後，タンパク質溶液を得た。このタンパク質溶液について，SDS-PAGE及びウェスタンブロットを行い，IgE依存性Ⅰ型アレルギーの細胞内リン酸化シグナル伝達に関わるタンパク質(Syk，Lyn，PKC-α，Akt，ERK1/2)のリン酸化検出を試みた。また，黒ウコンに含まれるメトキシフラボノイドのうち，標準品が市販されているDME，TME及びNobについても同様にリン酸化に与える影響を解析した。

【結果】黒ウコンヘキサン/PBS抽出物，50%エタノール抽出物，DME及びTMEにおいて，濃度依存的なERK1/2のリン酸化抑制が認められた。一方，Nobにおいては，これらと比較し，1～100μMの範囲でERK1/2のリン酸化抑制がみられなかった。以上より，黒ウコン抽出物，DME及びTMEは，ERK1/2あるいはその上流のリン酸化シグナル伝達を抑制し，同様のポリメトキシフラボノイドであるNobとは異なる作用機序により，抗炎症作用を示す可能性が示唆された。

polymethoxyflavonoid, inflammation, degranulation

講演番号:3J11p08
講演日時、会場:3月24日15:16～ J校舎11会場

鶏卵卵黄タンパク質およびホスビチンの抗炎症作用

Anti-inflammatory effect of Egg yolk protein and phosvitin

○田中翔子、齋藤一成、高部祐允[1]、升本早枝子[1]、石川伸一（宮城大・食産業、[1]北里大・獣医）

○Shoko Tanaka, Kazunari Saito, Yuusuke Takabe[1], Saeko Masumoto[1], Shin-ichi Ishikawa (Miyagidai, [1]Kitasatodai)

【目的】炎症性腸疾患の1つである潰瘍性大腸炎(UC)は、大腸粘膜にびらんや潰瘍を引き起こす難病である。近年、その認定患者数は増加の一途を辿っており、平成21年度には10万人を超えた。発症原因等は未だ明らかになっておらず、炎症発症要因の1つとして腫瘍壊死因子-α(TNF-α)、インターロイキン-1β(IL-1β)、インターロイキン-8(IL-8)などの炎症性サイトカインの過剰産生が挙げられている。そこで炎症性サイトカインの過剰産生を抑制することが,UCの予防・改善に繋がると考え、免疫調節作用やなどの様々な機能性が報告されている鶏卵卵黄タンパク質に着目した。特に、ホスビチンは鶏卵卵黄タンパク質に6%含まれているリン酸化タンパク質であり、抗酸化作用や大腸がんの予防作用などを有することが明らかになっている。本研究では、鶏卵卵黄タンパク質およびホスビチンをヒトの消化条件下で*in vitro*消化した分解物の、lipopolysaccaride(LPS)によって誘発されたTNF-αの抑制効果を*in vitro*系で検討することを目的とした。

【方法】鶏卵卵黄タンパク質及び鶏卵卵黄由来ホスビチンを、ペプシン(pH1.5、37℃)とパンクレアチン(pH7.5、37℃)により*in vitro*消化を行い、卵黄タンパク質分解物およびホスビチン分解物を得た。マウス由来マクロファージ様RAW264.7細胞に、卵黄タンパク質分解物およびホスビチン分解物(0.1、0.25、0.5、1.0mg/ml)をそれぞれ添加し、3時間培養した。その後、大腸菌（*E. coli* 0111:B4）由来のLPS（100ng/ml)を添加することで炎症反応を誘導した。LPS添加24時間後の培養上清を回収し、ELISA法によりTNF-α産生量を測定した。

【結果】ELISAの結果、卵黄タンパク質分解物を添加していないコントロール区と比較してTNF-α産生量が、卵黄タンパク質分解物1.0mg/ml添加区では98.9%、0.5 mg/ml添加区では90.8%、0.25 mg/ml添加区では80.8%、0.1 mg/ml添加区では49.2%減少した。ホスビチン分解物においても、TNF-α産生量がコントロール区と比較して1.0mg/ml添加区で93.7%、0.5 mg/ml添加区で87.9%、0.25 mg/ml添加区で67.4%、0.1 mg/ml添加区で34.5%減少した。卵黄タンパク質分解物及びホスビチン分解物による、濃度依存的なTNF-αの抑制がみられた。これらの結果より、鶏卵卵黄タンパク質およびホスビチン分解物が、炎症性サイトカインを抑制することが示唆された。現在、マウスDSS誘発UCモデルを用いたin vivo系で、卵黄タンパク質及びホスビチンの抗炎症作用を検討している。

anti-inflammatory, egg yolk protein, phosvitin

講演番号：3J11p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ J校舎11会場

Bifidobacterium breve M-16Vによる離乳期ラット腸炎抑制作用

Effect of *Bifidobacterium breve* M-16V on colitis in weanling rat

○和泉裕久、峯岸真梨緒、佐藤洋平、清水隆司、関根一則、高瀬光徳（森永乳業・栄科研）
○Hirohisa Izumi, Mario Minegishi, Youhei Sato, Takashi Shimizu, Kazunori Sekine, Mitsunori Takase (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【目的】炎症性腸疾患（IBD）の発症には、各種動物モデルなどによる検討から、腸内細菌叢の関与が示唆されている。患者の約20%程度は学童期・青年期に発症するが、各種動物モデルを用いた検討の多くは成獣動物を用いたものであり、若齢動物を用いた検討は少ない。今回様々な生理作用が知られている*Bifidobacterium breve* M-16V（M16V)を用いて離乳期ラットにおける大腸炎への作用を検討した。
【方法】妊娠F344/Nラットを購入し、仔ラットを生後20日目に離乳させた。生後21日目より試験終了後まで、PBSに懸濁したスターチまたはPBSに懸濁したM16V（2.5×10^9 cfu/rat）を毎日ゾンデで投与した。28日齢からdextran sodium sulphate (DSS, M.W.=36,000～50,000)を0または2％溶解した飲水を自由摂取させた。群構成は①水－Starch群、②水－M16V群、③DSS－Starch群、④DSS－M16V群とし、DSS投与7日目（35日齢）に解剖を行なった。
【結果】③群にくらべ④群で体重減少、大腸の短縮、大腸の肥厚、出血に伴う末梢血赤血球数・ヘモグロビンの減少がいずれも有意に抑制され、栄養状態の指標と考えられる血中Albumin, IGF-Iが有意に高値を示した。また、炎症による脾細胞培養上清中IFN-γ・IL-2の産生減少が抑制された。非炎症群である①群、②群の比較においては末梢血リンパ球中のNK細胞割合の増加、脾細胞培養上清中のIL-17産生抑制が見られた。以上の結果から、DSSにより炎症を誘導した離乳後若齢ラットの大腸において、M16Vは炎症抑制作用を発揮し、栄養障害による発育遅延を予防する可能性が示唆された。また、非炎症群間の比較から、M16Vは発達期においても免疫系に作用している可能性が示唆された。

Keyword1 Bifidobacterium, Keyword2 weanling, Keyword3 colitis

講演番号:3J11p10
講演日時、会場:3月24日15:38～ J校舎11会場

高分子ヒアルロン酸経口摂取のラットにおけるカラギーナン誘発炎症性疼痛に対する作用

Effect of oral administration of high-molecular weight hyaluronan on carrageenan-induced inflammatory pain in rats.

○栗原仁[1]、釣木隆弘[1]、木村守[1]、増田泰伸[1]（キユーピー㈱[1]）、浅利晃[2]（㈱ヒアルロン酸研究所[2]）
○Hitoshi Kurihara[1], Takahiro Tsuruki[1], Mamoru Kimura[1], Yasunobu Masuda[1] (Kewpie Co.[1]), Akira Asari[2] (Hyaluronan Research Institute, Inc.[2])

【目的】近年、ヒアルロン酸をサプリメントとして経口摂取すると、膝の疼痛が軽減することが報告されている。今回は、λ-カラギーナンで誘発したラットの疼痛モデルを用いてヒアルロン酸の飲水投与による疼痛および炎症の軽減効果を検証した。
【方法】5週齢のWistar系雄性ラットに900kDaの高分子ヒアルロン酸を４週間飲水投与（200mg/kg body weight/Day）した。その後1%のλ-カラギーナン溶液0.1mLを後肢足蹠皮下に注入し、経時的に足容積測定を行った。イソフルラン麻酔下にて血漿および後肢浸出液を採取し、疼痛物質であるブラジキニン（以下、BK)、疼痛増強因子であるプロスタグランジンE_2（以下PGE_2）を測定した。
【結果および考察】λ-カラギーナンで誘発したラット疼痛モデルでは足容積（足浮腫）が増加し、浸出液中のBKとPGE_2が経時的に増加した。高分子ヒアルロン酸を経口摂取させていたラットでは足浮腫と浸出液中のBKおよびPGE_2の増加抑制が確認された。以上の結果は、高分子ヒアルロン酸の経口摂取による疼痛軽減効果の作用機序の一部を示すものである。

Hyaluronan, pain, prostaglandin

講演番号：3J11p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ J校舎11会場

腸管上皮細胞のToll様受容体刺激を介した免疫調節機能に対するカルノシンの亢進効果

Promotive effect of carnosine on immune-regulatory function of intestinal epithelial cells stimulated via Toll-like receptors.

○津田　悠一、岩本　拓、清水　誠、戸塚　護（東大院農生科・応生化）
○Yuichi Tsuda, Taku Iwamoto, Makoto Shimizu, Mamoru Totsuka(Department of Applied Biological Chemistry,The University of Tokyo)

【目的】腸管は栄養素の消化吸収の場であると同時に、病原微生物やアレルゲンなど様々な生体異物にさらされている。その最前線にある腸管上皮細胞（IEC）は物理的なバリアーになる他、Toll様受容体（TLR）等を介した微生物成分の認識により、液性因子を分泌することで、腸管免疫系の調節を行っている。また、IECが分泌する液性因子は、粘膜固有層における免疫グロブリンA（IgA）の産生調節に関与することが知られている。本研究では、食品由来のジペプチドであるカルノシンがTLRリガンド刺激したマウス小腸IEC株のサイトカイン産生に与える効果、およびそのIEC上清のIgA産生誘導効果について検討した。
【方法】BALB/cマウス由来小腸IEC株（MoS13）をカルノシンで24時間前処理した後、各種TLRリガンドをカルノシンと共に添加し、上清中のIL-6量をELISA法により測定した。また、IL-6 mRNA量を定量RT-PCR法で測定し、IL-6プロモーター活性をレポーターアッセイで測定した。マウス小腸粘膜固有層から調製したIgA産生形質細胞（IgA^+B220^-細胞）を、前述のMoS13培養上清と共に培養し、上清中のIgA量をELISA法により測定した。
【結果】カルノシンは、Pam3CSK4（TLR1/2リガンド）、Poly I:C（TLR3リガンド）、LPS（TLR4リガンド）で誘導されるMoS13細胞のIL-6分泌を増強した。カルノシンによるIL-6産生増強効果はmRNAレベルでも確認され、Pam3CSK4刺激においてはIL-6プロモーター活性の上昇も確認された。また、各種TLRリガンドで刺激したMoS13細胞の培養上清は、IgA産生形質細胞のIgA分泌を増加させ、MoS13細胞のカルノシン処理によりその活性が増強された。また、IgA産生形質細胞とMoS13細胞培養上清の共培養の際に、IL-6中和抗体を添加すると、TLRリガンドおよびカルノシンによるIgA分泌増強が抑えられた。さらに、MoS13細胞のIL-6をノックダウンした細胞の培養上清をIgA産生形質細胞と共培養しても、TLRリガンドおよびカルノシンによるIgA分泌増強が抑えられた。以上の結果から、カルノシンが腸管上皮細胞のTLRリガンド刺激によって誘導されるIL-6分泌を増強させ、それにより粘膜固有層のIgA産生量を増強させることが示され、カルノシンが腸管粘膜免疫を増強する効果を有する可能性が示唆された。

Carnosine, Intestinal epithelial cell, IgA

講演番号：3J11p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ J校舎11会場

発芽ブドウ種子エキスの OVA 感作マウスにおける抗体およびサイトカイン濃度に及ぼす影響

Effects of GGSE on antibody and cytokine levels in OVA-sensitized mice

○比江森　美樹、藤倉　路子、鈴木　麻希子、村田　健二[1]、落合　孝次[2]（岡山県大保福・栄養、[1]カリフォルニア大・デービス、[2]シードライフテック（株））

○Miki Hiemori, Michiko Fujikura, Makiko Suzuki, Kenji Murata, Koji Ochiai(Okayama Pref. Univ., UC-Davis, Seed-Life Tech. Inc.)

【目的】発芽ブドウ種子エキス(GGSE)は未発芽ブドウ種子エキスと比較して、水溶性ポリフェノールを多く含有し、高い抗酸化性を有することから、機能性が期待される食品素材として利用されている。我々は既に、GGSEの抗アレルギー作用について検討し、GGSEの単回経口投与によりanti-DNPおよびDNP-Albの組み合わせによる受動皮膚アナフィラキシー反応が抑制されることを明らかにしている。本研究では、食物アレルギーモデル動物としてオボアルブミン(OVA)感作マウスを作製し、抗原刺激時のGGSEの経口投与が感作マウスにおける抗体ならびにTh1、Th2サイトカイン濃度に及ぼす影響について検討した。

【方法】BALB/cマウス（6週令、雄）に実験開始日ならびに14日目にOVA 2μgを水酸化アルミニウムとともに腹腔内に免疫した。初回免疫の20日目から5日間連続して、テスト群にはGGSE(250 mg, 500 mg/kg)をコントロール群にはPBSを経口投与後、1時間後にOVA 1 mgを経口投与してアレルギー反応を誘発した。最終投与の2日後に解剖して血液と脾臓を採取し、血漿総IgE、OVA特異的IgEおよびIgG、ならびに脾細胞培養液に放出されたIL-4およびIFN-γをELISA法で測定した。

【結果および考察】GGSEを投与したテスト群では、コントロール群に対して総IgE濃度は有意に低下し、OVA特異的IgE濃度も低値を示した。IgG1およびIgG2aに有意差は認められなかった。脾細胞培養液のサイトカイン濃度は、Th1サイトカインであるIFN-γ濃度に変化は認められなかったが、Th2サイトカインのIL-4濃度が有意に低下した。この結果は、GGSEはTh2優位のアレルギー状態からTh2細胞の活性化を抑制することによりTh1/Th2バランスを是正することを示唆する。以上の結果から、既に抗体感作が成立し、IgE抗体濃度が上昇した状態のマウスに対するGGSEの経口投与は、Th2サイトカインの分泌抑制を通してIgE濃度の低下を導き、アレルギー反応を抑制する可能性を示した。

germinated grape seed extract, OVA-sensitized mouse

講演番号：3J11p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ J校舎11会場

ケンフェロールが制御性 B 細胞の分化誘導と機能に与える影響

Effects of kaempferol on the development and function of regulatory B cells

○葉 鎮豪、王 璽凱、薩　秀夫、清水　誠、戸塚　護　（東大院農生科・応生化）
◯Chen-Hao Yeh, Hsi-Kai Wang, Hideo Satsu, Makoto Shimizu, Mamoru Totsuka (The University of Tokyo)

【Aim】 In addition to the convinced ability of B cells to prime and activate the immune system, a specific B-cell subset with regulatory function (Bregs) has been identified recently, which supporting the notion that B cells also mediate an important means for the control of excessive immune responses.　Since kaempferol had been reported to have demonstrative anti-inflammation effects, we made an investigation to examine the effect of kaempferol on the differentiation and function of murine regulatory B cells.

【Methods】 $B220^+$ B cells isolated from spleens, mesenteric lymph nodes, Peryer's patches and peritoneal cavity of BALB/c and C57BL/6 mice were cultured with kaempferol in the presence or absence of CpG and lipopolysaccharide (LPS) co-stimulation.　The development and/or maturation of Bregs were evaluated by ELISA assay for cytokine secretion, flow cytometry, and suppression assay for $CD4^+$ T cells' proliferation and polarization.

【Results and Discussion】 Kaempferol was found to effectively enhance the proliferation and interleukin-10 (IL-10) production of Bregs induced by CpG/LPS-stimulation of B cells derived from spleen, mesenteric lymph node, Peyer's patch and peritoneal cavity.　An antagonist assay also clarified the involvement of AhR signaling within the activation of Bregs by kaempferol.　These results strongly suggest that kaempferol may be a potent regulator of Bregs' development and thus provide an important means for the maintenance of immune tolerance against allergy or autoimmune diseases.

Polyphenol, Immunosuppression, Interleukin-10

講演番号：3J11p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ J校舎11会場

TLRシグナリングを制御する植物野菜成分の探索

Identification of vegetable ingredient as a TLR signaling regulator

柴田 貴広、○本多 和也、河合 慶親、田中 浩士[1]、高橋 孝志[1]、三宅 健介[2]、牛田 悠介[3]、相澤 宏一[3]、内田浩二（名大院生命農・応用分子生命科、[1]東工大院理工・応化、[2]東大・医科研、[3]カゴメ（株）総研）

Takahiro Shibata, ○Kazuya Honda, Yoshichika Kawai, Hiroshi Tanaka[1], Takashi Takahashi[1], Kensuke Miyake[2], Yusuke Ushida[3], Koichi Aizawa[3], Koji Uchida (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [1]Tokyo, Inst. Technol, [2]Univ. Tokyo, Inst. Med, Sci., [3]Res. Inst. Kagome)

【目的】Toll-like receptor (TLR) は自然免疫におけるパターン認識受容体である。TLRは病原体に存在するリポタンパク質や核酸といった特定の分子パターンを認識し、下流シグナルを活性化することで炎症応答を引き起こし、感染防御において重要な役割を果たしている。しかしながら近年では、種々の内因性物質がリガンドとなることでTLRのシグナル伝達を活性化することも明らかとなりつつある。ウイルス感染や酸化ストレス等により炎症応答が慢性化した際に、動脈硬化やがん、自己免疫疾患といった慢性炎症性疾患へと発展することも示唆されている。そこで本研究では、抗炎症という観点からTLRシグナリングを抑制する食品成分の探索およびその作用機構の解析を行った。

【方法・結果】TLR遺伝子およびNF-κBルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入したHEK293細胞を用いて、ルシフェラーゼアッセイによりTLRシグナリングを抑制する野菜抽出物のスクリーニングを行った。TLRシグナリング抑制活性が見られたキャベツ酢酸エチル抽出物についてHPLCにより活性物質を単離・精製し、MS及びNMRによる構造決定を行った結果、アブラナ科植物特有のイソチオシアネート化合物である3-(methylsulfinyl)propyl isothiocyanate (iberin) を同定した。マウスマクロファージRAW264.7細胞においても、iberinによるcyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現抑制や炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制が確認された。アブラナ科植物にはiberinの他にもsulforaphaneや6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanateといった数多くのイソチオシアネート化合物が含まれていることから、iberinのアナログを用いたTLRシグナリング抑制活性の構造活性評価を行った。その結果、methylsulfinyl基の硫黄原子の酸化に伴いTLRシグナリング抑制活性が増加することが明らかとなった。また、iberinは反応性に富むイソチオシアネート基を有することから、細胞内において何らかのタンパク質を化学修飾することにより抗炎症作用を発揮する可能性が考えられた。そこで現在、iberin標的タンパク質に焦点を当て、その作用機構についての解析を進めている。

Toll-like receptor, inflammation, isothiocyanate

講演番号：3J11p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ J校舎11会場

脾臓細胞のTh1とTh2サイトカイン誘導における*Cordyceps millitaris* JLM 0636エキスの効果

Effect of the *Cordyceps millitaris* JLM 0636 Extract on the Induction of Th1 and Th2 Cytokines in Murine Splenocytes

○姜　秉元[1]、 徐　玫貞[1,2]、朴　正郁[1]、金　光赫[3]、鄭　永基[1,2]（[1]東亜大・メディファーム産業化研究事業団、[2]東亜大・生命工、[3]高神大・医）

○Byoung-Won Kang[1], Min-Jeong Seo[1,2], Jeong-Uck Park[1], Kwang-Hyuk Kim[3], Yong-Kee Jeong[1,2] ([1,2]Dong-A University, [3]Kosin University)

【Purpose】To investigate the effect of an edible mushroom, *C. millitaris* JLM 0636 on the production of Th1 and Th2 cytokines, the induction of interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) and interleukin-12 (IL-12) by the hot water extract of the mushroom was analyzed.

【Methods】The hot water extract of *C. millitaris* containing a high concentration of cordycepin generated by the hybrid mating of 10 *C. millitaris* strains was injected into female C57BL/6 mice. Then the spleen cells were cultured using a 5% CO_2 incubator at 37°C for 3 days. The cytokine production by total spleen cells were measured using the ELISA method.

【Results】The level of cytokine induction was estimated on coinoculation of the extract with a cell stimulant, LPS. As a result, when *C. millitaris* JLM 0636 extract was exposed to mouse spleen cells for 72 h, the induction of IL-4 and IL-10 was significantly observed. Of note, the induction rate of IL-12 by the extract was dramatically higher, compared to the control group. However, the induction of Th1 cytokine, IL-2 was not observed. Therefore, these findings suggest that the hot water extract of *C. millitaris* JLM 0636 has a significant effect on induction of Th1 and Th2 cytokines.

Cordyceps millitaris, splenocytes, Th cytokines

講演番号：3J11p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ J校舎11会場

柑橘類由来ナリンゲニンにより誘導されるマウス制御性T細胞の機能解析

Functional analysis of murine regulatory T cells induced by naringenin derived from citrus fruits

○王　璽凱[1]、葉　鎮豪[1]、岩本　拓[1]、薩　秀夫[1]、清水　誠[1]、戸塚　護[1]（[1]東大院農生科）
○Hsi-Kai Wang[1], Chen-Hao Yeh[1], Taku Iwamoto[1], Hideo Satsu[1], Makoto Shimizu[1], Mamoru Totsuka[1]（[1]Dept.Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo）

【Aim】 Flavonoid phytochemicals are the most ubiquitous polyphenol in human daily diet, and have been reported to own various health-relevant bioactivities such as anti-allergic activity. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is (i) one of the receptors for flavonoids, (ii) known as a xenobiotic detoxification-mediating transcription factor, and (iii) contributing to induce regulatory T cells (Tregs), which regulate the balance of the immune system thus controlling allergic reactions. Using potential anti-allergic dietary phytochemicals to prevent or ameliorate allergies is a novel therapuetic strategy. The main purpose of this study is to identify dietary factors with anti-allergic effect via screening potential AhR agonistic phytochemicals for Treg-inducible factors. We demonstrated previously that naringenin, a flavonoid derived from citrus fruits, enhanced the Treg induction. In the present study, we analyzed the function and characteristics of the Treg cells induced by naringenin.

【Methods】 For *in vitro* Treg induction, $CD4^+$T cells isolated from spleens of BALB/c mice were cultured with plate-bound anti-CD3 antibody and soluble anti-CD28 antibody in the presence or absence of TGF-β and each AhR-ligands. The induction of Treg was tested by flow cytometry and proliferation suppression test.

【Results and Discussion】 We have screened and investigated the effects of potential AhR agonistic dietary phytochemicals on the induction of Tregs activity. Among twenty five samples tested, only naringenin enhanced the immunosuppressive activities of Tregs in the presence of TGF-β *in vitro*. Interestingly, naringenin specifically induced functional Tregs even in the absence of TGF-β, indicating that a TGF-β-independent signaling pathway may involve in the induction of Tregs mediated by naringenin. Naringenin up-regulated $Foxp3^+$ and TGF-β^+ cell populations dose-dependently and increased IL-10 secretion at low concentrations (6.25–12.5 μM). Moreover, we found that anti-IL-10 and anti-TGF-β reduced the suppressive function of Treg cells induced by naringenin at low and high (25–50 μM) concentrations, respectively. We further determined that the suppressive effect of T cells induced by naringenin at high concentrations was mediated by membrane-bound TGF-β in a cell-cell contact mechanism. Taken together, it was suggested that naringenin induced IL-10 producing Tr1-like cells and $Foxp3^+$ Treg cells depending on the dose. These results would provide us a new approach for developing anti-allergy food via the potential immunomodulatory activity of naringenin.

Regulatory T cell, naringenin, aryl hydrocarbon receptor

講演番号：3J11p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ J校舎11会場

発酵食品微生物由来環状ジペプチド類と関連化合物の抗酸化活性評価

Assessment of antioxidant activity of cyclic dipeptides from fermented food microorganisms and their related compounds

○高津 綾香、福田優、張曼、仁戸田照彦、神崎浩（岡山大院・自然科学）
○Ayaka Takatsu, Yu Fukuda, Man Chao, Teruhiko Nitoda, Hiroshi Kanzaki (Okayama Univ.,GSNST)

【目的】我々はこれまでに様々な環状ジペプチド類 (CDPs) への二重結合の導入反応を触媒する酵素cyclo(Leu-Phe) oxidaseを見出し,その幅広い基質特異性を利用したCDPsの検出法を確立してきた。本手法を用いることにより，発酵食品の生産に関与する微生物がCDPsを生産することを確認した。一方，マルトモ(株)は鰹節生産糸状菌が生産するneoechinulin A (cyclo(Ala-isoprenylΔTrp), Δ: 脱水素) が，ferric thiocyanate法，thiobarbituric acid法において抗酸化活性を示すことを報告している。そこで，発酵食品の生産に関与する微生物由来のCDPsおよびそれらの関連化合物の抗酸化活性を調べることにした。また, 抗酸化活性測定法にはET (電子供与) 法とHAT (水素原子供与) 法とがあり，測定法が異なると同じ化合物でも活性の程度が異なるということが知られているため，今回のCDPsの抗酸化活性評価は両測定法により評価した。【方法】実験にはCDPsとして，微生物培養抽出物から得たものと酵素変換により調製したもの，市販品を用いた。抗酸化活性測定はET法であるDPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 法並びにHAT法であるORAC (Oxygen radical absorbance capacity) 法を用い，ビタミンE誘導体であるTroloxと比較し，Trolox換算値 mol-TE/molを活性の指標とした。【結果】DPPH法ではCDPsの活性はほとんど見られなかったが，その一方で食品の抗酸化能の評価に用いられているORAC法により評価したところ，CFL oxidaseを利用した検出法で乳酸菌培養液中に見出されたcyclo(Pro-Tyr) が2.36 mol-TE/molというTrolox以上の活性を示した。さらに上記のneoechinulin Aも抗酸化活性を示す事実から，発酵食品微生物が抗酸化能の高いCDPsを生産することが明らかとなり，それが発酵食品の機能性の一端を担っている可能性が示唆された。一方，同じ乳酸菌培養液中に検出されたcyclo(Phe-Pro) はORAC法でも活性を示さなかった。これらの結果から，CDPsを構成するアミノ酸残基においてフェノール性水酸基を有するTyr残基が,高い活性発現に関与している可能性が考えられたため，Tyrを有するcyclo(Trp-Tyr), cyclo(Leu-Tyr) についても評価したところ，Troloxと同程度もしくはそれ以上の活性を示した。このことから, アミノ酸残基に含まれるフェノール性水酸基がCDPsの抗酸化活性発現に重要であることが示唆された。また，neoechinulin Aは上記の方法に加えてORAC法でも3.29 mol-TE/molの活性を示した。さらに，アミノ酸側鎖のαβ位に二重結合を持ちneoechinulin Aと同じようにイソプレニル基によって修飾をうけたCDPsであるneoechinulin B (cyclo(ΔAla-isoprenylΔTrp))とaurantiamine (cyclo(isoprenylΔHis-Val) はそれぞれ2.70, 2.17 mol-TE/molの活性を示した。加えて，活性を示さなかったcyclo(Phe-Pro) の両側脱水素体であるcyclo(ΔPhe-ΔPro) も0.598 mol-TE/molの活性を示した。以上のことから，修飾型CDPsにおいては，アミノ酸残基への二重結合やイソプレニル基による修飾も抗酸化活性発現に関与している可能性が示唆された。

diketopiperazines, bioconversion, ORAC

講演番号:3J11p18
講演日時、会場:3月24日17:26～ J校舎11会場

酵素分解牡蠣ペプチドにおける抗酸化能評価

Evaluation of antioxidative capacity of oyster extract peptide

○飯田 ちなつ[1]、安達 秀子[1]、松本 聡[1]、田丸 靜香[2]、田中 一成[3]
（[1]常盤薬品工業㈱・薬理研究、[2]長崎県大・シーボルト校・栄養健康、[3]長崎県大・院・人間健康科学）
○Chinatsu Iida[1], Hideko Adachi[1], Satoshi Matsumoto[1], Shizuka Tamaru[2], Kazunari Tanaka[3]
(Tokiwayakuhinkougyou[1], Nagasakikenritsudai[2,3])

【目的】我々はこれまでに、酵素分解牡蠣ペプチド(Oyster Extract Peptide:OEP)が肝機能改善効果や脂質代謝改善効果を有することを明らかにしてきた。OEP は、その製法（抽出や分解酵素の種類など）によって分子量分布が変化することが分かっており、たとえば酵素分解で得られた分画には、通常の熱水抽出で得られた分画に比べて低分子（分子量 500～3000）のペプチドが多く存在する。本研究では、それぞれの製法の違いによる OEP の抗酸化能の分析および肝障害抑制作用との関連性について検討した。
【方法】試料として、広島県産生牡蠣を熱水抽出して得られた煮汁（以下、OE）と、これをさらに酵素分解して得られたペプチド（酵素分解条件の異なる 2 種：以下、OEPTypeA と OEPTypeB）を用いて、各試料溶液における抗酸化マーカーを測定した。動物実験では、７週齢の Wistar 系雄ラットを陰性対照群、陽性対照群、LPS／GalN＋OE 群、LPS／GalN＋OEPTypeA 群と LPS／GalN＋OEPTypeB 群の 5 群に分けた。各試料投与後に肝障害誘発剤を投与して 24 時間後の血清中 AST・ALT などの肝機能マーカーを測定し、試料溶液の抗酸化能との相関性について統計学的解析を行った。
【結果】DPPHラジカル消去活性は、OEと比較してOEPTypeAとOEPTypeBで有意に高い値を示した。血清中AST・ALTは、OEPTypeB群において陽性対照群と比べて有意に抑制されていた。以上の結果より、酵素分解によって得られたOEPは抗酸化能が亢進して肝障害を抑制することが示唆され、低分子分画において抗酸化ペプチドが存在する可能性が示された。

oyster extract peptide, antioxidant, DPPH radical scavenging activity

講演番号：3J11p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ J校舎11会場

各種抗酸化物のトコフェロール類に対する併用効果の解析

Analysis of combination effect between tocopherols and other antioxidants.

○山元 涼子, 石川 洋哉, 松本 奈実子, 受田 浩之[1], 山崎 壮[2], 松井 利郎[3] (福岡女子大・国際文理, 高知大・農[1], 国立衛研[2], 九大院・農[3])

○Yamamoto Ryoko, Ishikawa Hiroya, Matsumoto Namiko, Ukeda Hiroyuki[1],Yamazaki Takeshi[2], Matsui Toshiro[3], (Fukuoka Women's Univ., Kochidai Univ.[1], NIHS[2], Kyusyu Univ.[3])

【目的】

酸化防止剤として食品への用途が認められている抗酸化成分を併用する場合，成分間での相互作用を考慮する必要がある。すなわち，抗酸化成分の混合系では互いが相乗あるいは相殺的に作用する可能性があるため，その相互作用解析・評価が重要となる。本研究では，薬剤の併用効果解析法である Median effect analysis を用いて，代表的な酸化防止剤であるトコフェロール類に対する各種抗酸化成分の併用効果解析を試みた。

【方法】

トコフェロール類 4 種(α-, β-, γ-, δ-)と抗酸化成分 20 種を試験物質として用いた。活性測定には DPPH ラジカル消去活性測定法を用いた。まず，2 種類の抗酸化成分を単独で測定した後，各々を IC_{50} の濃度比で混合し，再度活性を測定した。得られた結果を基に Median effect plot を行い, 各直線の傾き m 値より各濃度レベルにおける combination index (CI 値)を算出し併用効果の判定をおこなった（CI<1；相乗効果、CI=1；相加効果、CI>1；相殺効果）。

【結果】

Median effect analysis による解析の結果，α-トコフェロールおよびγ-トコフェロールにおいて多くの抗酸化成分と相乗効果が確認された(α-トコフェロール；11 種，γ-トコフェロール；13 種)。また，トコフェロール類と抗酸化物の一部の組み合わせでは濃度範囲によって効果が異なることが判明した。すなわち低濃度域では相加効果であるが，高濃度域になるにつれて相乗効果を示す組合せが存在することが明らかとなった。さらに，4 種のトコフェロールを用いて，カテキン類との併用を検討した結果，γ-トコフェロールは今回使用した 5 種のカテキン類(カテキン水和物，エピカテキン(EC)，エピガロカテキン(EGC)，エピカテキンガレート(ECg)，エピガロカテキンガレート(EGCg))すべてと相乗効果を示した。一方，他のトコフェロール類では一部のカテキン類にしか相乗効果を示さず，その効果もトコフェロール類により様々であったことから，相乗効果の発現にはトコフェロール類の構造も大きく関与することが示唆された。

Antioxidant, Combination effect, Median effect analysis

講演番号：3J11p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ J校舎11会場

β-カロテンは廃用性筋萎縮モデルマウスの筋萎縮関連遺伝子発現を抑制する

Beta-carotene suppresses expression of muscle atrophy-related genes in muscle atrophy mice

○假家 義裕、小川 真弘、原田 直樹、山地 亮一、細谷 圭助[1]、中野 長久[2]、乾 博（大阪府大院・生命環境、[1]成美短大、[2]大阪女子短大）
○Yoshihiro Kariya, Masahiro Ogawa, Naoki Harada, Ryoichi Yamaji, Keisuke Hosotani[1], Yoshihisa Nakano, Hiroshi Inui (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ., Osaka Pref. Univ, [1]Seibi Junior College, [2]Osaka Women's Junior College)

【目的】運動不足や寝たきりなどにより引き起こされる筋重量と筋機能の低下（廃用性筋萎縮）は、物理的機能の低下に限らず、代謝調節機能の低下にもつながる。よって、廃用性筋萎縮の予防、あるいはその進行の遅延はQOLの維持に重要である。廃用性筋萎縮の原因の一つとして、酸化ストレスが報告されている。過剰な酸化ストレスに曝された筋線維では、筋萎縮関連遺伝子とよばれる筋特異的ユビキチンリガーゼ（Atrogin-1、MuRF1）の発現が亢進し、ユビキチン-プロテアソーム系による筋タンパク質の分解が亢進する。その結果、筋線維は萎縮する。本研究では、酸化ストレスに暴露したマウス筋芽細胞株C2C12細胞と酸化ストレスを引き起こす廃用性筋萎縮モデルマウスにおいて、抗酸化作用を持つβ-カロテンが筋萎縮抑制効果を示すかを検討した。
【方法】β-カロテンの酸化ストレスによる筋萎縮に及ぼす効果を評価するために、*in vitro*試験ではβ-カロテン存在下で前培養したC2C12細胞を過酸化水素に暴露し、一方、*in vivo*試験ではβ-カロテンを経口投与したddY系雄性マウス（8週齢）の後右肢に酸化ストレスを引き起こす坐骨神経切除を行って廃用性筋萎縮を誘発させた。神経切除を行わなかった後左肢をSham肢とし、坐骨神経切除3日目、7日目での右肢と左肢の筋重量比を筋萎縮の指標とした。
【結果】*in vitro*試験では、C2C12細胞での過酸化水素による筋タンパク質（MHC、Tropomyosin）の分解亢進とユビキチン化タンパク質レベルの上昇が、β-カロテンによって抑制された。過酸化水素は筋タンパク質の主要な分解経路であるユビキチン-プロテアソーム系を構成する筋萎縮関連遺伝子（Atrogin-1、MuRF1）だけでなく、ユビキチンの再利用に関わる脱ユビキチン化酵素（USP14、 USP19）の発現も亢進したが、β-カロテンはこれらの遺伝子発現の亢進を抑制した。また過酸化水素は転写因子として筋萎縮関連遺伝子の発現を亢進するFoxo3aの細胞質から核内への移行も促進したが、β-カロテンはこの核内移行を阻害した。一方*in vivo*試験では、神経切除3日目のヒラメ筋（遅筋）において、β-カロテンは筋重量比の低下を抑制した。さらに神経切除によるユビキチン化タンパク質レベルの上昇、筋萎縮関連遺伝子および脱ユビチキン化酵素の遺伝子発現の亢進もβ-カロテンは抑制した。しかし神経切除7日目ではβ-カロテンによる筋重量比低下の抑制は観察されなかった。またヒフク筋（速筋）では神経切除3日目、7日目ともにβ-カロテンの有効性は認められなかった。これらの結果より、β-カロテンは酸化ストレスによるユビキチン-プロテアソーム系の亢進を阻害し、筋萎縮の進行を抑制すると推測される。また神経切除によるヒラメ筋の萎縮の初期の進行の抑制にβ-カロテンは有効であることが判明した。

Beta-carotene, Muscle atrophy, Oxidative stress

講演番号：3J12a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ J校舎12会場

消化管を介したファイトケミカルの抗酸化・抗炎症作用の解明

Elucidation of the antioxidative and anti-inflammatory mechanism of phytochemicals via the gastrointestinal tract.

○田中 遼平、入江 一浩、村上 明（京大院農・食品生物）
○Ryohei Tanaka, Kazuhiro Irie, Akira Murakami (Food Science and Biotechnology, Kyoto University)

【目的】ファイトケミカルは植物により産生される二次代謝産物を指し、抗酸化および抗炎症作用を示す化合物が多く知られている。これらは培養細胞系では μM オーダーで様々な活性を発現するが、実験動物やヒトにおける血中濃度は nM オーダーであると考えられ、吸収効率は決して高くない。このことから、ファイトケミカルの機能性を生体内で媒介する内因性物質の存在を想定した。Heme oxygenase-1(HO-1)は、遊離のヘムを基質として、一酸化炭素(CO)、ビリベルジンおよび Fe^{2+}を産生する誘導型酵素である。これまでに、curcumin(CUR)を含むファイトケミカルが、培養細胞において HO-1 の発現を誘導する例が多数報告されている [1)]。また、興味深いことに近年、適度な濃度の CO を実験動物に投与すると、抗酸化および抗炎症作用を示すことも明らかにされている [2)]。そこで本研究では、CO がファイトケミカルの機能性メディエーターである可能性を検討した。

【方法および結果】まず始めに、hepa1c1c7(マウス肝臓がん細胞)を用いて CO の抗酸化作用を評価した。CO 供与体である CORM-2 [3)]を作用させ、抗酸化酵素の mRNA 発現量を qRT-PCR により解析した結果、SOD および catalase の発現量が有意に増加した。次に、抗炎症作用の評価系として RAW264.7(マウスマクロファージ)を用い、LPS 刺激による NO 産生に対する抑制効果を検討した。その結果、CORM-2 の添加濃度依存的に NO 産生が抑制された。その一方で、消化管上皮細胞のモデルである分化 Caco-2(ヒト結腸がん細胞)に数種類のファイトケミカルを作用させ、HO-1 の mRNA 発現量を解析した。その結果、CUR は高い HO-1 発現誘導能を有することが明らかになった。現在、様々な条件で CUR をマウスに投与し、消化管における HO-1 の発現や血中の CO 濃度の変動について検討を行っている。

【結語】現在のところ、ファイトケミカルを摂取することで消化管における HO-1 の発現が増加し、CO が生成するという報告はない。しかし今回の検討結果から、ファイトケミカルによって刺激された消化管から CO が発生し、血中に伝播して他の細胞や組織で機能性を発現する可能性が拓かれたと考えている。

1) McNally SJ, et al. *Transplantation*. 81:623-6 (2006)
2) Liu SH, et al. *Cell Stress Chaperones*. 15:717-27 (2010)
3) Sun B, et al. *Int J Biol Sci*. 4:176-83 (2008)

phytochemical, carbon monoxide, gastrointestinal tract

講演番号：3J12a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ J校舎12会場

ルテオリンが HepG2 細胞における薬物代謝系第 I、II 相酵素の発現に及ぼす影響

Effect of luteolin on expression of phase I and II drug-metabolizing enzymes in the HepG2 cells

○姜　嵩岩、芦田　均（神戸大院・農）
○SongYan Jiang, Hitoshi Ashida (Graduate School of Agriculture Science, Koube University)

【目的】Aryl hydrocarbon receptor (AhR)はダイオキシン類などのリガンドと結合することで活性化して、薬物代謝酵素などの発現を誘導する転写因子である。近年、薬物代謝第 II 相酵素の遺伝子の発現を担う nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)と AhR とがクロストークして薬物代謝系酵素の発現を制御する可能性が報告されている。我々はこれまでに、フラボンのひとつであるルテオリンが AhR の活性化を抑制することを見出した[1, 2]。本研究では、AhR と Nrf2 を介した薬物代謝酵素の発現におけるルテオリンの影響について検討した。
【方法】ヒト肝癌由来 HepG2 細胞に AhR のリガンドである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)、あるいは 転写因子 Nrf2 の活性化剤である *tert*-butylhydroquinone (tBHQ)を作用させ、薬物代謝系第 I 相酵(CYP1A1)と第 II 相酵素(NQO1、GST α、GST μ、GST π)の発現をウェスタンブロットにより検討した。次に、ルテオリンをこれらの細胞に 10 分間作用させた後に、1 nM TCDD あるいは 30 μM tBHQ を 24 時間作用させ、ルテオリンが薬物代謝系第 I、II 相酵素の発現に及ぼす影響を検討した。
【結果】薬物代謝第 I 相酵素 CYP1A1 の発現は、HepG2 細胞において TCDD により顕著に誘導された。薬物代謝第 II 相酵素 GST α、μ ならびに π の発現は、TCDD により弱く tBHQ により強く誘導された。これらのことから、CYP1A1 と GSTs はそれぞれ AhR と Nrf2 により発現が制御されていることが確認された。一方、薬物代謝第 II 相酵素 NADP(H):quinone oxidoreductase 1 (NQO1)の発現は、HepG2 細胞においては TCDD と tBHQ のどちらによっても顕著に誘導された。このことから、NQO1 は AhR と Nrf2 の 2 つの転写因子による発現制御を受けている可能性が考えられた。ルテオリンは TCDD によって誘導された CYP1A1 の発現を HepG2 細胞において濃度依存的に抑制した。また、ルテオリンは tBHQ によって誘導された GST α、μ ならびに π の発現を濃度依存的に抑制した。ルテオリンは TCDD と tBHQ のどちらによっても誘導された NQO1 の発現を抑制した。これらのことにより、ルテオリンがは AhR と Nrf2 を介した薬物代謝系第 I、II 相酵素の発現を負に制御することが分かった。さらに、ルテオリンは TCDD および tBHQ によってそれぞれ誘導される AhR と Nrf2 の核内移行を抑制した。また、NQO1 は AhR と Nrf2 の 2 つ転写因子による発現制御を受けていることから、今後は AhR と Nrf2 の相互作用などについて検討する予定である。

1) Ashida, H., *et al., FEBS Lett.,* 476, 213-217 (2000).
2) Fukuda, I., *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 359, 822-827(2007).

Aryl hydrocarbon receptor, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2.

講演番号：3J12a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ J校舎12会場

β－クリプトキサンチンが非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスの遺伝子発現に及ぼす効果

β-Cryptoxanthin ameliorates diet-induced nonalcoholic steatohepatitis: the anti-inflammatory effect on hepatic gene expression

○小堀 真珠子、渡邉菜摘、杉浦実[1]、太田嗣人[2]（食総研、[1]果樹研、[2]金沢大）
○Masuko Kobori, Natsumi Watanabe, Minoru Sugiura, Tsuguhito Ota (NARO FRI, [1]NARO NIFTS, [2]Kanazawa Univ)

【目的】栄養疫学調査から、ウンシュウミカンに特徴的な成分であるβ-クリプトキサンチンの血中濃度と肝疾患、メタボリックシンドローム等の生活習慣病の発症リスクには負の相関があることが知られている[1,2]。本研究では、メタボリックシンドロームに高頻度に合併する肝疾患である非アルコール性脂肪肝炎（以下、脂肪肝炎）のモデルマウスを作成し、β-クリプトキサンチンによる進展予防効果の検証とその作用機序解明を目的に肝臓の発現遺伝子解析を行った。
【方法】C57/BL6Jマウスに、普通食、高コレステロール高脂肪食及び30ppmβ-クリプトキサンチン添加高コレステロール高脂肪食を12週間摂取させた後、各群5匹の肝臓の遺伝子発現をDNAマイクロアレイを用いて解析した。
【結果】高コレステロール高脂肪食を12週間摂取させることにより、マウス肝臓の脂肪化、炎症及び線維化が生じ、食餌性に脂肪肝炎が誘導された。β-クリプトキサンチンの摂取により、病理組織学的に脂肪化・炎症・線維化が改善し、食餌性脂肪肝炎モデルの進展が抑制された。
肝臓の遺伝子発現解析の結果、食餌性脂肪肝炎群の肝臓では普通食群（正常肝）と比べて、炎症反応及び脂質代謝に関わる多くの遺伝子の発現量が変動した。またIngenuityパスウェイ解析により、脂肪肝炎群の肝臓では、免疫・炎症反応に関わるT細胞やマクロファージ等のシグナル伝達経路に含まれる遺伝子発現が誘導されること、及び脂肪酸代謝等に関わる遺伝子発現が抑制されること等が明らかになった。一方、β-クリプトキサンチンは食餌性脂肪肝炎群で有意に誘導または抑制された1589遺伝子発現のうち、687遺伝子を正常肝の発現レベルに近づけた。β-クリプトキサンチンは脂肪肝炎で誘導されるT細胞やマクロファージのシグナル伝達経路等、免疫及び炎症に関わる遺伝子発現を減弱したが、コレステロール・脂肪酸代謝抑制等の脂肪蓄積に関わる遺伝子発現変化への影響は乏しかった。【結論】発現遺伝子解析の結果から、β-クリプトキサンチンは主に炎症・免疫応答を制御し、食餌性脂肪肝炎の進展を抑止する。

1) Sugirua et al. Diabetes Res. Clin. Pract. 71, 82 (2006).
2) Sugiura et al. Br. J. Nutri. 2008 100, 1297 (2008).

β-cryptoxanthin, non-alcoholic steatohepatitis, inflammation

講演番号：3J12a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ J校舎12会場

タイトル　有機ゲルマニウムとビートファイバーの同時摂取による肝臓脂肪低下作用
Title　Simultaneous intake of organic germanium and sugar beet fiber reduces hepatic lipid.

齋藤三季、○中村宜司（浅井ゲルマニウム研）
Miki Saito, ○Takashi Nakamura (Asai Germanium Research Institute)

【目的】有機ゲルマニウム化合物poly-*trans*-[(2-carboxyethyl)germasesquioxane], Ge-132は安全性の高い水溶性の物質で、免疫賦活作用をはじめとする種々の生理作用を持つことが知られている。我々はGe-132を経口摂取した際に、胆汁成分分泌促進作用[1]と肝臓でのポルフィリン合成促進作用[2]のあることを明らかにしてきた。この胆汁酸の排泄促進に関しては、腸肝循環があるために胆汁色素の排泄より割合が低い事が示されている。一方、甜菜由来の難消化性食物繊維ビートファイバーは、脂質や胆汁成分を吸着することで排出促進作用を持つと考えられ、血中脂質低下作用等が報告されている。Ge-132により分泌促進された胆汁酸がビートファイバーにより脂肪と共に吸着されて排出されることで、体内の脂質の低下作用が期待された。そこで、本研究ではGe-132とビートファイバーとの同時摂取による脂質低下作用を評価することを目的として、トリグリセロール（TG）およびコレステロールを指標に評価した。
【方法】雄性SD系ラットに、AIN76基本飼料への混餌によりGe-132およびビートファイバーを2週間自由摂取させた。試験期間は基本飼料を①対照（CONT）群に与え、②0.05%Ge-132（GE）群、③5%ビートファイバー（BF）群、④0.05%Ge-132＆5%ビートファイバー（GEBF）群および⑤10%ビートファイバー（HBF）群の計5群を設定して投与を行った。試験期間中、糞便を採取し、最終日に解剖して血液および肝臓を採取した。糞便，血中および肝臓の脂質をTLCおよび比色法で分析した。
【結果】ビートファイバー添加飼料を摂取したラットの糞便は、非添加群と比較して脂質の含量が高く、排出が促進される傾向が認められた。また、ビートファイバー投与ラットの糞便からはオレアノール酸が中性脂質画分に検出された。ビートファイバー10%（HBF）添加群では、肝臓のTG量が有意に低下した。一方、ビートファイバー5%（BF）添加群では低下傾向はあるものの有意差は認められなかった。また、Ge-132単独（GE）添加群では肝臓のTG含量は対照群と変化がなく、Ge-132とビートファイバー5%の同時添加（GEBF）群ではHBFと同レベルの有意な低下作用が認められた。Ge-132とビートファイバーの同時摂取が脂肪肝などの防止に役立つことが期待される。

1) Nakamura, T. et al., *Journal of Health Science*, **56**, 72-80 (2010)
2) Nakamura, T. et al., *European Journal of Pharmacology*, **653**, 75-81 (2011)

organic germanium, sugar beet fiber, hepatic lipid

講演番号：3J12a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ J校舎12会場

酵素および機械剪断処理野菜摂取によるヒトでのＣａ吸収促進効果

Effect of the processed vegetables on calcium absorption in humans

○小林 明美、園田 拓三[1]、角尾 進悟、中村 純二（花王・生科研、[1]花王・加工プロセス研）

○Akemi Kobayashi, Takumi Sonoda[1] , Shingo Kakuo, Junji Nakamura(Kao Corporation・Biological Science, [1]Kao Corporation・Processing Development)

【目的】野菜には比較的多くのカルシウムが含まれているが、食物繊維等の影響により体内への吸収効率は必ずしも高くないと云われている。野菜をセルラーゼおよびペクチナーゼで処理するとともに機械撹拌を行うことで食物繊維が剪断され粘性が低下する。これまで我々はラットにおいて酵素および機械剪断処理した小松菜の単回摂取によりカルシウム吸収が有意に向上すること、及び反復摂取による有意な骨密度改善作用を報告している。本研究では酵素および機械剪断処理した小松菜のヒトにおけるカルシウム吸収性を評価した。

【方法】20～40歳代の健常成人男性30名に対して、小松菜、酵素および機械剪断処理した小松菜または牛乳を単回摂取させ、摂取後8時間まで経時的に採取した尿中のカルシウム量を指標として体内へのカルシウムの吸収性を評価した。評価にあたり、各サンプルに含まれるカルシウム量は300mgに揃え、クロスオーバー試験をおこなった。

【結果】小松菜と牛乳のカルシウム吸収性には差は認められなかったが、酵素および機械剪断処理した小松菜は牛乳に比べて統計学的に有意な吸収向上が示された。また30名の被験者を牛乳摂取時のカルシウム吸収性が高い15名と低い15名に分けて比較をした場合、カルシウム吸収性の高いグループでは各群間で差が見られなかったのに対して、低いグループでは、小松菜や牛乳の摂取時に比べて酵素および機械剪断処理した小松菜摂取時においてカルシウム吸収性が有意に向上することが示された。以上の結果から酵素および機械剪断処理した小松菜は牛乳に比べてもカルシウム吸収性に優れること、及びその効果はカルシウム吸収性の低い群でより顕著な可能性があることが示された。

Calcium, Vegetable, Human,

講演番号：3J12a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ J校舎12会場

Lactobacillus GG発酵乳による腸管上皮のホメオスタシス調節機能に関する研究

Regulation of intestinal epithelial homeostasis by *Lactobacillus* GG-containing fermented milk

○依田 一豊、何 方、宮澤 賢司、川瀬 学、久保田 晃、平松 優、Fang Yan[1]（タカナシ乳業（株）・商品研究所、[1]Vanderbilt大・医）

○Kazutoyo Yoda, Fang He, Kenji Miyazawa, Manabu Kawase, Akira Kubota, Masaru Hiramatsu, Fang Yan[1] (Takanashi Milk Products Co., Ltd., [1]Vanderbilt University School of Medicine)

【目的】DSS誘導大腸炎マウスへ*Lactobacillus* GGを含む発酵乳（LGG菌発酵乳）を経口投与すると、腸管炎症が抑制されることが報告されている。また、LGG菌発酵乳の遠心上清をYoung adult mouse colon（YAMC）細胞に添加すると、濃度依存的にEGF受容体およびAktを活性化したことから、LGG菌発酵乳がEGF受容体を介して腸管上皮に有益な影響を与えることが推測された。

本研究では、LGG菌発酵乳による腸管炎症の抑制メカニズムをさらに解明することを目的として、LGG菌発酵乳の腸管バリア機能の保護作用および腸管上皮細胞のアポトーシス抑制作用について調査した。

【方法】LGG菌発酵乳は遠心分離後、上清を回収しYAMC細胞に添加した。バリア機能の保護作用を観察するために、過酸化水素をYAMC細胞に添加してタイトジャンクションの破壊を誘導した。抗ZO-1抗体を用いて免疫染色を行い、ZO-1の局在を蛍光顕微鏡で観察した。一方、アポトーシス抑制効果を測定するため、YAMC細胞にTNFとシクロヘキサミドを添加してアポトーシスを誘導したのち、フローサイトメーターでアポトーシスを起こした細胞数を測定した。また、LGG菌発酵乳がEGF受容体を介して腸管上皮の調節に関与していること確認するため、EGF受容体キナーゼ阻害剤であるAG1478を加えて、上記と同様の操作を行った。

【結果】過酸化水素水のみを加えたYAMC細胞では、ZO-1が細胞質へ移行し、タイトジャンクションの破壊が観察された。一方、LGG菌発酵乳を添加したYAMC細胞は、ZO-1がタイトジャンクション周辺に多く局在しており、過酸化水素水によるタイトジャンクションの破壊が抑制された。また、TNFとシクロヘキサミドの添加は、YAMC細胞のアポトーシスを誘導したが、LGG菌発酵乳を添加することによってアポトーシスが抑制された。しかし、これらの抑制効果はEGF受容体キナーゼ阻害剤であるAG1478を添加すると失われた。これらの結果より、LGG菌発酵乳はEGF受容体を介して腸管上皮の恒常性を調節することが示唆された。

Lactobacillus GG, tight-junction, apoptosis

講演番号：3J12a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ J校舎12会場

メタボリックシンドローム改善作用をもつ乳酸菌*Lactobacillus amylovorus* CP1563株の選抜

Screening of *Lactobacillus amylovorus* strain CP1563 effective against the metabolic syndrome

仲村 太志、○石田 優、菅原 智詞、芦田 延久、澤田 大輔、多田 裕紀子[1]、高橋 信之[1]、河田 照雄[1]、藤原 茂（カルピス(株)・発酵応用研究所、[1]京大院農・食品生物科学）

Futoshi Nakamura, ○Yu Ishida, Tomonori Sugawara, Nobuhisa Ashida, Daisuke Sawada, Yukiko Tada[1], Nobuyuki Takahashi[1], Teruo Kawada[1], Shigeru Fujiwara (Microbiology & Fermentaion Laboratory, Calpis Co., Ltd., [1]Division of Food Science and Biotechnology, Kyoto University)

【目的】

近年メタボリックシンドロームの該当者および予備軍が増加し、動脈硬化のリスク因子として肥満、脂質異常症が問題となっている。我々は、脂肪のβ酸化（脂肪燃焼）を促進する核内受容体PPARαに着目し、メタボリックシンドローム、特に脂質代謝を改善する乳酸菌を選抜することを目的とした。

【方法と結果】

（実験1）ヒトPPARリガンド結合ドメインを用いた高感度リガンドアッセイ系を用いて、各種乳酸菌の有機溶媒抽出物のPPARα活性化能を指標にスクリーニングを行った。その結果、PPARα活性化能は菌株によって大きく異なっており、最も高いPPARα活性化能をもつ乳酸菌として、*Lactobacillus amylovorus* CP1563株を選抜した。

（実験2）CP1563株の経口投与による効果を検証するにあたり、CP1563株の菌体を破砕することで菌体成分を消化吸収しやすくしてマウスへ投与することとした。C57BL/6JマウスにCP1563株破砕菌体1%混餌高脂肪食をペアフィーディングにより6週間摂取させ、血中脂質マーカーへの影響を評価した結果、対照群と比較して、HDLコレステロールが有意に上昇し、動脈硬化指数AIが有意に改善した。

（実験3）用量依存性を確認するため、C57BL/6JマウスにCP1563株破砕菌体を0、0.25%、0.5%、1%混餌高脂肪食をペアフィーディングにより6週間摂取させた。その結果、HDLコレステロールおよび動脈硬化指数AIは用量依存的に改善した。

【考察】

PPARα活性化能の高い*L. amylovorus* CP1563株は、HDLコレステロールおよび動脈硬化指数AIを改善する作用を有し、メタボリックシンドロームを予防・改善する作用が期待できる。

metabolic syndrome, PPARα, lactic acid bacteria

講演番号：3J12a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ J校舎12会場

乳酸菌*Lactobacillus amylovorus* CP1563株の脂質代謝改善作用

Effect of *Lactobacillus amylovorus* strain CP1563 on lipid metabolism of mice

仲村 太志、石田 優、○菅原 智詞、澤田 大輔、多田 裕紀子[1]、高橋 信之[1]、河田 照雄[1]、藤原 茂（カルピス(株)・発酵応用研究所、[1]京大院農・食品生物科学）

Futoshi Nakamura, Yu Ishida, ○Tomonori Sugawara, Daisuke Sawada, Yukiko Tada[1], Nobuyuki Takahashi[1], Teruo Kawada[1], Shigeru Fujiwara (Microbiology & Fermentaion Laboratory, Calpis Co., Ltd., [1]Division of Food Science and Biotechnology, Kyoto University)

【目的】

我々は、脂肪のβ酸化（脂肪燃焼）を促進する核内受容体PPARαに着目し、脂質代謝を改善する作用が期待できる乳酸菌として*L. amylovorus* CP1563株を選抜し、高脂肪食マウスへの経口投与によりHDLコレステロールを改善することを確認してきた。このCP1563株が高脂肪食マウスの脂質代謝に与える影響についてさらに検証した。

【方法と結果】

（実験1）CP1563株の菌体破砕の有無が脂質代謝改善作用に与える影響を調べるため、C57BL/6JマウスにCP1563株破砕菌体もしくは非破砕菌体1%混餌高脂肪食をペアフィーディングにより6週間摂取させた。その結果、対照群と比較して破砕菌体投与群ではHDLコレステロールの有意増加と内臓脂肪量の有意低下が認められたが、非破砕菌体投与群ではいずれの効果もみられなかった。

（実験2）CP1563株の長期投与による効果を検証するため、C57BL/6JマウスにCP1563株破砕菌体1%混餌高脂肪食をペアフィーディングにより12週間摂取させた。その結果、対照群と比較して、HDLコレステロール、動脈硬化指数AIが有意に改善したのに加えて、LDLコレステロール、中性脂肪も有意に改善した。さらに、脂質代謝における善玉因子であるアディポネクチンの増加傾向もみられた。

【考察】

PPARα活性化能の高い*L. amylovorus* CP1563株の破砕菌体の経口投与により、脂質代謝を改善し、メタボリックシンドロームを有効に予防・改善する作用が期待できる。

lipid metabolism, PPARα, lactic acid bacteria

講演番号：3J12a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ J校舎12会場

発酵食品が腸内細菌の増殖に与える影響

Effect of fermented foods on the growth of intestinal bacteria

○佐藤 一昭、蟻川 幸彦[1]、松澤 恒友[2]、天野 良彦[2]（長野県食工協、[1]長野県工技セ、[2]信州大工・物質工）

○Kazuaki Sato, Yukihiko Arikawa[1], Tsunetomo Matsuzawa[2], Yoshihiko Amano[2] (Assn. Nagano Food Ind., [1]Nagano pref. industrial tech. center, [2]Fac. Eng., Shinshu Univ.)

【目的】腸内細菌叢はヒトの健康と密接に関連し、加齢に伴って急激に変化することが知られている。腸内細菌叢を改善する方法の１つとして、ヒトによる消化・吸収を受けずに腸内にまで届き、有用菌の増殖を促進し有害菌の増殖を抑制する食品成分（プレバイオティクス）の摂取がある。今回、食品を発酵させることによって腸内細菌の増殖に与える影響がどのように変化するのかを確認するために、腸内細菌の混合培養系を用いて生菌数の推移を調査した結果を報告する。
【方法】食品サンプルは消化酵素（α-アミラーゼ、ペプシン、パンクレアチン）で連続的に処理し、透析によって低分子量のものを除いた後に凍結乾燥し、他に炭素源を含まない混合培養用合成培地に添加した。この培地を用いて有用菌*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM1217、有害菌*Clostridium perfringens* JCM1290および日和見菌*Bacteroides fragilis* JCM11019を混合培養し、各菌株が特異的に増殖する選択培地を用いて生菌数を経時的に確認した。
【結果】コントロールとして、グルコース、フラクトオリゴ糖およびキシロオリゴ糖をそれぞれ添加した培地を用いて混合培養をおこなった。その結果、グルコースを炭素源として含む培地では、*B. longum* JCM1217および*B. fragilis* JCM11019の増殖はまったく確認されず、*C. perfringens* JCM1290のみが増殖していた。一方、フラクトオリゴ糖を添加した培地では培養後期に*B. longum* JCM1217の増殖が確認でき、キシロオリゴ糖を含む培地では培養初期から3菌株ともに増殖し特に有用菌である*B. longum* JCM1217が著しく増加していることが確認された。

市販されている商品として、発酵したフルーツ3種（イチゴ、ブルーベリー、リンゴ）および野菜1種（ニンジン）を原料とする4種のジャムそれぞれについて、未発酵の原料を用いたジャム4種それぞれと比較した。未発酵のイチゴ、ブルーベリー、ニンジンを原料とするジャムの人工消化物を添加した培地では日和見菌である*B. fragilis* JCM11019の増殖が見られたが、発酵した原料を用いたジャムの人工消化物を添加した培地では、4種いずれの培地においても*B. fragilis* JCM11019の増殖はほとんど確認されなかった。また、4種のサンプルのうち、発酵したフルーツを原料とする3種のジャムサンプルについては、いずれも未発酵のものと比較して有用菌である*B. longum* JCM1217の増殖が促進され有害菌である*C. perfringens* JCM1290の増殖が抑制された。

fermented foods, intestinal bacteria, mixed culture

講演番号：3J12a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ J校舎12会場

セサミンとエピセサミンの投与によるマウス肝臓の遺伝子発現変動の比較解析

Comparative analysis of hepatic gene expression fluctuations in mice treated with sesamin and episesamin

○姚　瑞卿[1]、安岡 顕人[2]、檜木 智裕[3]、北川 義徳[3]、柴田 浩志[3]、阿部 啓子[1,4]、三坂 巧[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]前工大・生物工、[3]サントリ・健康研、[4]KAST)
○Ruiqing Yao[1], Akihito Yasuoka[2], Tomohiro Rogi[3], Yoshinori Kitagawa[3], Shibata Koushi[3], Keiko Abe[1,4], Takumi Misaka[1]([1]The Univ. of Tokyo, [2]Maebashi Inst. of Tech., [3]Suntory Wellness Ltd., [3]KAST)

【目的】ゴマリグナンの一種であるセサミンは、アルコール代謝の促進、脂肪酸合成の抑制、脂肪酸分解の促進など、エネルギー代謝に関する広範な生理作用を示すことが知られている。ものの、セサミンをゴマ油から精製する過程においては、異性体のエピセサミンも生成される。従って、報告されてきたセサミンの生理作用は両者の作用が併合されたものであると考えられる。我々はマウスに純品のセサミンとエピセサミンを投与し、通常生体内におけるこの二つの成分の機能の相同点と相違点を検討することを目的とした。
【方法】C3H/HeNCrlCrlj系統6週齢オスにコーンオイル(コントロール, 3ml/kg)、セサミン(35.44mg/kg)、エピセサミン(35.44mg/kg)を一日一回3日間経口投与した。最後の投与の24時間後に解剖した。肝臓約50mgを1ml のRNAlater中に4℃保存した。マウス肝臓のtotal RNAはISOGENを用いて抽出し、RNeasy Mini Kitで精製し、DNA microarray解析を行った。qFARMS法で正規化した発現データについて、rank product法を用いてコントロールとセサミン、コントロールとエピセサミンの組み合わせで二群間比較を行った。得られた遺伝子群について、DAVIDを用いたGene annotation enrichment analysisを行った後、Benjamini(FDR補正したEASE score)＜0.05となるGOtermsを抽出した。抽出されたGOtermsについて、QuickGOを用いて階層化し、最下層のGOtermsに含まれる遺伝子を解析した。
【結果】二群比較の結果に基づき、①セサミンとエピセサミンで同様に変動した遺伝子(S=E遺伝子)、②セサミンのみで変動した遺伝子(S遺伝子)、③エピセサミンのみで変動した遺伝子(E遺伝子)を抽出した。①S=E遺伝子については、脂質合成に関わる遺伝子群の発現増加と発現低下、脂質代謝関連ビタミンの合成に関わる遺伝子群の発現低下などが見られた。②S遺伝子については、酸化還元に関わる遺伝子群の発現低下、脂質輸送に関わる遺伝子群の発現低下、糖新生に関わる遺伝子群の発現低下、コレステロール恒常性に関わる遺伝子群の発現低下、アルコール・コエンザイム・ステロイド・中性脂肪・ケトン体生合成に関与する遺伝子群の発現低下などが検出された。③E遺伝子については、酸化還元に関わる遺伝子群の発現増加、不飽和脂肪酸代謝に関わる遺伝子群の発現増加、P450異物代謝系酵素遺伝子群の発現増加、イソプレノイドとコレステロール合成に関わる遺伝子群の発現増加、アルコール代謝と脂質代謝に関わる遺伝子群の発現低下などが検出された。以上より、通常生体内におけるセサミン機能とエピセサミン機能の異同が明らかになった。

Sesamin, episesamin, DNA microarray

講演番号：3J12a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ J校舎12会場

HepG2細胞を用いた非アルコール性脂肪肝モデルに対するラクトフェリンの作用解析

The effects of bovine lactoferrin on the HepG2 NAFLD (Non-Alcoholic Fatty liver disease) model.

○森下 聡[1]、富田景子[2]、小野 知二[1,3]、村越 倫明[1,4]、大寺 基靖[1,3]、杉山 圭吉[1,5]、加藤 久典[2]、西野 輔翼[4,5] ([1]ライオン（株）、[2]東大・総括、[3]横浜市大、[4]京都府立医大、[5]立命館大)

○Satoru Morishita[1], Keiko Tomita[2], Tomoji Ono[1,3], Michiaki Murakoshi[1,4], Motoyasu Ohdera[1,3], Keikichi Sugiyama[1,5], Hisanori Kato[2], Hoyoku Nishino[4,5] ([1]Lion Corporation, [2]The University of Tokyo, [3]Yokohama City University, [4]Kyoto Prefectural University of Medicine, [5]Ritsumeikan University)

【目的】近年、重篤な肝機能障害を誘導する非アルコール性脂肪肝（NAFLD）が問題視されている。我々はこれまでに、ヒト臨床試験においてラクトフェリン腸溶錠(300mg/day)の8週間の摂取で内臓脂肪が有意に低減することを見出し、LFの脂質代謝改善作用を報告している。また、その作用機序解析において、LFが脂肪細胞の脂肪合成を抑制し、かつ脂肪分解を促進することを見出した。こうしたことから、LFが肝臓に対しても脂質代謝改善作用を示すことは十分に期待できる。そこで、本研究ではNAFLDに対するLFの作用可能性を明らかにするため、ヒト肝臓癌由来細胞であるHepG2細胞を用いたNAFLDモデルに対するLFの作用を検討した。
【方法】10%FBS含有DMEM培地にてHepG2細胞を培養し、6～7割コンフルエントの状態でFBS非含有培地に交換し、24時間スタベーションを行った。その後、遊離脂肪酸混合物（FFAs）を終濃度0.25 ～2 mMでHepG2細胞に添加し脂肪蓄積を20時間誘導した。本培養過程においてLF（1～300 ppm）を添加し、脂肪蓄積及び脂肪蓄積と共に誘導されるアポトーシス関連指標（LDH活性、Caspase3活性）に与える影響を解析した。
【結果】HepG2細胞に対するFFAsの添加（0.25～2 mM）によって、濃度依存的に脂肪蓄積が認められた。また、NAFLDの所見であるアポトーシスの関連指標を解析し、LDH活性、及びCaspase3活性がFFAs濃度依存的に誘導されることを確認した。本評価系において、LFの有効性を評価した結果、脂肪蓄積、LDH活性及びCaspase3活性の全ての指標において、LFは濃度依存的な抑制作用を示した。さらにLFのアポトーシス抑制機序を解析し、FFAs誘導性アポトーシスシグナルの上流に存在するJNKのリン酸化をLFが抑制することを見出した。以上の結果から、LFはFFAs誘導性の脂肪蓄積及びアポトーシスに対して抑制作用を示すことを明らかにした。

Lactoferrin, NAFLD, lipid metabolism

講演番号：3J12a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ J校舎12会場

シジミ抽出液由来オルニチン含有新規トリペプチド‘Acorbine’の肝保護効果

A hepatoprotection effect of a novel ornithine-containing tripeptide ‘Acorbine’ isolated from the extract of the brackish-water bivalve *Corbicula japonica*

○内沢 秀光、白川 和浩[1]、齋藤 ゆかり[2]、Chonnipa Nilubol[2]，玉井 美保[2]、田川 陽一[2]（青森県産業技術セ・工総研、[1]福島商店、[2]東工大院・生命理工）

○Hidemitsu Uchisawa, Kazuhiro Shirakawa[1], Yukari Saito[2], Chonnipa Nilubol[2], Miho Tamai[2], Yoh-ichi Tagawa[2] (Aomori Pref. Industrial Technol. Res. Center, [1]Fukushima Syoten, [2]Tokyo Institute of Technology)

【目的】シジミ熱水抽出液の肝機能改善効果に関する作用本体物質について、今回、慢性肝障害マウスモデル及びマウスES細胞由来肝組織を用いて検討した結果、シジミ抽出液から見出されたオルニチン含有新規トリペプチド（β-Ala-Orn-Orn、‘Acorbine’と命名）に肝保護効果があることが分かったので報告する。

【方法】動物入荷後より対照群および試験群ともにアルコールを含有しない通常飼料を3日間与えて飼育した後、アルコール入り飼料に切り替えて7日間飼育した。その後、アルコール入り飼料を継続しながら、対照群には生理食塩水を、試験群1には10%シジミ抽出液、試験群2には10μM Acorbineをそれぞれ1日1回200μlずつゾンデを用いて経口投与した。アルコールを含有しない通常飼料からアルコール入り飼料に切り替えた7日後および、その後シジミ抽出液あるいはAcorbineを投与した4日後および7日後に採血を行い、肝障害マーカーである血漿中のトランスアミナーゼ活性（AST、ALT）を測定した。肝組織標本の作製は常法に従い、切片をヘマトキシリン・エオジン染色し観察した。また、独自に開発したES細胞からの肝組織（IVL^{mES}:*in vitro* Liver derived from mouse ES cells）を用いて、アルコール添加により細胞障害を誘発し、その際にシジミ抽出液あるいはAcorbineを添加しその効果を検討した。

【結果】動物実験において、アルコール入り飼料を 7 日間摂取することにより、顕著な肝逸脱酵素の上昇が確認されたが、シジミ抽出液および Acorbine を投与した区分 4 日後および 7 日後において、生理食塩水を投与した対照群と比較し有意に肝逸脱酵素の低下が認められたが、シジミ抽出液よりも Acorbine に高い効果が認められた。肝臓組織標本観察では、生理食塩水を投与した対照群では、脂肪滴が観察され脂肪肝になっていることが分かったが、Acorbine 投与群では脂肪滴は認められず、Acorbine の肝臓保護作用が確認された。なお、シジミ抽出液投与群においても脂肪滴は観察されなかった。IVL^{mES} を用いた実験において、細胞内ミトコンドリア活性による細胞活性評価では、培地に 3%アルコールを添加することにより細胞活性が低下したが、シジミ抽出液を添加することにより細胞活性の低下が抑えられており、Acorbine 添加区分においてはほとんど細胞活性の低下は認められなかった。スポットケムを用いた細胞内 LDH の血中への放出量による細胞障害性評価、および尿素合成能による肝機能評価においても同様の結果が得られ、Acorbine の肝臓保護効果が確認された。

Keyword1 hepatoprotection effect, Keyword2 Acorbine, Keyword3 peptide

講演番号：3J12a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ J校舎12会場

食肉成分による腸管細胞における神経栄養因子発現制御

Meat-derived factors regulate the expression of neurotrophic factors in intestinal epithelial cells

○藤井 薫、門岡 桂史[1]、松本 貴之[2]、森松 文毅[2]、片倉 喜範[3] （九大農・生資環、[1]九大院・生資環、[2]日ハム・中研、[3]九大院・農院）

○ Kaoru Fujii, Keishi Kadooka[1], Takashi Matsumoto[2], Fumiki Morimatsu[2], Yoshinori Katakura[3] (Fac. Agri., Kyushu Univ., [1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Nippon Meat Packers, [3]Fac. Agri., Kyushu Univ.)

【目的】我々は、脳と腸との間の相互作用：脳腸相関の食品による活性化の可能性を追求することを第一の目的として研究を行い、これまでに、食肉成分の一種であるカルノシンが、腸管上皮細胞からの神経栄養因子発現を増強することを見いだしている。そこで本研究では、カルノシンを初めとする様々な食肉成分による神経栄養因子発現の増強効果を検証するとともに、その機能性の分子基盤を明らかにすることを目的として研究を行った。
【方法】ヒト腸管上皮細胞のモデルとしてヒト結腸癌由来Caco-2細胞を用いた。食肉成分としては、カルノシン、カルニチン及びその他の食肉成分を用いた。これら食肉成分を、様々な濃度でCaco-2細胞に3日間添加後培養を行い、定量RT-PCR法により、神経栄養因子であるBDNFの発現変化を追跡した。次に、食肉成分によるBDNF転写増強効果に対するCREBの関与を明らかにするために、CREBの活性及び転写活性化能をルシフェラーゼアッセイにより評価した。
【結果】様々な食肉成分の Caco-2 細胞における神経栄養因子発現増強効果を検証した結果、カルノシンにもっとも強い効果を確認することができた。次に、カルノシンによる BDNF 発現増強効果に対する CREB の関与を明らかにするためにまず、CREB の活性化を pCRE-Luc リポーターを用いて検証した結果、カルノシンにより CREB が活性化していることが明らかとなった。さらに、GAL4-CREB コンストラクトを用い、カルノシンによる CREB 活性化能を検証した結果、カルノシンが CREB の転写活性化能を増強していることが明らかとなった。以上の結果から、カルノシンは腸管上皮細胞に作用して CREB の活性化を引き起こし、その結果として標的遺伝子の一つである BDNF の転写量が増強したものと考えられた。

BDNF, carnosine, Caco-2

講演番号:3J12a14
講演日時、会場:3月24日11:43～ J校舎12会場

Wheat gluten hydrolysate induces PYY secretion and suppresses food intake in rats

○Wenya Chen, Tohru Hira[1], Hiroshi Hara[1]
(Grad Sch Agr, Hokkaido Univ, [1]Res Fac Agr, Hokkaido Univ)

【Aims】Protein/peptide is potent satiating macronutrient. We compared the effects of various protein hydrolysates on food intake in rats and examined the secretion of satiety hormones.
【Method】Food intake was measured for 12 hours after the orogastric preload of various protein hydrolysates (0.5-1.5 g/kg BW) in 12 hour-fasted male Wistar/ST rats. Portal blood was collected 1, 2 and 3 hours after gavage of protein hydrolysates for gut hormone (CCK, GLP-1, PYY) measurements by ELISA. The hormone-releasing activity of protein hydrolysates was examined in L cell model GLUTag cells.
【Result】The gavage of wheat gluten hydrolysate (WGH) reduced food intake greater than other protein hydrolysates, and the suppressive effect lasted over 6-12 hours while intact wheat gluten showed minor effect. Plasma CCK levels in WGH-treated rats and lactalbumin hydrolysate (LAH)-treated rats were similarly higher than control rats at 1 hour after the gavage. However, PYY was higher in WGH-treated rats than LAH-treated and control rats at 2 and 3 hours. And WGH effectively stimulated GLP-1 secretion in L cell model. These results suggest that prolonged suppression of food intake induced by WGH may be mediated by enhanced PYY secretion.

Protein hydrolysate, Satiety, PYY

講演番号：3J12a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ J校舎12会場

食物繊維摂取時の杯細胞数・ムチン増加作用への腸内細菌の関与

Influence of Microflora on Intestinal Goblet Cell Number and Mucin Composition in Rat Fed Dietary Fiber

○日野 真吾、最田 裕善、森田達也（静岡大農・応生化）
○Shingo Hino, Hiroyoshi Saita, Tatsuya Morita (Faculty of Agr., Shizuoka Univ.)

【目的】これまでに,食物繊維(DF)の摂取は,杯細胞の分化促進を介し小腸杯細胞数を増加させ,このとき増加する杯細胞はシアロムチン陽性細胞であることを報告している。この作用にはDF摂取による管腔内圧上昇が寄与すると推定しているが,何故,管腔内圧の上昇が杯細胞への分化促進シグナルとなるのかは不明である。管腔内圧の上昇はEC細胞からのセロトニン放出を引き起こし,その際に粘膜固有層側にエンドトキシンが流入することが報告されている。加えて,エンドトキシンの経口投与により結腸杯細胞数が増加することも報告されている。これらの事実からDF摂取時の管腔内圧上昇による小腸杯細胞数増加のメカニズムの一つとして腸内細菌を介した分化促進が考えられる。そこで本研究では,除菌ラットを用いてDF摂取による小腸杯細胞への分化促進作用の解析を行った。【方法】6週齢のWistar系雄ラット馴化後,除菌群には抗生物質を水道水に溶解したものを,通常飲水群には水道水をそれぞれ7日間自由摂取させた。その後,除菌群,通常飲水群をそれぞれ2群に分け,標準飼料(AIN)またはPSFを8%添加した試験飼料(PSF群)のいずれかを7日間自由摂取させる計4群で試験を行った。各群6匹は非絶食下で解剖し空腸および回腸組織,小腸内容物,回腸末端内容物,盲腸内容物を採取した。空腸および回腸組織はPAS染色を行い杯細胞数を測定すると同時に、HID/AB染色を行うことでサルフォムチン,シアロムチン陽性細胞の比率についても検討を行った。【結果・考察】除菌群ではPSF摂取による絨毛あたりの杯細胞数は増加しなかったが、通常飲水群ではPSF摂取による空腸および回腸組織の絨毛あたりの杯細胞数が増加した。一方,絨毛長あたりの杯細胞数は除菌の有無によらずPSF摂取により空腸,回腸組織で共に増加した。除菌の有無にかかわらず空腸,回腸組織で共にPSF摂取によるサルフォムチン陽性細胞数の減少が観察された。加えて,回腸組織ではPSF摂取によりシアロムチン陽性細胞数が増加し,除菌によって減少した。腸内細菌の除菌により食物繊維摂取時の杯細胞数の増加が有意に抑制されたことから,食物繊維摂取による小腸杯細胞数の増加は腸内細菌の影響を受けており,管腔内圧の上昇が腸内細菌成分という化学情報に変換され分化促進シグナルとなることが示唆された。また,食物繊維摂取による杯細胞増加作用に対する除菌の効果は空腸よりも腸内細菌数が多いとされる回腸において顕著であったこともこれを支持するものであると考えられる。一方で、シアロムチン陽性細胞数の増加とサルフォムチン陽性細胞数の減少作用は除菌により消失しなかったことから別のメカニズムによることが示唆された。

Keyword1 Mucin, Keyword2 Goblet cell, Keyword3 microflora

講演番号：3J12p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ J校舎12会場

アロエベラゲル抽出物（AVGE）のエタノール誘導性脂肪蓄積予防効果

Aloe vera gel extract prevents the ethanol-induced accumulation of lipid in mouse liver.

○齊藤　万里江、田中　美順、三澤　江里子、山田　宗夫、樋田知宏、岩附　慧二、河田　照雄[1]（森永乳業・食基研、[1]京大院農・食品生物）

○Marie Saito, Misato Tanaka, Eriko Misawa, Muneo Yamada, Tomohiro Toida, Keiji Iwatsuki, Teruo Kawada[1] (Morinaga Milk Industry Co., LTD, Food Science & Technology Institute, [1] Division of Food Sciences and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】脂肪肝は、肝細胞中に脂質が過剰に蓄積した状態であり、いまや国民の3人に1人が潜在患者であるといわれ、生活習慣病の１つとして認識されている。
アロエベラゲルは、アロエベラの食用の葉肉部分で、ヨーグルトなどの食品素材として広く利用されている。我々は、これまでにアロエベラゲルの体脂肪低減効果及び抗糖尿病効果を確認し、有効成分として5つの植物ステロール（アロエベラステロール®）を同定した。また、超臨界二酸化炭素を用いた抽出を行い、これらの有効成分を含む抽出物(AVGE)を得ることに成功した。
今回我々は、以前の報告をもとに、エタノールの単回投与によって一時的に肝臓中の中性脂肪量を上昇させたマウスモデル系を用いて、AVGE投与による肝臓脂質の蓄積予防効果を検討した。
【方法】8週齢C57BL/6J雄マウスに、AVGEを10μg/匹の用量で1日1回1週間、連日経口投与した。コントロールとして、1%ポリエチレングリコール（PG）水溶液を用いた。最終投与の14時間後から2時間絶食させた後に、1%PGまたはAVGEを投与したマウスをそれぞれさらに2群に分けて、エタノール（3 g/kg体重）あるいは、エタノールと等カロリーに調整したグルコース水溶液を単回経口投与した。以下、各群を CG群(PG-グルコース投与群)、AG群(AVGE-グルコース投与群)、CE群(PG-エタノール投与群)、AE群(AVGE-エタノール投与群)とする。エタノールの投与6時間後に肝臓を採取して、トリグリセライド(TG)含量を測定するとともに、脂質代謝関連遺伝子の発現量を定量PCR法にて解析した。
【結果】CG群とAG群では肝臓TG量に変化は見られなかったが、AE群の肝臓TG量は、CE群に比べ有意に低値を示したことから、AVGE投与は、エタノール誘導性の肝臓への中性脂肪蓄積を抑制していると考えられた。そこで、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現量を調べた結果、核内受容体PPARα遺伝子は、エタノール投与による発現低下が確認された。しかし、AVGE群とAE群とCE群との間に発現量の差は認められなかった。また、CE群では、転写因子SREBP1-Cおよび、脂肪酸合成酵素Fasnの遺伝子発現量は、著しく増加していた。これに対して、AE群では、これらの発現量増加は有意に抑制された。さらに中性脂肪合成酵素Dgat1、Dgat2についても、エタノール投与により遺伝子の発現量増加が誘導されたが、AE群では抑制傾向を示した。以上の結果から、エタノール投与により誘発される、マウス肝臓中の脂質合成遺伝子の発現量増加は、AVGE摂取により抑制され、肝臓中の中性脂質蓄積を予防している可能性が示唆された。

Aloe vera, Fatty liver, Alcohol

講演番号：3J12p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ J校舎12会場

プチヴェールの機能解析

Performance analysis of a Petit Vert

○小瀬木 一真、都築 育己、山田 千佳子、和泉 秀彦、松田 幹[1]
（名古屋学芸大院・栄養科学、[1]名大院・生命農）
○Kazumasa Ozeki, Ikumi Tsuzuki, Chikako Yamada, Hidehiko Izumi,
Tsukasa Matsuda[1] (Nagoyagakugeidai, [1]Nagoyadai)

【目的】
プチヴェールはケールと芽キャベツの交配によって作り出された新奇のアブラナ科植物であり、両者の長所を受け継いだ非結球性の芽キャベツで、一般の野菜に比べて栄養価が高く、糖度も11～13度と高いため食べやすい。アブラナ科植物にはケルセチン、ケンフェロールなどの機能性を有するポリフェノールが含まれており、生活習慣病の予防やアレルギーに効果的であることが知られている。しかし、プチヴェールの機能性や、それに関与している成分については明らかにされていない。そこで、プチヴェールのポリフェノールなどの成分を分離して、親野菜であるケールや芽キャベツと比較し、抗酸化作用、生体内脂質異常抑制作用、体重増加抑制作用、抗アレルギー作用などの機能性を解析することを目的とした。
【方法】
[1]試料 200 g を粉砕し、70%メタノールで抽出後、ろ過と濃縮を行った。この粗抽出液をダイヤイオン HP20 カラムに通し、水溶出画分、70%エタノール溶出画分をそれぞれ集め濃縮乾固した。これを水 20ml に溶解したものを抽出液とし、抗酸化物質量、ポリフェノール量をそれぞれ測定した。また、HPLC 法による成分の分離も行った。
[2]体重増加、生体内脂質異常抑制作用の検討：C57BL/6JJmsSlc 雄性マウスを普通食群、高脂肪食群、高脂肪食+プチヴェール投与群の 3 群に分け、飼料は自由摂取させた。プチヴェール投与群は 9 時と 17 時にプチヴェール濃縮液を 100μl ずつ経口投与して 3 週間飼育し、体重、脂肪量、血中トリグリセリド、コレステロール、過酸化脂質を測定した。
[3]抗アレルギー作用の解析：ラット由来の肥満細胞（RBL-2H3 細胞）にプチヴェール抽出液を添加し、脱顆粒の抑制率を解析した。
【結果】
[1]抗酸化物質量、ポリフェノール量ともに、プチヴェールはケールより芽キャベツに近い値を示した。また、HPLC法による成分の分離パターンもプチヴェールと芽キャベツは類似していた。
[2]高脂肪食摂取群と高脂肪食+プチヴェール投与群を比較すると、体重、トリグリセリド、コレステロール、過酸化脂質では差は見られなかったが、飼料摂取量は高脂肪食群が多く、脂肪量はプチヴェール投与群で少なかった。
[3]水溶出画分、70%エタノール溶出画分ともポリフェノール総量5μmol/mlあたりの濃度で、脱顆粒の抑制が観察された。

Petit Vert, polyphenol, RBL-2H3

講演番号：3J12p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ J校舎12会場

褐藻由来フコキサンチンの白色脂肪組織におけるUCP1発現誘導機構

Molecular mechanism of UCP1 expression in white adipose tissue by fucoxanthin

○小出　愛、松本伊代、別府史章、前多隼人[1]、細川雅史、宮下和夫（北大院・水、[1]弘前大・農）
○Ai Koide, Iyo Matsumoto, Fumiaki Beppu, Hayato Maeda[1], Masashi Hosokawa, Kazuo Miyashita (Hokkaido University, [1]Hirosaki University)

【目的】UCP（uncoupling protein）は、ミトコンドリア内膜に発現し酸化的リン酸化反応を脱共役させ、エネルギーを熱として散逸する機能を持ったタンパク質である。代表的な褐色脂肪組織（BAT）のUCP1は、肥満予防のターゲット因子としての役割が注目されている。演者らは、ワカメなどの食用褐藻に特徴的に含まれるフコキサンチン(Fx)が、糖尿病/肥満マウスに対して白色脂肪組織(WAT)の肥大化を抑制するとともに、本来UCP1のタンパク質発現が見られないWATにおいて異所性の発現を誘導することを見出した。近年、BATのみならず、WATにおけるUCP1の発現を介した褐色様脂肪細胞への変換とそれによる生体内エネルギー代謝の亢進が報告されており、それらを制御する物質の探索や制御機能の解明が重要といえる。そこで本研究では、FxによるWATでのUCP1の発現誘導機構について解析を行った。
【方法】糖尿病/肥満KK-A^yマウスに精製Fxを0.2%含有するAIN-93G飼料を経口投与し、2週間飼育を行った。その後、WATにおけるUCP1とその制御因子のタンパク質発現量をウエスタンブロッディングにより解析した。
【結果及び考察】Fxを2週間経口投与したKK-A^yマウスでは、鼠径部WATに加え子宮周囲WATにおいて異所性のUCP1の発現が見られた。更に、Fx投与群では、鼠径部および子宮周囲WATにおけるβ_3アドレナリンレセプターのタンパク質発現量がコントロールの2.8倍、3.5倍までそれぞれ増加していた。一方、Fxは鼠径部WATにおいてCREBのリン酸化を活性化するとともに、BATにおいて高発現しUCP1 mRNA発現の転写制御に関わるコアクチベーターPGC-1αのタンパク質発現量をコントロール群と比較して6.5倍まで大きく上昇させた。このようなPGC-1αの発現誘導は、子宮周囲WATにおいても同様に観察された。以上の結果より、FxはWATにおいてβ_3アドレナリンレセプターの発現とCREBのリン酸化亢進を介してPGC-1αを誘導し、UCP1を発現させる機構が推察される。

fucoxanthin, UCP1, WAT

講演番号：3J12p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ J校舎12会場

乳酸菌を用いた新規共役脂肪酸の生産とその生理機能評価

Biosynthesis of novel conjugated fatty acids by lactic acid bacteria and their physiological function

○朴 時範[1]、岸野 重信[1,2]、菅原 達也[3]、平田 孝[3]、横関 健三[1]、清水 昌[2,4]、小川 順[2]（[1]京大院農・産業微生物、[2]京大院農・応用生命、[3]京大院農・応用生物、[4]京都学園大・バイオ環境）

○Si-Bum Park[1], Shigenobu Kishino[1], Tatsuya Sugawara[1], Takashi Hirata[1], Kenzo Yokozeki[1], Sakayu Shimizu[1,2], Jun Ogawa[1]（[1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Gakuen Univ.）

【目的】近年、ライフスタイルが欧米化することにより、食生活が変化してきている。それに伴い食事脂質の過剰摂取が起因となる生活習慣病が増加していることから、その改善・予防法の開発が急務となっている。一方、リノール酸の異性体であり、分子内に共役した二重結合を有する共役リノール酸（CLA）が、殺癌細胞効果、脂質代謝改善作用などの生理機能を持つことから機能性脂質として注目を集めている。しかし、天然に存在する CLA は反芻動物由来の肉や乳製品にごく微量にしか存在しない。そこで我々は、共役脂肪酸を機能性脂質として開発すべく、乳酸菌を用いた CLA 生産を試みた。その結果、リノール酸を効率的かつ選択的に CLA へと変換する乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を取得し、本菌による生成物が *cis*-9, *trans*-11-CLA と *trans*-9, *trans*-11-CLA であることを明らかにした。また、本菌を用い様々な C18 不飽和脂肪酸を変換することにより、それぞれ対応する共役脂肪酸を選択的に生産できることを見いだした。本発表では本菌による変換反応生成物である様々な共役脂肪酸を用いてヒト由来癌細胞の増殖抑制能について検討した。

【方法】*L. plantarum* の洗浄菌体を触媒にリノール酸、α-リノレン酸、γ-リノレン酸及びステアリドン酸と共に反応に供したところ、それぞれの基質に対して二種類の共役脂肪酸の生産が確認できた。各生成物を HPLC にて精製し同定を行ったところ、生成物は基質の *cis*-9, *cis*-12 二重結合が *cis*-9, *trans*-11 及び *trans*-9, *trans*-11 二重結合へと異性化した共役脂肪酸であることが明らかとなった。生成した各共役脂肪酸を、DMEM 培地で培養した結腸癌細胞（Caco-2）と RPMI1640 培地を用いて培養した肝癌細胞(HepG2)に添加しさらに培養を行った。添加後、24 時間と 48 時間に、細胞生存率を WST-1 法で測定することにより、癌細胞増殖抑制効果を評価した。

【結果】様々な共役脂肪酸を Caco-2 と HepG2 培養細胞に添加した結果、*trans*-9, *trans*-11 型共役脂肪酸添加群で *cis*-9, *trans*-11 型共役脂肪酸添加群より顕著な癌細胞増殖抑制効果が認められた。さらに添加した *trans*-9, *trans*-11 型共役脂肪酸の中でも、9 位、11 位以外の二重結合の位置により癌細胞増殖抑制効果が異なることから分子内の共役二重結合以外の二重結合の位置が癌細胞増殖抑制効果に影響を与えることが示唆された。

Conjugated fatty acids, lactic acid bacteria, physiological function

講演番号：3J12p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ J校舎12会場

がん予防食品因子イソチオシアネート結合タンパク質の探索

Identification of macrophage migration inhibitory factor as a isothiocyanate-binding protein

○三好 規之、米持 巧、中村 宜督[1]、大島 寛史（静県大院・生活健、[1]岡大院・自然科学）

○Noriyuki Miyoshi, Takumi Yonemochi, Yoshimasa Nakamura[1], Hiroshi Ohshima (Univ. of Shizuoka, [1]Okayama Univ.)

【目的】アブラナ科植物等に多く含まれるイソチオシアネート類（ITCs）は、がん予防活性が最も期待されている食品成分の一つである。ITCsのがん予防分子メカニズムにおいて、ITCsとタンパク質との相互作用が様々な生理活性の引き金となることが示唆されているが、その分子機構は不明な部分が多い。我々はこれまでに、ITCs結合タンパク質の探索・同定を目的として、特異的抗体や化合物のプローブ化（ビオチン化やRI標識など）を必要とせず、インタクトなITCsを用いたアッセイで結合タンパク質を網羅的に同定する分析法を開発した。そこで本研究では開発した分析法を応用し、ヒト大腸がんHCT116細胞を用いたITCs標的タンパク質の探索・同定を行った。
【方法】20 μMのbenzyl ITC (BITC)あるいはphenethyl ITC (PEITC)をHCT116細胞に4時間曝露した。凍結融解法により細胞抽出液を調製し、トリプシンで消化後、UPLC-TOF/MS分析に供した。得られたMSピークリストからBITCとPEITCの質量差を利用したITCs結合ペプチド候補のMSピーク探索を行い、複数のMSピーク対を抽出した。さらに、抽出されたITCs結合ペプチド候補MSピークのLC-Q-TOF/MS解析により、ITCs結合タンパク質および結合部位の同定を行った。
【結果】UPLC-TOF/MS分析から得られたMSデータのOPLS-DA解析によってBITCおよびPEITC処理群特異的に検出された高いSIMCA値を示すMSピークのうち、BITCとPEITCの質量数差に相当する*m/z*を示すMSピーク対を抽出した。そのうち、BITCおよびPEITC処理群でそれぞれ、*m/z* 457.1100、471.1401 (*z*=1)を示したMSピークについては、LC-Q-TOF/MS分析より還元型グルタチオン（Glu-Cys-Gly）のシステイン残基へのBITCおよびPEITC付加体であることが同定された。さらに、BITCおよびPEITC処理群でそれぞれ、*m/z* 718.8513 and 723.8600 (*z*=2)を示したMSピークは、PMFIVNTNVPRのN末端プロリン残基にBITCおよびPEITCがそれぞれ付加したペプチドであり、ITCs結合タンパク質のひとつとしてmacrophage migration inhibitory factorが同定された。現在、さらなる感度や精度の向上を目指したサンプル調製法の改良などを行っている。

isothiocyanate, cancer chemoprevention, LC-MS

講演番号：3J12p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ J校舎12会場

Genisteinの成人T細胞白血病細胞増殖抑制メカニズムについて

Growth inhibitory effect of adult T-cell leukemia cells by genistein

○峰 善広、榊原 陽一、水光 正仁、森下 和広[1]、山﨑 正夫、西山 和夫（宮崎大農 応生科、[1]宮崎大医 腫瘍生化学）

○Yoshihiro Mine, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko, Kazuhiro Morishita[1], Masao Yamasaki, Kazuo Nishiyama (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, [1]Faculty of Medicine, University of Miyazaki)

【目的】成人T細胞白血病（ATL）はヒトT細胞白血病ウイルスI型（HTLV-I）の感染により誘発される白血病の一種である。日本では人口の約1%に当たる108万人がHTLV-Iに感染しているとされ、これは世界的にみて高い感染率である。ATLはHTLV-I感染から20-50年の長い潜伏期を経て発症するが、その発症率は5%と極めて低いため発症せずに生涯を終える者も多い。しかし、未だに効果的な治療法が無いため、一度発症してしまうと1年以内に半数以上の患者が死亡してしまう致死性の高い疾患である。我々はこれまで食品摂取によるATL予防を目的とし、大豆イソフラボン類に注目してきた。我々は*In vivo*及び*In vitro*において大豆イソフラボン類がATL細胞の増殖を抑制することを明らかにし、さらに*In vitro*において大豆イソフラボン類のうちGenisteinが特に強力な増殖抑制能を有することを示した。本研究ではGenisteinによるATL細胞増殖抑制のメカニズムについて検討した。

【方法】ATL細胞株Hut102を0-30 μM Genistein存在下で24-72時間培養した。細胞毒性試験はTrypan blue色素排除法により行った。細胞周期解析、アポトーシス細胞の検出はFlowcytometerを用いて行った。また、タンパク質の発現解析にはWestern Blot法を用いた。

【結果】Genisteinは濃度依存的にHut102細胞の増殖を抑制した。細胞周期解析の結果、Genistein処理によりG2/M期の細胞が増加した。さらにGenistein処理群においてAnnexin V陽性細胞の増加が観察された。そこで細胞周期及びアポトーシス関連タンパク質の発現を解析したところ、Genistein処理によりp53、p21、Bax、MDM2の発現が増大しており、p53が安定化し転写活性が上昇していることが示唆された。次に、ATL細胞において恒常的な活性化が報告されているNF-κB経路について調べるとGenistein添加によりリン酸化IκBαと核内p65の発現減少がみられ、NF-κB活性化が抑制されていることが示唆された。以上より、GenisteinのATL細胞増殖抑制メカニズムとしてG2/M期遅延とアポトーシス誘導が示唆され、p53安定化に伴う細胞周期遅延及びアポトーシス関連タンパク質の発現増大と、NF-κB活性化抑制が関与していることが示唆された。

Soy isoflavone, Genistein, ATL

講演番号：3J12p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ J校舎12会場

ヒト前立腺癌細胞PC3のアポトシス誘導にコルジセピンが及ぼす影響

Effect of cordycepin on apoptosis induction in PC3 human prostate cancer cells

李　慧賢[1]、金　玟廷[1]、徐　玫貞[1,2]、姜　秉元[2]、朴　正郁[2]、崔　英鉉[3]、○鄭　永基[1,2]（[1]東亜大・生命工、[2]東亜大・メディファーム産業化研究事業団、[3]東義大・漢医学科）

Hye-Hyeon Lee[1], Min-Jeong Kim[1], Min-Jeong Seo[1,2], Byoung-Won Kang[2], Jeong-Uck Park[2], Yung-Hyun Choi[3], ○Yong-Kee Jeong[1,2] ([1,2]Dong-A University, [3]Dong-Eui University)

【Purpose】Cordycepin (3′-deoxyadenosine), a specific polyadenylation inhibitor, is the main functional component in an edible mushroom *Cordyceps militaris*. A variety of pharmacological activities including the enhancement of body's immune functionhave been reported. In this study, we aimed to investigate the effects of cordycepin on the cell growth and apoptosis in human prostate cancer cells.

【Methods】Cell viability in PC3 cells was estimated under the indicated concentrations of cordycepin. To elucidate apoptosis induction, we observed cell morphology and conducted western blot analysis, RT-PCR and *in vitro* caspase activity change. The effect of cordycepin in mouse splenocytes was also observed.

【Results】Treatment of cordycepin inhibited the cell growth in a concentration-dependent manner by inducing apoptosis. RT-PCR and western blot analysis suggested that the induction of apoptosis was associated with up-regulation of Bax and down-regulation of IAP family and anti-apoptotic Bcl-2 family. In addition, the exposure of cordycepin induced not only the activation of caspase-3, -8 and -9, but also a proteolytic cleavage of specific target proteins such as poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and ß-catenin proteins.

apoptosis, cordycepin, prostate cancer cells

講演番号：3J12p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ J校舎12会場

サツマイモ葉ポリフェノールによるインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ阻害および増殖抑制作用

Neuraminidase inhibitory and anti-proliferative activities of influenza viruses by polyphenols from sweetpotato leaves

○石黒 浩二、吉元 誠[1]、西藤　岳彦[2]（農研機構・北農研、[1]鹿児島女短大、[2]農研機構・動衛研）
○Koji Ishiguro, Makoto Yoshimoto[1], Takehiko Saito (NARO HARC, [1]KWJC, [2]NARO NIAH)

【目的】サツマイモ葉には、ビタミン類、ミネラル、タンパク質、食物繊維に加え、ポリフェノールやカロテノイドが豊富に含まれている。主要なポリフェノールはカフェオイルキナ酸類であり、抗酸化性、抗糖尿病作用、抗高血圧作用などが報告されている。本研究では、カフェオイルキナ酸類について、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ阻害活性および増殖抑制作用について明らかにする。
【方法】サツマイモ葉ポリフェノール抽出物および各カフェオイルキナ酸精製物（カフェ酸、クロロゲン酸、ジカフェオイルキナ酸、トリカフェオイルキナ酸）のインフルエンザウイルスノイラミニダーゼ阻害活性を測定した。インフルエンザウイルス株はAソ連型H1N1(A/Texas/36/91)、A香港型H3N2(A/Texas/131/02)、B型(B/Memphis/20/96)を供試した。各ウイルス株の増殖抑制作用は、プラークアッセイにより評価した。
【結果】サツマイモ葉ポリフェノール抽出物は、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ活性を阻害することが示された。その阻害作用は供試したA型およびB型インフルエンザウイルス株の全てにおいて認められたが、サツマイモの品種によって各ウイルス株のノイラミニダーゼに対する阻害活性が異なった。特に、総ポリフェノールやトリカフェオイルキナ酸を高含有する品種において、阻害活性が高いことが示された。ポリフェノール抽出物あたりのH1N1（A型）ノイラミニダーゼ阻害活性(IC_{50})は約0.1mg/mlであり、茎葉利用品種「すいおう」の阻害活性(IC_{50})は葉粉末あたり8.2mg/mlであった。
　精製したカフェオイルキナ酸類は供試した全てのA型およびB型インフルエンザウイルス株のノイラミニダーゼを阻害した。その阻害活性の強さは、概ねトリカフェオイルキナ酸、ジカフェオイルキナ酸、クロロゲン酸、カフェ酸の順であり、カフェオイル基の数が多いほど阻害活性が強いことが示された。H1N1(A型)の阻害活性(IC_{50})は、カフェ酸が534.6μM、クロロゲン酸が456.1μM、3,5-ジカフェオイルキナ酸が94.1μM、トリカフェオイルキナ酸が85.3μMであった。このことから、サツマイモ葉ポリフェノール抽出物が有するノイラミニダーゼ阻害作用の主な有効成分は、カフェオイルキナ酸類であることが示された。
　プラークアッセイにより葉ポリフェノール抽出物およびカフェオイルキナ酸による、上記インフルエンザウイルス３株の増殖抑制作用が認められた。以上より、サツマイモ葉ポリフェノールは、ノイラミニダーゼ活性を阻害することによりインフルエンザウイルスの増殖を抑制することが期待された。

Sweetpotato polyphenols, Influenza virus, anti-proliferation

講演番号:3J12p10
講演日時、会場:3月24日15:38～ J校舎12会場

ウルソール酸による子宮内膜癌細胞の MAPK in cyclin D1 signaling と SCF E3s への影響 Effect of ursolic acid on MAPK in cyclin D1 signaling and RING typE3ligase (SCF E3s) in two endometrial cancer cell lines

○阿知和 弓子、長谷川清志、長瀬さやか、宇田川康博（藤田保健衛生大・医）
○ Yumiko Achiwa, Kiyoshi Hasegawa, Sayaka Nagase, Yasuhiro Udagawa(Fujitahokeneiseidai)

「目的」ウルソール酸（UA）の 2 種類の子宮内膜癌細胞（SNG-2, HEC108）に対する MAPK path way の活性阻害およびアポトーシス誘導とその機序については報告した。今回は UA による子宮内膜癌細胞のユビキチン化に関与する RING-type E3(SCF E3s)と CyclinD1 および MAPK signaling pathway への影響について検討した。
「方法」各濃度の UA を 2 種類の子宮内膜癌細胞（SNG-2, HEC108）に添加し、培養後 whole cell からタンパク質を抽出し調製した。Cyclin D1, p-ERK1/2, FBXW8, Cullin1, Skp1, Rbx1,Ubiquitin の発現変化に関しそれぞれの抗体を用い Western blotting を行った。細胞周期はフローサイトメトリーで観察した。
「結果」UA の添加により p-ERK1/2 の発現抑制に伴い Cyclin D1 も抑制された。SCFE3s の FBX につて検討した。ERK の CyclinD1 リン酸化に伴い FBXW8, Cullin1 の発現抑制が認められた。また UA による RING-type E3 の SKP1, Rbx1 の発現抑制も確認できた。そして Ubiquitin に SCF E3s が蓄積されていると推測された。UA は細胞質に SCF E3s を蓄積し、G1 を停止すると考えられた。UA はこの結果から細胞増殖を抑制すると推察された。

Endometrial cancer cell,SCFE3s, Ursolic acid

講演番号：3J12p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ J校舎12会場

薬用植物の血管新生におよぼす影響

Effect of medicinal plants extract on angiogenesis

○吉城由美子、柾谷佳奈（石川県大・食科）
○Yumiko Yoshiki, Kana Masaya (Ishikawakendai)

【目的】

古くから調味料や漢方薬の材料として用いられてきた薬用植物は、医食同源の基本概念を支える領域の一つである。これまでも抗炎症作用や抗ガン作用などに対する薬用植物の有用性が認められてきたが、近年、活性酸素の消去作用に関する報告も多く、薬用植物の機能性への期待が高まっている。様々な薬用植物成分の血管新生の制御機構を検討することは、新たな病態解析や治療法を創出するうえで重要である。そこで、本研究では日常使用される薬用植物の血管新生におよぼす影響を調べ、その制御機構について検討することを目的として行った。

【方法】

食用植物７種（茎ニンニク、ミョウガ、金時草、クレソン、ニンニク、梅、ショウガ）、生薬５種（マオウ、ヨクイニン、サンショウ、ニンジン、チョウジ）を試料とした。一般分析として、それぞれのポリフェノール量、ビタミンＣ量、活性酸素消去能、ＤＮＡ損傷作用を測定した。細胞増殖作用および血管管腔形成解析（面積、長さ、分岐数）はヒトさい帯静脈血管（HUVEC、コージンバイオ）を用い、Medium200S（GIBCO）を基礎培地とし、試料50μg/mLを加え、5%CO_2、37℃で培養し行った。また、血管内皮細胞増殖因子受容体のmRNA発現量をRT-PCRで測定した。

【結果】

ポリフェノール量はチョウジ、サンショウ、マオウで高く、ほとんどの試料でポリフェノール量とO_2^-消去能に相関性（R^2=0.832）があったが、梅のO_2^-消去能はビタミンCに由来すると考えられた。また、ショウガ、チョウジなど活性酸素消去作用の高い試料ではDNA損傷抑制作用が見られたのに対し、クレソン、ミョウではDNAが損傷された。細胞増殖作用を検討した結果、マオウ、ヨクイニンなどの生薬では1.4～1.6倍（コントロール比）の増殖作用があった。一方、クレソンや金時草では有意な抑制作用（0.6～0.8倍）があった。mRNA発現量の解析からクレソンの細胞増殖抑制作用にはアポトーシスが関与していると考えられた。良好な管腔形成（長さ、分岐数/well）はニンニク（8100 pixel±1476、100±19）、マオウ（8600 pixel±2111、131±33）、ヨクイニン（8659 pixel±943、111±20）で観察できた。血管管腔形成ならびに血管内皮細胞増殖因子受容体mRNA発現量の相対比から、ニンニクなどの血管新生作用が創傷治癒に有効であることが示唆された。

Angiogenesis,　Medicinal plant, VEGFR

講演番号：3J12p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ J校舎12会場

沖縄産プロポリス中のプレニルフラボノイドの血管新生抑制活性に関する研究

Study on anti-angiogenic substances from Okinawan propolis

○土屋 育未、太田 敏郎、牛田 素子、国政 和宏[1]、吉田 真奈美、熊澤 茂則（静岡県大院生活健康・食栄、[1]武庫川女大・ 国際健康研）
○Ikumi Tsuchiya，Toshiro Ohta，Motoko Ushida，Kazuhiro Kunimasa[1]，Manami Yoshida，Shigenori Kumazawa（University of Shizuoka，[1]Mukogawa Women's University）

【目的】癌は1981年以来日本人の死亡原因の第一位を占めており、効果的な癌予防法の確立は重要な課題である。近年、プロポリスは抗癌作用を持つことが報告され、癌の予防や治療の分野でも注目されているが、その詳細な作用機構には依然不明な点が多い。我々はすでに、沖縄産プロポリスのエタノール抽出物が血管内皮細胞に対して形態学的にアポトーシスを誘導し、管腔形成を抑制することを見出している。そこで本研究では、沖縄産プロポリスのエタノール抽出物および主要構成成分を用いて、その血管新生抑制作用を比較・評価し、分子レベルで血管新生抑制機構の解明を行った。
【方法】ウエスタンブロッティング法によるシグナル解析：ゲル内三次元包埋法で培養したヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を Sampling buffer で処理し、分析用試料とした。このタンパク質試料を SDS-PAGE で分離後、ニトロセルロースメンブレンに転写し、各一次抗体及び二次抗体と反応させた。その後、ECL PLUS System を用いて化学発光検出を行った。
鶏胚漿尿膜法（Chorioallantoic Membrane Assay, CAM法）による血管新生抑制活性評価：受精鶏卵のCAM上にプロポリス試料を添加し、血管新生抑制効果を*in vivo*で評価した。評価方法として、試料添加後4日目における血管新生抑制エリアを観察し、活性の強さを5段階で判定した。その結果から、血管新生阻害率を算出した。
【結果】沖縄産プロポリスのエタノール抽出物は、CAM法において血管新生抑制効果が認められた。また、分子レベルでは、沖縄産プロポリス抽出物は生存シグナルERK1/2を不活性化させ、アポトーシス実行因子caspase-3、アポトーシス誘導シグナルp38を活性化することが確認された。さらにERK1/2の活性化を制御する上流キナーゼMEK1/2が不活性化されていることが示された。また、アポトーシス実行因子caspaseの基質であるLamin A/C、PARPの切断も示された。以上のことから、沖縄産プロポリスは分子レベルでもアポトーシスを誘導していることが示された。

angiogenesis, apoptosis, propolis

講演番号:3J12p13
講演日時、会場:3月24日16:21～ J校舎12会場

レスベラトロール類縁体を豊富に含むメリンジョ種子抽出物は血管新生に関連した内皮細胞機能及び腫瘍血管新生を抑制する

Resveratrol derivative-rich melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and tumor angiogenesis.

○国政　和宏[1]、太田　敏郎[2]、谷　央子[3]、加藤　榮信[4]、江口　良二[5]、加治　和彦[2]、池田　克己[1]、森　英樹[1]、森　真理[1]、立藤　智基[1,3]、家森　幸男[1] ([1]武庫川女大、[2]静岡県大、[3](株)山田養蜂場、[4](株)ホソダSHC、[5]兵庫医大)

○Kazuhiro Kunimasa[1], Toshiro Ohta[2], Hiroko Tani[3], Eishin Kato[4], Ryoji Eguchi[5], Kazuhiko Kaji[2], Katsumi Ikeda[1], Hideki Mori[1], Mari Mori[1], Tomoki Tatefuji[1,3], Yukio Yamori[1] ([1]Mukogawa Women's Univ., [2]Univ. Shizuoka, [3]Yamada Apiculture Center Inc., [4]Hosoda SHC Co. Ltd., [5]Hyogo Coll. Med.)

【目的】東南アジア原産のグネツム科植物メリンジョ(*Gnetum gnemon* L.)の種子はインドネシアなどで食材として利用されており、gnetin C (レスベラトロール 2 量体)、gnetin C 配糖体(gnemonoside A、gnemonoside C、及び gnemonoside D)、及び gnetin L (レスベラトロール類縁体) を含んでいることが明らかにされている(Kato E *et al.*, *J Agric Food Chem* 57: 2544-9, 2009)。そこで本研究では、メリンジョ種子抽出物及びそれらレスベラトロール類縁体の生理活性を明らかにする一端として、癌、糖尿病性網膜症、動脈硬化、肥満などの悪性化に関与する血管新生に対する作用を検証することを目的とした。

【方法】血管新生促進因子vascular endothelial growth factor及びbasic fibroblast growth factorで刺激した培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)の細胞外マトリクス分解酵素 (matrix metalloproteinase-2)の産生に対するメリンジョ種子抽出物及びレスベラトロール類縁体の作用をgelatin zymography、細胞増殖をcell counting kit-8、細胞遊走をwound healing migration assay、管腔形成をコラーゲンゲルを用いた2次元血管新生モデルにより評価した。また、作用分子機序はウェスタンブロット法により解析した。さらに、腫瘍血管新生に対するメリンジョ種子抽出物の作用はマウス背部皮下法を用いて検証した。

【結果】メリンジョ種子抽出物は、複数の内皮細胞機能 (細胞増殖、遊走、管腔形成) 及び腫瘍血管新生を抑制した。また、gnetin C 及び gnemonoside D は顕著な細胞増殖抑制活性を、gnetin L 及び gnemonoside C は中程度の抑制活性を示した。Gnemonosides は管腔形成に影響を与えなかったが、gnetin C 及び gnetin L は管腔形成を顕著に抑制した。特に、gnetin C の IC_{50} 値は 2.6 μM であり、レスベラトロール(28.9 μM)と比べて、約 11 倍強い抑制活性を示した。これらの結果は、メリンジョ種子や gnetin C が癌のような血管新生異常を基本病態する疾患の予防に有用であることを示唆している(Kunimasa K, *et al.*, *Mol Nutr Food Res* 55: 1730-4, 2011)。

angiogenesis, endothelial cells, Resveratrol

講演番号：3J12p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ J校舎12会場

新規乳酸菌発酵物PS-B1のヒト前骨髄性白血病細胞HL-60に対する細胞増殖抑制作用

Growth inhibition action of a lactic acid bacteria-metabolic product against human leukemia HL-60 cells by induction of apoptosis

○野嶽 勇一、深澤 昌史、榊原 隆三（長崎国際大薬・生化）
○Yuichi Nodake, Masashi Fukasawa, Ryuzo Sakakibara (Nagasaki International Univ.)

我々は、ヒト常在乳酸菌の複合培養より調製した新規豆乳発酵物PS-B1が示す有用作用を解析している。最近になって、PS-B1が幅広いガン細胞増殖抑制スペクトルを有することを明らかにしたことから、ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60を対象としてその作用機序の解明に取り組んでいる。今回、PS-B1がアポトーシスの誘導を介してHL-60細胞の細胞増殖を抑制している可能性を示唆する結果を見出したので報告する。

まず、HL-60細胞をPS-B1（終濃度 0-2.5 mg/ml）存在下で一定時間培養し、HL-60細胞の増殖に与えるPS-B1の影響を検討した結果、PS-B1は濃度依存的にHL-60細胞の増殖を抑制した。一方、HL-60細胞の培養液中にカスパーゼ阻害剤を添加した場合、PS-B1（終濃度 500 μg/ml）が示す細胞増殖抑制作用が有意に抑制されることが明らかになった。これらの結果から、PS-B1がHL-60細胞に対してアポトーシスを誘導していることが示唆された。

通常、細胞にアポトーシスが誘導される場合の特徴として、細胞内活性酸素種量の増加、シトクロムc 等の放出に伴うミトコンドリアの不活化（膜電位の低下）、カスパーゼ群の活性化、DNAの断片化等が知られている。そこで、PS-B1を作用させたHL-60細胞を用いた分光学的解析実験を行い、PS-B1のアポトーシス誘導能に関する以下の結果を得た。①DCFH法によりHL-60細胞内の活性酸素種（H_2O_2）を定量したところ、PS-B1の濃度に比例して細胞内活性酸素種量が増大していた、②蛍光色素JC-1の細胞質への局在に起因する蛍光強度の増大が確認され、PS-B1がミトコンドリアの膜電位の低下に対しても関与していることが明らかになった、③PS-B1（終濃度 500 μg/ml）を5時間作用させたHL-60細胞では、アポトーシスの初期段階で機能するカスパーゼ-2、-8、-9が活性化されており、それらに続いて機能するカスパーゼ-3の活性も顕著に増大する傾向が見出された、④HL-60細胞のゲノムDNAをアガロース電気泳動に供したところ、DNAの断片化が観察された。

今後、PS-B1を作用させたHL-60細胞内の他のアポトーシス関連因子への影響を検討し、作用機序のより深い理解を図るとともに、PS-B1に含まれる細胞増殖抑制作用を示す生理活性物質の探索に取り組む。

Lactic acid bacteria, Growth inhibition action, Apoptosis

講演番号：3J12p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ J校舎12会場

キクイモ塊茎に含まれる抗ガン活性成分に関する研究

Research on the anticancer compounds contained in a Jerusalem artichoke tuber

○竹花 駿平、白岩 雅和（茨城大・農・食品生化）
○Shunpei Takehana, Masakazu Shiraiwa (Ibaraki Univ.)

【目的】キクイモ(*Helianthus tuberosus*)は地中に塊茎を形成するキク科ヒマワリ属の多年草であり、可食部である塊茎に豊富に含まれるイヌリンによる糖尿病緩和作用が広く知られている。最近、糖尿病保有のガン患者においてキクイモ塊茎粉末の摂取によりガン細胞の縮小・消滅が確認されたことから、キクイモに含まれる抗ガン活性成分の存在が予想された。これには、人体へのインスリン様の作用を及ぼすイヌリンの間接的な効果も予想されるが、他の植物において抗ガン活性を有することが報告されているサポニンなどの二次代謝産物がキクイモにも含まれているとの報告があるため、キクイモに含まれるイヌリン成分を除去した画分から抗ガン活性成分を探索した。

【方法】キクイモ塊茎の粉末を含水エタノールで抽出し、得られた抽出液を濃縮乾固したのちに得られた乾固物を、pH調製を行った水とブタノールに溶解させ、静置した。上記操作によりブタノール層と水層に分配し、ブタノール層を濃縮乾固して得られた画分を画分A、水層を凍結乾燥して得られた画分を画分Bとした。次に画分Aを、クロロホルム：メタノール：水＝75 ： 25 ： 10の下層に少量の酢酸を添加した溶媒を用いたアイソクラティック溶出によるシリカゲルクロマトグラフィーに供し、溶出順に5つの画分に分け、濃縮乾固して得られた画分をそれぞれ画分AA、AB、AC、AD、AEとした。続いて画分AAを、ヘキサン：酢酸エチル＝5：95の溶媒を用いたアイソクラティック溶出によるシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出順に5つの画分に分け、濃縮乾固して得られた画分をそれぞれ画分AAA、AAB、AAC、AAD、AAEとした。これら全ての画分をDMSOに溶解させ、マウス白血病P388細胞を用いた細胞増殖抑制作用を生細胞由来の酸化還元酵素量を指標として評価した。また、抗ガン作用の検証試験として断片化DNAラダー検出等によるアポトーシス誘導作用を調査した。

【結果】細胞増殖抑制作用を測定したところ、画分A（濃度62.5μg/mL）は未処置対照の細胞増殖率を100%としたとき、10%以下の細胞増殖率を示し、高い細胞増殖抑制作用を持つことがわかった。一方、画分Bにも細胞増殖抑制作用が確認できたが、画分Aのような強い活性はなく、増殖率は36%であった。続いて、画分Aをカラムクロマトグラフィーにより分画した画分ABは39%、画分ACは75%、画分ADは87%、画分AEは99%の増殖率となり、高極性成分を多く含む画分は細胞増殖抑制効果が低いことがわかった。一方、これらの画分の中で最も活性の高かった画分AAをさらに分画した画分AAA、AAB、AAC、AAD、AAEは62.5μg/mLの濃度でいずれも1%以下の増殖率を示し、強い細胞増殖抑制作用を示した。以上の結果から、これら5画分に含まれている成分をさらに分画し、細胞増殖抑制試験並びに抗ガン作用の検証試験として断片化DNAラダー検出等によるアポトーシス誘導作用について現在検討中である。

Keyword1：Jerusalem artichoke, Keyword2：anticancer, Keyword3：functional food

講演番号：3J12p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ J校舎12会場

カフェ酸とそのポリフェノール類縁体によるDNAトポイソメラーゼ阻害活性とヒトがん細胞増殖への影響

Effect of caffeic acid and the polyphenol analogs on human cancer cell growth suppression based on DNA topoisomerase inhibition

○栗山 磯子[1]、布施 佑樹[2]、西田 浩志[2]、小西 徹也[2]、吉田 弘美[1,3]、水品 善之[1,3]（[1]神戸学院大栄養・栄養、[2]新潟薬大・応用生命科学、[3]神戸学院大・LSC）

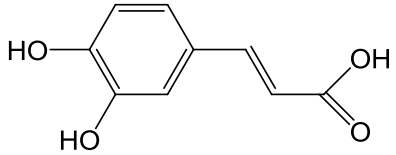
○Isoko Kuriyama[1], Yuuki Fuse[2], Hiroshi Nishida[2], Tetsuya Konishi[2], Hiromi Yoshida[1,3], Yoshiyuki Mizushina[1,3]（[1]Kobe-Gakuin Univ., Dept. of Nutr. Sci., [2]Niigata Univ. of Pharm. and Appl. Life Sci., [3]Kobe-Gakuin Univ., LSC）

【目的】カフェ酸（Caffeic acid, CA）【図１】はコーヒーに含まれているポリフェノールの一種で、コーヒー豆を煎ることによってクロロゲン酸から分解されて生成する。CAを中心とするポリフェノール類縁体７物質を準備して、DNA代謝系酵素群に対する阻害活性とヒトがん細胞に対する増殖への影響を調査した。

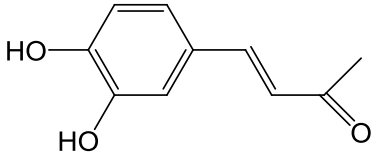
【方法】カフェ酸系のポリフェノール類縁体として、CAの他に3,4-Dihydroxybenzalacetone（DBL）、Protocatechuic acid（PCA）、3,4-Dihydroxy-benzaldehyde（DB）、Gallic acid（GA）、Syringic acid（SA）、2,5-Dihydroxy-terephthalic acid（DTA）の７物質を準備した。ヒトDNAトポイソメラーゼIとII（topo I, II）は、常法によりNicking/Catalytic活性を測定した。その他のDNA代謝系酵素は、哺乳類DNAポリメラーゼ群、HIV逆転写酵素、T7 RNA ポリメラーゼ、マウスIMPデヒドロゲナーゼ(type II)、T4ポリヌクレオチドキナーゼ、牛DNA分解酵素Iを用いた。ヒト大腸がん細胞（HCT116 cells）増殖抑制活性はWST-1法で測定した。細胞周期はヨウ化プロピジウム（PI）で細胞核を染色後、フローサイトメーターで解析した。

【結果】上記の７物質（100μM）において、DNAの二本鎖切断を伴ってDNAのねじれを巻き戻すtopo IIの活性を阻害したのは、CA、DBL、PCA、GA、DTAであった。特に強いtopo II阻害活性を示したのは、CA【図１】とDBL【図２】であった。一方、これら７物質は100μMでtopo Iを阻害しなかった。また、その他のDNA代謝系酵素に対しても阻害活性を示さなかった。

カフェ酸系ポリフェノール類縁体７物質（100μM）において、ヒト大腸がん細胞増殖抑制活性を示したのは、CA、DBL、GAであり、特にCAとDBLに強い活性があったことから、topo II阻害活性との相関が示唆された。CAとDBLのヒト大腸がん細胞の細胞周期への影響を解析した結果、いずれもG2/M期で停止した。これらの結果から、CAとDBLのヒトがん細胞増殖への影響は、topo II阻害活性に起因すると考えられる。



【図１】Caffeic acid（CA）



【図２】3,4-Dihydroxybenzalacetone（DBL）

Caffeic acid, 3,4-Dihydroxybenzalacetone, Anti-cancer activity

講演番号：3J12p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ J校舎12会場

タイトル　酵母を用いたシドケ由来の抗癌活性物質エンドパーオキサイドの作用機序

Title　Action mechanisms of an anti-tumor substance endoperoxide isolated from *Cacalia delphiniifolia* in budding yeast

○今村　優子、汐谷　充博、木村　賢一[1]、湯川　格史、土屋　英子（広島大院先端物質・分子生命、[1]岩手大院・農）

○ Yuko Imamura, Atsuhiro Shiotani, Ken-ichi Kimura[1], Masashi Yukawa, Eiko Tsuchiya (Grad. Sch. Adv. Sci. Matt., Hiroshima Univ., [1]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ.)

【目的】

北東北地方で山菜として食されているシドケ（モミジガサ）に含まれる、ビサボラン型セスキテルペンのエンドパーオキサイド化合物である3,6-epidioxy-1,10-bisaboladine(EDBD) は、動物レベルで抗癌活性を有する。EDBDは、急性前骨髄性白血病細胞HL60に対してアポトーシスによる細胞増殖抑制効果を示し、それはFe^{2+}存在下で変化したラジカル体によることが示唆されているが、その詳細な作用機序は不明なままである。そこで、本研究では出芽酵母を用いたEDBDの細胞内分子標的の同定、及びその作用機序の解明を目的としている。

【方法及び結果】

まず、EDBDの生育への影響を調べたところ、濃度依存的に酵母検定菌の生育を阻害し、その50%阻害値IC_{50}は4μMであった。次に、EDBDの作用時期を調べるために、EDBDの最少有効濃度50μM添加後にFACS解析を行った結果、G1期とG2期の細胞の蓄積が見られ、S期の細胞が減少していた。ゆえに、EDBDはG1期とG2期の両方に作用していると考えられた。

EDBDの構造的な有意性を検証するために、二種類の構造類似体アルテミシニンとα-クルクメンとの比較を行った。アルテミシニンはエンドパーオキサイド構造を活性中心としてもち、ミトコンドリアの電子伝達系を阻害する。アルテミシニン添加では、EDBDで見られた生育阻害効果が観察されなかった。しかし、EDBDと同じ基本骨格をもつがエンドパーオキサイド構造を欠くショウガオイル由来のα-クルクメンとの作用を比較したところ、EDBDよりは弱いものの若干の生育阻害効果が確認された。ゆえに、EDBDの作用はエンドパーオキサイド構造を含む全体の基本構造が重要であるといえる。

EDBDは細胞周期特異的に作用することが明らかになったため、細胞周期の進行に必須なG1サイクリンであるCln2の蛋白量を調べたところ、EDBD添加により顕著なCln2蛋白量の低下が観察された。また、G2サイクリンであるClb2の蛋白量を調べた結果、EDBD添加により約50%程度減少していたが、その後一定に保たれていた。ゆえに、EDBDのG1期における作用はCln2の発現又は分解を介して制御されている可能性が示唆された。EDBDのCln2に対する効果が転写制御を介しているかを調べるために、EDBD添加後のCln2のmRNA量をReal-time PCRを用いて測定した。EDBD添加後のCln2のmRNA量は顕著に減少したことから、EDBDはCln2の転写を阻害することによりG1期からS期への進行を阻害すると考えられた。

endoperoxide, anti-tumor, cyclin

講演番号：3J12p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ J校舎12会場

メチルチオ酢酸のマウス皮膚二段階発がんモデルにおける抑制作用

Inhibitory effects of methylthio acetic acid in two-stage carcinogenesis model of mouse skin

○武田 和哉、中村 考志、青井 渉、朴 恩榮、佐藤 健司、松尾 友明[1]、岡本 繁久[1]、重田 友明[1]、鈴木 信孝[2]、徳田 春邦[2]（京府大・生環、[1]鹿大・農、[2]金大・医）

○Kazuya Takeda, Yasushi Nakamura, Wataru Aoi, Eun Young Park, Kenji Sato, Tomoaki Matsuo[1], Shigehisa Okamoto[1], Tomoaki Shigeta[1], Nobutaka Suzuki[2], Harukuni Tokuda[2]（Kyoufudai, [1]Kadai, [2]Kanazawadai）

【目的】京都の伝統野菜の桂ウリは完熟過程で3-メチルチオプロピオン酸エチル（MTPE）を生成し，メロン様の香気をもつようになる．MTPEはヒト大腸がん細胞であるRCM-1細胞を用いた*in vitro*のダクト形成試験法で分化誘導作用をもつことを示した．しかし，MTPEは分化誘導作用を示すには高濃度（ED_{50}=0.71 mM）が必要であったため，MTPEをリード化合物として，より低濃度で作用する物質を探索し，メチルチオ酢酸（MTA，ED_{50}=0.13 mM）を得た．MTAはヒトがん細胞の分化誘導作用をもつことから，動物の発がんに対しても抑制効果を示すことを期待し，マウス皮膚二段階発がんモデルにおけるMTAの発がん抑制作用を検討した．

【方法】6週齢の雌性ICR マウスの背部に発がんイニシエーターとしてジメチルベンズアントラセン（DMBA）を塗布した1週間後から発がんプロモーターとしてホルボールエステルであるTPAを背部に週2回，20週間塗布した．TPA 塗布の前後にアセトンを背部に塗布したアセトン対照群と，TPA 塗布の前にアセトンに溶解したMTA を同部位に塗布したMTA前投与群と，TPA 塗布の後にアセトンに溶解したMTA を同部位に塗布したMTA後投与群の3つの群に各10匹の計30匹を割りあてた. TPA 塗布開始後20週目まで1週間毎にパピローマの発生したマウスの匹数とマウス1匹あたりの背部に発生したパピローマ数をアセトン対照群とMTA前投与群，MTA後投与群間で比較した．同様に，MTA（1.0 mg/ml）を飲水として自由摂取させた場合でも抑制作用を検討した．

【結果】パピローマの発生したマウスはアセトン対照群では6週目から出現しはじめたが，MTA前投与群では7週目，MTA後投与群では9週目から出現しはじめた．群内すべてのマウスにパピローマが発生した週は，アセトン対照群では10週目であったが，MTA前投与群では15週目，MTA後投与群では17週目であり，MTAはパピローマの発生遅延効果を示すことが明らかとなった．また20週目にマウス1匹あたりの背部に発生したパピローマ数は，アセトン対照群で8.5個，MTA前投与群で7個，MTA後投与群で5.8個であり，MTAはパピローマの発生遅延効果だけでなく発生個数の抑制効果ももつことが明らかとなり，それらの効果はTPA塗布の後にMTAを投与することにより高まると考えられた．MTAを経口摂取させた場合では，パピローマの発生したマウスは対照群では8週目から出現しはじめたが，MTA群では10週目であった．20週目にマウス1匹あたりの背部に発生したパピローマ数は，対照群で3.4個，MTA群で2.2個であり，MTAを塗布した場合だけでなくMTAを経口摂取させた場合でもパピローマの発生遅延効果と発生個数の抑制効果を示した．

cancer, tumor, melon

講演番号：3J12p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ J校舎12会場

褐藻類アントクメの前立腺肥大抑制作用

Suppressed Effect of *Ecklominiopsis radicosa* on Prostate Gland Enlargement in mice.

○山中典子、呉静[1]、伏見圭司[1]、西本壮吾、中村健一郎、小山智之、河岸洋和[1,2]、矢澤一良(東京海洋大院、[1]静大院・創造、[2]静大農・応生化)

○Noriko Yamanaka, Jing Wu[1], Keiji Fushimi[1], Sogo Nishimoto, Kenichiro Nakamura, Tomoyuki Koyama, Hirokazu Kawagishi[1,2], Kazunaga Yazawa(Tokyo University of Marine Science and Technology, [1]Educational Division, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

【目的】近年、男性型更年期障害への関心は高まっているが、これらの症状を予防もしくは改善することが期待できる食品素材の選択肢はまだ少ない。代表的な男性型更年期障害の一つに、前立腺肥大症がある。加齢に伴い、前立腺の肥大が起こると尿道圧迫による頻尿など排泄障害が生じ、QOLの著しい低下に繋がる。本研究では、前立腺肥大抑制に寄与しうる食品素材の探索を目的とし、天然物を対象にスクリーニングを実施した。その結果、褐藻類のアントクメに前立腺肥大抑制作用を示す成分が含まれていることが示唆された。
【方法】まずddYマウス（7週齢、雄性）に去勢手術を施し、前立腺萎縮マウスを作製した。作製したマウスにTestosterone propionate（TP）を腹腔内投与し、人為的に前立腺肥大を惹起させた前立腺肥大モデルマウスを作製し、実験に使用した。10日間、TP腹腔内投与に加え、アントクメ抽出物を経口投与したマウスの前立腺長径及び短径、精嚢腺重量を測定した。
【結果】TP投与のみ行ったマウスの肥大した前立腺と比較して、アントクメ抽出物を投与したマウスでは、前立腺の長径及び短径を有意に縮小することが明らかとなった。加えて、精嚢腺重量においても有意な減少が認められた。
【考察】アンドロゲン依存組織である前立腺及び精嚢腺に効果が認められたことから、アントクメ抽出物には、前立腺肥大に対する抑制活性である抗アンドロゲン作用を示す成分を含有していると考えられる。現在、前立腺肥大抑制作用を示す活性成分の同定を進めており、将来、アントクメに含有する抗アンドロゲン作用を示す活性成分は、男性型更年期障害の改善を期待できるヘルスフード素材の一候補となりうる。

prostate gland enlargement, *Ecklominiopsis radicosa*, health foods

講演番号：3J12p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ J校舎12会場

クルクミン誘導体のアリール炭化水素受容体の抑制作用に対する定量的構造活性相関解析

Quantitative structure-activity relationships of suppressive effects of curcumin derivatives on aryl hydrocarbon receptor.

○福田　俊[1]、川瀬　雅也[2]、水品　善之[3]、芦田　均[1]（[1]神戸大院・農、[2]長浜バイオ大・バイオ、[3]神戸学院大・栄養）

○Shun Fukuda[1], Masaya Kawase[2], Yoshiyuki Mizushina[3], Hitoshi Ashida[1], ([1]Kobe University, [2]Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [3]Kobe-Gakuin University)

【目的】クルクミンはカレー粉の原料となるターメリックに含まれる黄色色素であり、抗酸化性をはじめとして多くの機能性が報告されている。われわれはこれまでにターメリックに含まれるクルクミンがダイオキシン毒性の初発段階を担うアリール炭化水素受容体（AhR）の活性化を抑制することを明らかにした[1)]。本研究では、芳香環の側鎖の置換や主鎖にメチル基を結合させた26種類のクルクミン誘導体がAhRの活性化に及ぼす影響を検討した。AhRは細胞質中で複合体を形成して安定な状態で存在しているが、ダイオキシン類などのリガンドが結合するとAhR複合体は構造変化を起こし活性化する。活性化したAhRは核内に移行して転写因子としてDNA上のエンハンサー領域に結合し、cytochrome P4501A1（CYP1A1）などの薬物代謝酵素を誘導する。そこで、クルクミン誘導体がAhRの活性化に及ぼす影響をAhRとDNAの結合活性とその下流のCYP1A1の酵素活性を反映するethoxyresorufin-*O*-deethylase（EROD）活性を測定することで検討した。

【方法】マウス肝がん由来Hepa-1c1c7細胞に10 ・Mクルクミンおよびその誘導体とダイオキシン類である0.1 nM 2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン（TCDD）とを処理し、AhRのDNAへの結合活性、およびEROD活性を測定した。クルクミン誘導体の構造とそのDNA結合抑制作用とについては定量的構造活性相関（QSAR）により解析した。

【結果】クルクミン誘導体は、TCDDによって誘導されたAhRのDNA結合活性とEROD活性の両方を抑制した。また、クルクミン誘導体によるAhRのDNAへの結合活性とEROD活性の抑制作用は誘導体の構造により異なっていた。すなわち、QSARの解析結果から、クルクミンの芳香環の側鎖がヒドロキシ基でないことと、主鎖がメチル基を持つことが抑制作用に重要であることが示された。また、オクタノール/水分配係数（log*P*）を算出したところlog*P*が高い化合物は抑制作用も高い傾向を示した。これらの結果より、クルクミン誘導体は、疎水性に依存してAhRの活性化を抑制することが示された。

1) S. Nishiumi *et al.*, *Arch. Biochem. Biophy,* 466,267-273, 2007

Aryl hydrocarbon receptor, Curcumin, Quantitative structure-activity relationships

講演番号：3J13a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ J校舎13会場

異なる分子量の食品ペプチドがカルシウム感知受容体を介したCholecystokinin分泌を誘導する

Dietary peptides which have various molecular weight induce calcium-sensing receptor-mediated cholecystokinin secretion

○中島　進吾、比良　徹、原　博（北大院農）
○Shingo Nakajima, Tohru Hira, Hiroshi Hara (Grad Sch Agr Hokkaido Univ)

【背景と目的】消化管ホルモンCholecystokinin (CCK)は、胃排出遅延、食欲抑制、膵酵素分泌亢進などの作用をもち、管腔内の栄養素刺激により、消化管内に散在するCCK産生細胞（I cells）から分泌される。食品ペプチドは、CCK分泌の主要な刺激因子の一つとして知られているが、CCK産生細胞における、その認識機構は解明されていない。我々は、CCK産生細胞株を用いて、種々の食品ペプチドによるCCK分泌において、カルシウム感知受容体{Calcium-sensing receptor (CaSR)}が関与することを見いだした。その中で、特に小豆、および大豆βコングリシニン由来の加水分解物が、CaSRを介したCCK分泌を強く刺激することが明らかとなった。ここでは、これら2つの加水分解物を用いて、CaSRに作用する食品ペプチドの特性を検討した。
【方法】小豆、および大豆 β コングリシニンの加水分解物は、10 分間のペプシン処理により作製した。ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、これらの加水分解物の分子量分画を行い、得られた画分の CCK 分泌活性を評価した。
＜CCK 分泌試験＞マウス小腸由来 CCK 産生細胞株 STC-1 を、48-ウェルプレートで 48 時間培養した。HEPES ベースのバッファーで洗浄後、CaSR アンタゴニスト共存下で各種加水分解物およびその分画物に 60 分間暴露し、上清中に放出された CCK を ELISA により定量した。
【結果と考察】小豆およびβコングリシニン加水分解物中の、CCK分泌を刺激するペプチドは、様々な分子量画分に分散していた。どちらの加水分解物も、ペプチド含量のもっとも高い画分（小豆加水分解物：分子量約600～2900、βコングリシニン加水分解物：分子量約1700～4100）のCCK分泌活性が最も高かった。小豆加水分解物においては、比較的低分子の画分によるCCK分泌が、CaSRアンタゴニスト処理により減少した。βコングリシニン加水分解物においては、画分の分子量に関わらず、CaSRアンタゴニスト処理によりCCK分泌が減少した。これらの加水分解物中には、遊離アミノ酸はほとんど含まれておらず、その寄与は低いものと考えられた。以上より、CaSRは、食品由来の様々な分子量を持つペプチドを認識してCCK分泌を誘導することが示唆された。

Calcium-sensing receptor, dietary peptide, cholecystokinin

講演番号：3J13a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ J校舎13会場

CCK依存的動脈弛緩ジペプチドArg-Pheの摂食および消化管運動抑制作用

Arg-Phe, a CCK-dependent vasorelaxing peptide, decreases food intake and gut motility

○影林 皆美、紺谷　徳泰、山田　優子、大日向　耕作（京都大・農）
○Tomomi Kagebayashi, Noriyasu Kontani, Yuko Yamada, Kousaku Ohinata (Kyoutodai)

【目的】最近我々は、高血圧自然発症ラット(SHR)の摘出腸間膜動脈において、ジペプチドArg-Phe(RF)が強力な動脈弛緩作用(EC_{50}=0.58 μM)を有することを発見した[1]。本ジペプチドは食品タンパク質の酵素消化だけでなく、L-アミノ酸リガーゼを用いてフリーのアミノ酸から直接合成することも可能である。さらにRFの動脈弛緩作用は、従来の弛緩因子ではなく、食後の飽食因子として知られているコレシストキニン(CCK)遊離を介すること、およびCCK依存的な血圧降下作用を示すこと、を明らかにした。したがって、CCK自身は血圧降下と摂食抑制作用の両作用に寄与することがわかった。一方、メタボリックシンドロームではCCKシグナルが低下することが知られている。そこで本研究ではRFがCCK様作用、すなわち、摂食抑制作用ならびに消化管運動抑制作用を示すかを検討した。さらに、腸内分泌細胞を用いてRFのCCK分泌能について検討した。
【方法】実験動物として7週齢雄性ddYマウスを用いた。摂食実験では、18時間絶食したマウスにRFを腹腔内投与し、予め重量を測定した固形飼料を与え、経時的に重量を測定し、摂食量を算出した。消化管運動に及ぼす影響はsmall intestinal transitで評価した。同様に18時間絶食後、RFを経口投与し30分後に色素を添加した試験食を経口投与した。その5分後に小腸を摘出し色素の移動距離を測定し、移動率を計算した。また、マウス十二指腸由来CCK産生細胞STC-1を用いてRFに対する反応性を検討した。カルシウム蛍光指示薬Fluo-4を用いて蛍光強度変化を測定し細胞内Ca^{2+}変化を測定した。また、培地上清中のCCK濃度をELISA法で測定した。
【結果】RF（10 mg/kg）を腹腔内投与したところ、投与後60分と120分において有意な摂食量の低下が認められ、RFが摂食抑制作用を示すことが判明した。さらに、small intestinal transitを検討したところ、RF（100 mg/kg）の経口投与により色素移動率が低下し、消化管運動抑制作用を有することが明らかとなった。いずれの場合もCCK様作用を示すことから、次に、CCK分泌作用を*in vitro*評価系で確認した。STC-1細胞に対しRFを添加したところ細胞内Ca^{2+}が用量依存的に上昇し、RFが腸内分泌細胞を活性化することがわかった。さらに、その培地上清中のCCKを測定したところ、実際にCCK濃度が上昇していることが判明した。これらのことから、RFは腸内分泌細胞に作用してCCKの分泌を促進し、摂食および消化管運動を抑制する作用を示すと考えられる。
　以上、RFは、動脈弛緩および血圧降下作用に加え、摂食抑制および消化管運動抑制作用を併せ持つ多機能性ペプチドであることが明らかになった。

[1]2011年度農芸化学会大会

dipeptide, food intake, CCK

講演番号：3J13a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ J校舎13会場

プロバイオティクス乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* OLL2716 はマウス胃体部における Hsp70 発現を促進し、NSAIDs による胃損傷発生を抑制する

Probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 induces gastric expression of Hsp70 in mouse and suppress the formation of indomethacin-induced gastric lesions.

○石田 達也、横山 峰彦、髙林 卓也、小山 里美、本目 佳子、樋口 智子、古賀 泰裕[1]、浅見 幸夫（株式会社 明治　研究本部・食機能科学研究所、[1]東海大学・医学部）

○Tatsuya Ishida, Minehiko Yokoyama, Takuya Takabayashi, Satomi Koyama, Yoshiko Honme, Satoko Higuchi, Yasuhiro Koga, Yukio Asami (Food Science Research Labs. R&D Div. Meiji Co., Ltd., [1]Tokai University School of Medicine)

【目的】

非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）は疼痛、発熱、炎症の治療に広く用いられているが、一方で消化性潰瘍などの胃腸障害をはじめとする、腎機能障害、血小板機能の阻害などの副作用も多く出現することも知られている。そのメカニズムとして胃においては NSAIDs の粘膜組織に対する直接的な障害がその一因として考えられているが、細胞保護効果を有する熱ショックタンパク質、Hsp70 を事前に発現誘導させることによりその障害発生が抑制されることが報告されている。プロバイオティクス乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* OLL2716 株を含有するヨーグルトは塩酸誘発した急性胃損傷や幽門洞潰瘍に対する保護作用のあることが明らかにされている。本研究ではプロバイオティクス乳酸菌 OLL2716 株による Hsp70 発現誘導及び NSAIDs による胃損傷発生の抑制効果について検討した。

【方法】

OLL2716 株をヒト胃腺がん AGS 細胞と 24 時間共培養し、AGS 細胞に対する HSPA1A 遺伝子の発現促進を q-PCR 法により検討した。*In vivo* に関してはマウス（C57BL/6、雌、8 週齢）に対して OLL 2716 株を経口投与し、その 1、2、4 時間後にインドメタシンを経口投与して胃損傷を誘発させた。インドメタシン投与 8 時間後に解剖を行い、HSPA1A 転写量、Hsp70 発現量及び誘発された胃損傷の程度を調べた。

【結果】

In vitro において *Lactobacillus gasseri* OLL2716 株に高い HSPA1A 遺伝子発現促進作用が確認された。一方、その他の菌株についてはほとんど誘導が認められなかった。*In vivo* においては *L. gasseri* OLL2716 投与2時間後、4時間後にインドメタシンを投与した群において有意な HSPA1A の上昇が確認された。胃損傷の程度をスコア化して比較したところ、HSPA1A の上昇が認められた投与 2 時間後、4 時間後の群において胃損傷スコアの減少が有意に認められた。従って、*Lactobacillus gasseri* OLL2716 は NSAIDs による胃損傷発生を抑制することが明らかとなり、その抑制のメカニズムのひとつとして、Hsp70 誘導が考えられた。

Lactobacillus gasseri, NSAIDs, Hsp70

講演番号：3J13a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ J校舎13会場

Bifidobacterium bifidum BF-1株のヒト胃粘膜への接着性の検討

The adhesion of *Bifidobacterium bifidum* strain BF-1 to the human gastric mucosa

○五味 淳、曽根 春恵、狩野 光芳、宮﨑 幸司、野中 千秋[1]、渡邉 治[1]、吉岡 真樹[1]、大草 敏史[2]（ヤクルト中研、[1]ヤクルト本社、[2]東京慈恵会医科大学附属柏病院）
○Atsushi Gomi, Harue Shibahara-Sone, Mitsuyoshi Kano, Kouji Miyazaki, Chiaki Nonaka[1], Osamu Watanabe[1], Masaki Yoshioka[1], Toshifumi Ohkusa[2]
(Yakult Central Institute for Microbiological Research, [1]Yakult Honsha, [2]Kashiwa Hospital The Jikei University School of Medicine)

【緒言】*B. bifidum* BF-1 株（以下、BF-1 株）は、培養胃上皮細胞系での *H. pylori* 感染による炎症性サイトカイン IL-8（Interleukin-8）産生に対する抑制作用[1)]、ラットでの塩酸エタノールによる胃傷害に対する抑制作用[2)]を有している。また、BF-1 株（10 億個以上）の乳酸菌飲料（以下、被験飲料）の継続飲用は *H. pylori* の活性抑制作用や胃の炎症マーカーである PGⅡ（Pepsinogen Ⅱ）の上昇抑制を示した[1)]。さらに、BF-1 株は培養胃上皮細胞、豚ムチンおよびラット胃粘膜への接着性が高い[3)]ことから、上記の胃傷害軽減作用に接着性が関与する可能性が示唆されている。そこで、今回は被験飲料飲用後のヒト胃内での BF-1 株の生残性と胃粘膜への接着性について検討した。

【方法】健常成人を対象に、被験飲料 100 ml を空腹時に飲用させた後、内視鏡下で胃生検サンプルを採取し、培養法と定量的 RT-PCR 法でヒト胃粘膜組織中の BF-1 株の菌数を測定した。さらに、組織切片を作成し、FISH（Fluorescence In Situ Hybridization）法を用いてヒト胃粘膜組織に BF-1 株が接着しているかどうかを調べた。

【結果】被験飲料飲用 1、2 時間後のヒト胃粘膜組織から培養法および定量的 RT-PCR 法で BF-1 株が検出された。また、FISH 法で胃粘膜組織への BF-1 株の接着が観察された。

【結語】BF-1 株は生きてヒト胃粘膜に接着し、ヒトにおいても有益な作用をもたらす可能性が示唆された。

【参考文献】

1）Miki *et al*, J Dairy Sci, 90:2630-2640, 2007
2）五味他 日本農芸化学会講演要旨集 2010 年度大会 p182
3）曽根他 日本農芸化学会講演要旨集 2010 年度大会 p182

Bifidobacterium bifidum BF-1, human gastric mucosa, adhesion

講演番号：3J13a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ J校舎13会場

Lactobacillus pentosus S-PT84 株によるラットの脂質代謝改善効果

Lactobacillus pentosus S-PT84 improves lipid metabolism in rats fed a high-fat diet

○周　涌衛、井上　奈穂、都築　毅、池田　郁男、前川　敏宏[1]、出雲　貴幸[1]、井田　正幸[1]、中村　淳一[1]、北川　義徳[1]、柴田　浩志[1]（東北大院農・食品化学、[1]サントリーウエルネス（株）・健康科学研究所）

○Zhou Yongwei, Inoue Nao, Tsuduki Tsuyoshi, Ikeda Ikuo, Maekawa Toshihiro[1], Izumo Takayuki[1], Ida Masayuki[1], Nakamura Junichi[1], Kitagawa Yoshinori[1], Shibata Hiroshi[1] (Food and Biomolecular Science, Tohoku University; [1]Institute for Health Care Science, Suntory Wellness limited)

【目的】これまでの研究で、*Lactobacillus pentosus* S-PT84 株は高い免疫賦活作用を有することが確認されている。また、昨年の本学会においてヒトおよびマウスにおける体脂肪低減効果を報告している。このような背景を下に、本研究では、高脂肪食を与えたラットにおける *Lactobacillus pentosus* S-PT84 株の脂質代謝および食後高トリアシルグリセロール（TAG）血症の改善作用を検証した。

【方法】実験 1：4 週齢の SD 系雄性ラットを 1 週間の予備飼育後、高脂肪食群（20%ラード食）、0.25% S-PT84 群（20%ラード食+0.25% S-PT84 株）および 1% S-PT84 群（20%ラード食+1% S-PT84 株）の 3 群に分け、それぞれの飼料を 3 週間摂食させた。飼育最終日に平均 7 時間絶食させ、腹部大動脈採血により屠殺した。摂食量と体重増加量は 2 日ごとに測定し、糞は屠殺 5 日前に採取した。

実験 2：8 週齢の雄性 SD 系ラットを用いた。1 週間の予備飼育後ラットを 12 時間絶食し、S-PT84 株を含む脂肪エマルション（200mg/10mL/kg B.W.）をカテーテルで胃内投与した。コントロール群では S-PT84 を添加しない脂肪エマルションを投与した。投与前と投与 1、2、3、4、6、8 時間後に尾静脈から採血し血清 TAG 濃度を測定した。

【結果】実験 1：1% S-PT84 群では、高脂肪食群に比べて血清および肝臓 TAG 濃度が有意に低く、0.25% S-PT 群では低下傾向であった。1% S-PT84 群において高脂肪食群および 0.25% S-PT84 群に比べて肝臓のアシル CoA オキシダーゼ（ACO）活性は高かった。糞中脂肪酸排泄率は、3 群間に差が認められなかった。実験 2：S-PT84 添加群においてコントロール群に比べて投与後 2 および 3 時間目の血清 TAG 濃度は有意に低かった。

以上の結果より、*Lactobacillus pentosus* S-PT84株は高脂肪食摂取時のラットの脂質代謝を改善させることが示された。

Lactobacillus pentosus S-PT84, lipid metabolism, rats

講演番号：3J13a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ J校舎13会場

日常飲酒者の血清GGTに対する*Lactobacillus brevis* SBC8803株の影響

Effect of *Lactobacillus brevis* SBC8803 on Gamma-Glutamyl Transferase in Japanese Habitual Drinkers

○脇田 義久、清水 千賀子[1]、中北 保一、金田 弘拳[1]、神田 一、瀬川 修一、執行 達朗、大竹 孝明[2]、藤谷幹浩[2]、高後 裕[2]（サッポロビール・価値創造フロンティア研究所、[1]サッポロホールディングス・食品開発IC、[2]旭川医科大学・内科学講座）

○Yoshihisa Wakita, Chikako Shimizu[1], Yasukazu Nakakita, Hirotaka Kaneda[1], Hajime Kanda, Shuichi Segawa, Tatsuro Shigyo, Takaaki Ohtake[2], Mikihiro Fujiya[2], Yutaka Kohgo[2] (Sapporo Breweries Ltd, [1]Sapporo Holdings Ltd, [2]Asahikawa Medical University)

【目的】我々は*Lactobacillus brevis* SBC8803株がエタノール投与マウスの血清AST、ALTの上昇および脂肪肝形成の形成を抑制することを報告[1)]している。今回、SBC8803株を日常飲酒者に経口投与することにより、アルコールの負の側面を緩和できないか検討したので報告する。

【方法】SBC8803株を約400億CFU含むカプセルを調製し、これを含まないカプセルを対照とし、20歳以上64歳以下のほぼ毎日飲酒習慣のある者（週5～7回）でGGTが50以上100 IU/L以下程度の者を対象として、二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を8週間にわたり実施した。事前検査における臨床検査などに基づいて試験参加に適格な被験者64名を選択して摂取を開始し、脱落1名、除外者18名を除く45名を有効性評価対象者とした。

【結果】AST、ALTは4週、8週目において群間で有意な差は認められなかった。GGTでは、4週目において、プラセボ群と比較し試験食品摂取群で有意に低い値を示した（p=0.017）。8週目においては群間で有意な差は認められなかったが、プラセボ群では事前検査値と比較し有意に上昇したのに対し、試験食品群では有意な上昇は認められなかった。血清中性脂肪では、群内比較において試験食品群で低下する傾向が認められた。さらに、男性での層別解析を行った結果、4週目において事前検査値と比較し有意に低い値を示した。以上の結果から、SBC8803株の摂取により、アルコール摂取の負の側面を緩和する可能性が示唆された。

1) Segawa *et al. Int. J. Food Microbiol.* 2008

Lactobacillus brevis, g-glutamyl transferase, adverse effect of alcohol

講演番号：3J13a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ J校舎13会場

かつおだし単回摂取のヒト胃運動および満腹感に対する効果

Effects of dried-bonito *dashi* (a traditional Japanese fish stock) on gastric myoelectrical activity and satiety in young healthy volunteers

○松永 哲郎、種村　一識[1]、山崎　英恵、津田　謹輔[1]、近藤 高史（京大院・農・食の未来戦略、[1]京大院・人間環境学）

○Tetsuro Matsunaga, Kazushi Tanemura[1], Hanae Yamazaki, Kinsuke Tsuda[1], Takashi Kondoh (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [1]Grad. Sch. Hum. Environ. Studies, Kyoto Univ.)

【目的】かつおだしは古くから日本料理に用いられており、疲労感の回復、肌状態の改善、血流の改善、高血圧抑制などの様々な有効性が報告されている。一方で、消化管機能および空腹感・満腹感に対する作用は明らかにされていない。そこで本研究では、若年健常者を対象に、かつおだしの単回摂取が胃運動および空腹感・満腹感に与える効果を、胃電図解析とVAS（Visual analogue scale）法により評価した。

【対象】健常な若年日本人男性（21.5±0.5歳） 19名

【方法】被験者は前日22時より絶食とした。試験食として、「本造り一番だし」かつお（味の素株式会社製）を用い、50℃に加温、摂取量は150 mlとした。対照食には水（デキストリンまたは食塩にて熱量、塩分量をかつおだしと同等に調整したもの）を用いた。試験は異なる3日間の無作為割付クロスオーバーデザインで午前中に実施した（室温25℃）。測定姿勢は仰臥位とした。胃運動は試験食摂取前（空腹時）と試験食摂取後の各20分間の胃電図解析により評価した。また、空腹感および満腹感を、VAS法にて空腹時、摂取直後および摂取35分後の3回評価した。

【結果】

(1) かつおだし摂取により、摂取10-20分後の胃電図の正常波成分パワーが、対照食と比べて有意に高値を示した。また、胃電図パワースペクトルの全パワーに占める正常波成分比率においても、かつおだし摂取後は対照食に比べて有意に高値であった。

(2) VAS法の結果から、かつおだしは、対照食と比べて摂取35分後の「満腹感」スコアが有意に高かった。

【結論】かつおだしには胃運動促進および満腹感増大効果があることが示唆された。

dried-bonito *dashi*, gastric myoelectrical activity, satiety

講演番号：3J13a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ J校舎13会場

ウシ後期初乳中の腸細胞増殖に関わる活性成分の検討

Effect of bovine colostrums protein fraction on intestinal cell

○Cairang zhuoma[1)]，村西晴香[2)]，xijir[1)]，稲垣瑞穂[2)]　内田健志[3)]，川西貴[3)]，齋藤正一郎[4)]，矢部富雄[1,2)]，金丸義敬[1,2)]　([1)]岐阜大院・連農・生資科，[2)]岐阜大院・応生・資源生命，[3)]小林製薬（株）・中研，[4)]岐阜大・応生・獣医）

○CAIRANGZHUOMA[1)],Haruka MURANISHI[2)],xijir[1)], Mizuho INAGAKI[2)],Kenji UCHIDA[3)],Kawanishi TAKASHI[3)],Shouichiro SAITO[4)],Tomio YABE[1,2)],Yoshihiro KANAMARU [1,2)]. ([1)] United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, [2)] Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, [3)] Central R&D Laboratory, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd., Ibaraki, [4)]Applied Biological Sciences, Gifu University)

【目的】我々は、これまでにウシ後期初乳（分娩後6,7日目乳）が薬剤により引き起こした腸損傷の予防及び回復促進効果を有することを認めている。そこで本研究では、後期初乳中の活性成分を調べることを目的とした。

【方法及び結果】6週齢のBALB/cの雌マウスに後期初乳カゼイン画分とホエイ画分を一週間自由摂取させ(50ml/mouse/day)、腸組織細胞に与える影響をin vivoで観察した。各処理群の小腸組織を採取し、HE染色とPCNA免疫染色を行った結果、コントロールとした水群に比較すると後期初乳カゼイン画分は腸組織細胞促進効果を有することが示唆された。次に、in vitroにおいて、更にカゼイン画分中の活性成分を追究するため、疎水クロマトグラフィ-により、カゼイン画分を分画した。IEC-6細胞を用い、無血清培地で培養した細胞をコントロールとして、各カゼイン画分の細胞増殖促進効果を調べた。その結果、αs1-カゼイン（1mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml)のみが有意に細胞増殖促進に有効であることが認められたことから、腸組織細胞を促進させる活性成分はαs1-カゼインであると考えられる。

Keywords:bovine, colostrum, proten

講演番号：3J13a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ J校舎13会場

ナリンゲニンによる大腸バリア機能保護作用と炎症抑制作用は、他のポリフェノール（ケルセチン、クルクミン、ヘスペレチン）よりも強い

Naringenin protects epithelial barrier in a murine model of colitis.

重白 みづき、野田 咲乃、田辺 創一、〇鈴木 卓弥（広大院・生物圏）
Mizuki Shigeshiro, Sakino Noda, Tanabe Soichi, 〇Takuya Suzuki (Hiroshima Univ)

【目的】消化管バリア機能の低下は、管腔内異物の体内への侵入、過剰な免疫応答を引き起こし、各種の消化管疾患の発症・病態に深く関連する。また、このバリア機能を担う最も重要な構造の１つに、上皮細胞間経路の透過性を制御するタイトジャンクション（TJ）構造が知られている。これまでに我々は、いくつかのポリフェノールが消化管上皮TJバリア機能を高めることを、ヒト消化管上皮Caco-2細胞やラットにおいて示してきた。今回は、Caco-2細胞（実験１）とデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発大腸炎モデルマウス（実験２）を用い、ポリフェノール類による消化管バリア機能、消化管炎症への影響を評価することを目的とした。
【方法】実験１：Caco-2細胞の粘膜側から、9種のポリフェノール（100μM：クリシン、クルクミン、ゲニステイン、ケルセチン、ダイゼイン、ナリンゲニン、ヘスペレチン、モリン、ルテオリン）を作用させ、6時間までの経上皮電気抵抗値（TER、TJ透過性の指標）を測定した。実験２：BALB/cマウス（7週齢、オス）に、DSS（2%、飲水中）および試験食を9日間与えた。試験食は、標準食、各ポリフェノール添加食（0.3%、4種：クルクミン、ケルセチン、ナリンゲニン、ヘスペレチン）とした。また、DSSを与えず、標準食を摂食させた対照群も設けた。試験期間中、体重、血便、便性をモニタリングし、大腸炎スコアを算出した。試験期間終了後、解剖を行い、腸管反転サック法により大腸バリア機能を評価した。また、大腸長、大腸組織のミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性、TJタンパク質の発現と局在（イムノブロット法、免疫染色法）を解析した。
【結果】実験１：Caco-2細胞にナリンゲニン、ケルセチン、クルクミン、ヘスペレチン、モリンを作用させたとき、TERは対照群よりも高値を推移し、TJバリア機能の強化作用が認められた。一方、クリシン、ルテオリン、ゲニステインを作用させたCaco-2細胞のTERは、対照群よりも低値を推移した。またダイゼインは、TERを変動させなかった。実験２：DSS摂取は、大腸炎を誘発し（大腸炎スコアの上昇、MPO活性の上昇、大腸長の低下）、また大腸反転サック法にて、デキストラン透過性を大きく上昇させた。ナリンゲニン、ケルセチン、クルクミンの摂取は、DSS摂取による大腸炎スコアの上昇、大腸長の低下、デキストラン透過性の上昇を部分的に回復し、なかでもナリンゲニンの回復効果が最も強かった。また、ナリンゲニンの摂取は、DSS摂取による大腸MPO活性の上昇も部分的に抑制した。これらの結果から、４種のポリフェノール（ナリンゲニン、ケルセチン、クルクミン、ヘスペレチン）には、大腸のTJバリア機能調節・保護作用、炎症抑制作用があることが示され、なかでもナリンゲニンに最も強い作用があることが示された。現在、TJタンパク質の発現と局在について解析中である。

Naringenin, Tight junction, Intestinal inflammation

講演番号：3J13a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ J校舎13会場

エピガロカテキンガレートはJNK経路を介してLDL受容体を活性化する

Epigallocatechin gallate activates LDL receptor via JNK pathway

○森 一浩，齋藤 裕樹，後藤 剛，長岡 利（岐阜大応生・応用生命）
○Kazuhiro Mori, Yuki Saito, Tsuyoshi Goto, Satoshi Nagaoka (Gifu University)

【目的】

高い血漿LDLレベルは動脈硬化症のリスク増加につながることが知られている。血漿LDLレベルは主に肝臓で発現しているLDL受容体（LDLR）によって調節を受けており、LDLRを活性化する因子を探索し、その機構を解明することが求められている。当研究室では、茶に含まれるポリフェノールであるエピガロカテキンガレート（EGCG）がヒト肝臓細胞であるHepG2細胞においてLDLR mRNAレベルを上昇させ、またLDLを構成する主要タンパク質であるアポリポタンパク質Bレベルを減少させることを報告してきた。しかし、EGCGによるLDLR活性化機構は未だ不明な点が多く、本研究ではこの作用機構解明を目的とした。

【方法】

〈実験1〉HepG2細胞にJNK経路、ERK経路、p38経路の各シグナル伝達経路の阻害剤をそれぞれ添加し、EGCGを添加して24時間培養後、全RNAを回収してLDLR mRNA、PCSK9 mRNA、Annexin A2 mRNA、HuR mRNAレベルに対する影響をリアルタイム定量PCR法を用いて検討した。また細胞培養液上清の回収を行い、EGCGのPCSK9タンパク質レベルへの影響をELISA法を用いて検討した。

〈実験2〉HepG2細胞にEGCGを添加して培養し、24時間後、48時間後に細胞質タンパク質の回収を行い、LDLRタンパク質レベル、JNKタンパク質のリン酸化への影響をウェスタンブロット法を用いて検討した。

〈実験3〉HepG2細胞にLDLR遺伝子プロモーター部を含むルシフェラーゼプラスミドを遺伝子導入し、EGCGの転写活性化への影響を検討した。

【結果】

〈実験1〉EGCGはJNK経路を介してLDLR mRNAのレベルを上昇させていることを明らかにした。また、EGCGはLDLRの分解を促進するPCSK9のmRNAおよびタンパク質のレベルを減少させ、さらにLDLRの分解を抑制するAnnexin A2のmRNAレベルの上昇を誘導することを明らかにした。

〈実験2〉EGCGはLDLRタンパク質レベルを上昇させることを明らかにした。また、JNKタンパク質のリン酸化も促進した。

〈実験3〉EGCGによるLDLR遺伝子の有意な転写活性化は観察されなかった。

以上の結果より、EGCGはJNK経路を介してLDLRの発現を増加させると同時に、LDLRの代謝に関わるタンパク質であるPCSK9・Annexin A2の発現を、LDLRの発現を安定・増加させる方向に誘導することで、LDLRの機能を活性化するという作用機構を明らかにした。

Epigallocatechin gallate, Low-density lipoprotein receptor, Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

講演番号：3J13a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ J校舎13会場

ラクトスタチンはHNF-3αを介してコレステロール分解系を活性化する

Lactostatin activates cholesterol degradation via HNF-3α signaling

○井辰 かおる、世古 聖士、長岡 利（岐阜大応生・応用生命）
○Kaoru Itatsu, Masashi Seko, Satoshi Nagaoka (Gifu University)

【目的】
コレステロール7α-水酸化酵素（CYP7A1）は肝臓の胆汁酸生合成律速酵素であり、コレステロール分解に関与している。本研究室の研究により、牛乳β-ラクトグロブリン由来の血清コレステロール低減化ペプチドであるラクトスタチン（IIAEK）は、ヒト培養肝細胞HepG2において、CYP7A1遺伝子の転写を活性化することを明らかにした[1)]。また、DNAマイクロアレイにおいては、CYP7A1mRNAレベルの有意な上昇に伴い、肝細胞核因子-3α（HNF-3α）mRNAの有意な上昇を観察した。しかし、ラクトスタチンによるCYP7A1遺伝子転写活性化の分子機構は不明な点が多い。そこで本研究では、ヒトCYP7A1遺伝子プロモーター上の転写に重要な胆汁酸応答領域（BARE ）I、BAREII、HNF-3結合領域やHNF-4結合領域に注目し、CYP7A1遺伝子のラクトスタチンによる転写活性化機構を分子レベルで解明することを目的とした。
【方法】
〈実験1〉野生型及び、種々の転写因子の応答領域を欠損させたCYP7A1遺伝子プロモーター領域を含むルシフェラーゼプラスミドを一過性にHepG2に導入し、ラクトスタチン（1mM）を添加した。その後、細胞を回収してルシフェラーゼアッセイにより転写活性を測定した。
〈実験2〉CYP7A1遺伝子プロモーターの肝細胞核因子3（HNF-3）結合領域であるsite A（-305～-277）領域を変異させたDNAプローブ及び野生型DNAプローブを用いてゲルシフトアッセイを行い、HNF-3αの結合を評価した。
【結果】
〈実験1〉BARE Iの欠損では、野生型と同様にラクトスタチンによるCYP7A1遺伝子転写活性化が観察されたのに対し、HNF-4結合領域を含むBARE IIの欠損により、CYP7A1転写活性は顕著に低下し、ラクトスタチンによるCYP7A1転写活性の上昇も消失した。一方、HNF-3結合領域に関して、-300～-286領域の欠損により、ラクトスタチンによるCYP7A1遺伝子の転写活性化が消失した。
〈実験2〉site A領域はHNF-3αと結合することが確認され、HNF-3α抗体によるスーパーシフトバンドも観察された。さらに、その結合は、site A領域の-297～-293（AAACA）領域の変異により失われた。
以上の結果より、ラクトスタチンによるCYP7A1遺伝子転写活性化にはHNF-3αが関与することを発見した。

1) Biochem. Biophys. Res. Commun., 352, 697-702 (2007)

Cholesterol 7α-hydroxylase, Lactostatin, Hepatocyte nuclear factor 3

講演番号：3J13p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ J校舎13会場

タイトル　シラタマカズラ葉抽出物の抗肥満作用

Title　Anti-obesity effect on leaf extract of *Psychotria serpens* in mice

○桃井 真理子、中村 健一郎、西本 壮吾、小山 智之、矢澤 一良（東京海洋大院）

○Mariko Momoi, Kenichiro Nakamura, Sogo Nishimoto, Tomoyuki Koyama, Kazunaga Yazawa (Tokyo University of Marine Science and Technology)

【目的】食の欧米化や不規則な食生活、運動不足により肥満者が増加している。肥満は脂肪が蓄積される部位によって内臓脂肪型肥満と皮下脂肪型肥満に大別されている。近年内臓脂肪型肥満は、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインと呼ばれる生理活性物質の分泌バランスの崩壊によって、メタボリックシンドローム(内臓脂肪症候群)を引き起こすことが明らかにされている。本研究では、その予防のために抗肥満作用を有する新規食品素材の探索およびその作用メカニズムの解明を目的とした。

【方法】シラタマカズラ葉抽出物を調製し、以下の実験に用いた。ddYマウス（雌、7週齢、n=8)に、シラタマカズラ葉抽出物溶液およびコーン油を経口投与し、経時的に血中トリグリセリド濃度を測定した。また、豚由来の膵リパーゼを用いてリパーゼ阻害活性の測定を行った。

【結果】シラタマカズラ葉抽出物は膵リパーゼを阻害することでマウス腸管からの中性脂肪の吸収を抑制することが示唆された。したがって、シラタマカズラ葉はメタボリックシンドロームや肥満の予防に有効なヘルスフード素材であると考えられる。

obesity, *Psychotria serpens*, health foods

講演番号：3J13p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ J校舎13会場

漢方生薬五倍子の脂質吸収抑制作用

Inhibitory Effect of *Galla Chinensis* on Lipid Absorption in mice

○賀　勝捷、中村　健一郎、西本　壮吾、小山　智之、矢澤　一良　（東京海洋大院）
○Shengjie He, Kenichiro Nakamura, Sogo Nishimoto, Tomoyuki Koyama, Kazunaga Yazawa (Tokyo University of Marine Science and Technology)

【目的】近年、運動不足や食生活の乱れにより、摂取エネルギーが消費エネルギーを上回り、肥満者が増加している。平成21年度の国民健康・栄養調査によると、20歳以上の日本人における肥満者の割合は男性が30.5%、女性20.8%である。そこで、本研究では抗肥満作用を有する新規食品素材の探索およびその作用メカニズムの解明を目的とした。これまでのスクリーニングの結果、ウルシ科ヌルデの葉上に形成される嚢状虫嬰であり、漢方生薬として用いられている五倍子に、膵リパーゼ活性阻害作用があることを見い出した。

【方法】五倍子熱水抽出物（GWE）を調製し、以下の実験に用いた。ddYマウス（雄、6週齢、*n*=8）に対し、コーン油およびGWEを同時に経口投与、経時的に血中トリグリセリド濃度を測定した。また、ブタ膵リパーゼ活性に及ぼす影響について詳細に検討した。

【結果】GWE投与群は、蒸留水投与群と比較してコーン油投与による血中トリグリセリド濃度の上昇を有意に抑制した。また、GWEは、*in vitro*においてブタ膵リパーゼ活性を濃度依存的に阻害した。

【考察】GWEは膵リパーゼ活性を阻害することで、腸管における脂質の分解、吸収を抑制することが示唆された。よって、GWEは肥満の予防・改善に有用な素材であることが考えられた。詳細な作用メカニズムおよび有効成分の単離・同定については、現在検討中である。

obesity, *Galla chinensis,* health foods

講演番号：3J13p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ J校舎13会場

フラボノイドによるコレステロール腸管吸収阻害機構の解析

Analyzing the Effects of Flavonoids on the inhibition of intestinal cholesterol transport

○猫橋 茉莉、荻原 琢男[1]、阿部 啓子、小林 彰子（東大院農生科・応生化、[1]高崎健大・薬）
○Mari Nekohashi, Takuo Ogihara[1], Keiko Abe, Shoko Kobayashi (Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [1]Dept. Pharm., Takasaki Univ. Heal. Welf.)

【目的】消化管では、脂質のミセル化および小腸上皮に発現するコレステロールトランスポーター（NPC1L1やABCA1等）が、コレステロール吸収を調節していると考えられているが、詳細については解明されていない。ポリフェノールには“フレンチパラドックス”が示唆するような動脈硬化を防ぐ疫学的知見があり、一部のカテキン類が脂質の吸収を抑制することが報告されているが、メカニズムについては不明な点が多い。そこで本研究では、小腸においてコレステロール吸収を阻害するポリフェノールを網羅的にスクリーニングし、これらの吸収阻害機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】小腸上皮のモデル細胞であるCaco-2細胞を用いて、[^{3}H]コレステロールの温度・濃度・時間依存的取り込み試験を行った。コレステロールは実際の消化管での存在形態を模倣し、ホスファチジルコリンおよびタウロコール酸と共にミセル化させた。ポリフェノールは構造別に代表的なもの（34種）をスクリーニングに供した。ミセル作製時からポリフェノールを共存させたものをCaco-2細胞に添加し、コレステロール取り込み量を測定した。阻害効果の高かったフラボノイドについて、ミセルを含まない細胞とのみインキュベーションさせ、Caco-2単層膜への阻害効果を解析した。さらにフラボノイドのミセル形成阻害効果を調べるため、フラボノイド添加時のミセル内コレステロール量を測定した。
【結果および考察】Caco-2におけるコレステロールの取り込み速度は、温度依存的飽和過程を示した。スクリーニングの結果、8種のフラボノイドが有意にコレステロールの取り込みを抑制した。特にluteolinとquercetinは高い抑制を示した。これらのフラボノイドは濃度依存的にコレステロールの取り込みを抑制し、阻害活性は約50μMで飽和に達した。Caco-2単層膜にのみあらかじめluteolinやquercetinを添加しインキュベートした検討においても、コレステロールの取り込みは有意に阻害され、その効果は120分まで持続した。特にluteolinは、消化管コレステロール吸収阻害薬であるezetimibeより高い阻害活性を示した。またミセル形成阻害試験においても、これらのフラボノイドはミセル内コレステロールを減少させた。以上の結果から、luteolinおよびquercetinのコレステロール吸収阻害機構は、コレステロールのミセル形成阻害と、Caco-2の管腔側膜上への作用による、複数の機構が存在することが示された。

cholesterol, flavonoid, intestinal transport

講演番号：3J13p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ J校舎13会場

シイタケフレーバー成分レンチオニンの四塩化炭素誘発肝障害抑制効果

Preventive effect of lenthionine, a flavor component of shiitake mushrooms, on hepatic injury induced by carbon tetrachloride

○片山 倫陽，遠藤 麻恵，鈴木 大介，赤尾 真，熊谷 日登美（日大・生資科・生化）
○Michiharu Katayama, Asae Endo, Daisuke Suzuki, Makoto Akao, Hitomi Kumagai
(Dept. Chem. Life Sci., Nihon Univ.)

【目的】シイタケは，日本人が古来より食品素材として用いているキノコであり，他のキノコとは異なる特徴的なフレーバーを有している。シイタケの主要なフレーバー成分であるレンチオニンは，臭気前駆体物質であるレンチニン酸にγ-グルタミルトランスフェラーゼおよびC-Sリアーゼが作用して生成する環状硫黄化合物である。同様にC-Sリアーゼが関与する反応では，ニンニクやタマネギのフレーバー生成があげられる。ニンニクの場合には，アリルシステインスルフォキシドあるいはメチルシステインスルフォキシドにC-Sリアーゼが作用し，様々な薬理効果を有する直鎖状硫黄化合物ジアリルジスルフィド(DADS)やメチルアリルトリスルフィド(MATS)などのスルフィド類が生成する。一方，環状硫黄化合物であるレンチオニンの薬理効果に関しては，当研究室のこれまでの研究で，レンチオニンが血小板凝集抑制作用を有することを明らかにしているが，その他の効果については検討していない。

そこで本研究では，経口投与したレンチオニンが生体内で薬物代謝酵素を誘導するか，また，四塩化炭素によって誘導された肝障害を抑制するか否かについて検討した。

【方法】オリーブオイルに溶解したレンチオニンを，ICR系マウスに5日間経口胃内投与した。コントロール群には，オリーブオイルのみを投与した。最終投与後，四塩化炭素を腹腔内投与し，急性肝障害を惹起させ，四塩化炭素投与24時間後に肝臓および血液を採取した。肝臓中の薬物代謝酵素として，第１相解毒酵素であるcytochrome P450（CYP450），第２相解毒酵素であるglutatione-*S*-transferase（GST）およびquinone reductase（QR）の活性を測定し，さらに，酸化ストレスのパラメーターである過酸化脂質量（TBRAS値），肝障害パラメーターである血漿中のaspartate aminotransferase（AST）およびalanine aminotransferase（ALT）の活性を測定した。

【結果】四塩化炭素の投与により，CYP450，GST，QRの活性は低下し，TBRAS値，AST，ALTの値は増加した。一方，経口投与したレンチオニンは，第１相解毒酵素であるCYP450を誘導せず，第２相解毒酵素であるGSTおよびQRを誘導した。また，レンチオニンは，酸化ストレスパラメーターであるTBRAS値，肝障害パラメーターのASTおよびALTの活性の上昇を有意に抑制し，四塩化炭素による肝障害に対して抑制効果を有することが示された。

shiitake flavor, hepatic injury, carbon tetrachloride

講演番号：3J13p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ J校舎13会場

ホスファチジン酸によるアスピリン潰瘍抑制

Prevention of aspirin-induced gastric ulceration by phosphatidic acid

○森戸　克弥、木下　正文、大本　真弓、近藤　宏樹[1]、瓜倉　真衣[1]、里内　清[1]、田中　保、徳村　彰（徳島大院ヘルスバイオサイエンス、[1]福山大・生命工）

○Katsuya Morito, Masafumi Kinoshita, Mayumi Ohmoto, Hiroki Kondo[1], Mai Urikura[1], Kiyoshi Satouchi[1], Tamotsu Tanaka, Akira Tokumura (Inst. Health Biosci. Univ. Tokushima Grad. Sch., Dept. Applied Biol. Sci. Fukuyama Univ.)

【目的】リゾホスファチジン酸(LPA)は細胞増殖因子様脂質であり、その受容体は消化管管腔側にも存在すると報告されている。LPA はこの受容体を介し、コレラ毒素誘導性の下痢を止め、小腸粘膜上皮のアポトーシスを回避させるなどの作用を示す。我々は LPA の経口摂取がストレス性胃潰瘍を予防できること、キャベツなどの野菜を生で咀嚼すると、植物酵素のホスホリパーゼD(PLD)作用により、口腔内で多量のホスファチジン酸(PA)を生じることを明らかにしている。本研究では潰瘍を発生しやすい胃において PA が LPA に変換される可能性について検討し、アスピリン潰瘍形成における PA の効果を検討した。

【方法・結果】絶食したマウスから胃洗浄液を調製してホスホリパーゼ活性を測定すると、ホスファチジン酸 (PA) をよい基質とする強力なホスホリパーゼA_2活性が検出された。また、摘出したマウスの胃中でPA (300 nmol / stomach) をインキュベートすると、30分で26%がLPAへ変換された。さらに、PAを含む市販の飼料を摂取したマウスの胃ではLPA含量が増加しており、胃においてPAはLPAへと変換されていることが確認された。種々の脂質のアスピリン誘導性胃潰瘍への効果を調べたところ、LPA(1mM~)、PA(0.1mM~)およびホスファチジルコリン(1mM~)が潰瘍の形成を有意に抑制した。

【考察】胃にはホスホリパーゼA_2が豊富に存在することが以前から知られていたが、至適pHは中性付近であり十二指腸以降で作用するものと考えられていた。しかし、今回の研究結果から、PAは胃内でPLA_2作用を受け、LPAへと変換されていることが明らかになった。従って、キャベツなどのPLD活性の高い野菜の摂取は咀嚼時に活性化されるPLDとPLA_2の連続的作用により胃に多くのLPAをもたらす可能性が考えられる。また、PAの経口投与はアスピリン誘導性の胃潰瘍を比較的低濃度から有意に抑制した。これらのことを考え合わせると、PLD活性の高い野菜はアスピリン潰瘍の予防食になる可能性が考えられる。

phosphatidic acid, lysophosphatidic acid, anti-ulcer

講演番号：3J13p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ J校舎13会場

乳酸菌菌体の2型糖尿病モデルマウスに対する抗糖尿病作用

Anti-diabetic effects of lactic acid bacteria in type 2 diabetic mice

本田　佳代子、○本　三保子、内田　菜穂子、何　方[1]、橋詰　直孝（和洋女大院・総合生活、[1]タカナシ乳業）

Kayoko Honda, ○Mihoko Moto, Naoko Uchida, Fang He[1], Naotaka Hashizume (Wayo Women's University Graduate School, [1]Takanashi Milk Products)

【目的】我々はこれまでにプロバイオティクス乳酸菌の1つである*Lactobacillus rhamnosus* GG（LGG）株の生菌体を2型糖尿病モデル動物であるKK-A^{y}マウスに摂取させることで糖尿病の予防および改善に有用であることを明らかにした。本研究では、LGG株に比べて酸耐性・胆汁耐性が低い*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB3（LB）株を用いてKK-A^{y}マウスに対する作用を比較・検討した。さらに、LGG株の死菌体を用いてKK-A^{y}マウスに対する作用も比較・検討した。
【方法】実験1）5週齢のKK-A^{y}雄性マウスを対照群、LGG群、LB群の3群に分け、LGG株またはLB株の生菌体を0.5%混合した飼料を6週間摂取させた。実験2）5週齢のKK-A^{y}雄性マウスを対照群、LGG生菌群、LGG死菌群の3群に分け、LGG株の生菌体または加熱処理死菌体を2%混合した飼料を3週間摂取させた。いずれの実験においても経時的に体重、空腹時血糖値を測定し、終了時にグルコース負荷試験を行った。
【結果】実験1の結果、LGG群、LB群の体重増加は対照群に比べて差はみられなかったが、LGG群では対照群に比べて空腹時血糖値およびグルコース負荷後血糖値の上昇が有意に抑制された。一方、LB群では空腹時血糖値およびグルコース負荷後血糖値は対照群に比べて有意差はみられなかった。実験2の結果、LGG生菌群、LGG死菌群の体重増加は対照群に比べて差はみられなかったが、LGG生菌群では対照群に比べて空腹時血糖値の上昇が有意に抑制され、グルコース負荷後血糖値も有意に低い値を示した。一方、LGG死菌体群では空腹時血糖値およびグルコース負荷後血糖値は対照群に比べて有意差はみられなかった。以上の結果から、乳酸菌菌体のKK-A^{y}マウスに対する抗糖尿病作用は乳酸菌の菌種・菌株によって異なる可能性が示唆された。さらにその効果は耐酸性・耐胆汁性が低いLB株の生菌体を摂取させた場合、LGG株を加熱処理した死菌体を摂取させた場合にみられなかったことから、乳酸菌の腸管における生存性が関与する可能性が示唆された。

Lactobacillus rhamnosus GG, anti-diabetic effect, KK-A^y mice

講演番号：3J13p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ J校舎13会場

Flavan 3-ols のラット循環およびエネルギー代謝に対する影響

Effect of Flavan 3-ols on circulation and energy expenditure in rat

○越阪部 奈緒美、プウンサムパン アヌワン、椎葉 奈保子、柴田 政廣（芝工大・シス理・生命）
○Naomi Osakabe, Pungsumpun Anuwan, Naoko Shiiba, Masahiro Shibata(Dept. Biosci. Engin. SIT)

【目的】チョコレートや赤ワインといったポリフェノールを多く含む食品を摂取することが心血管系疾患の予防につながることが栄養疫学調査の結果から明らかとなっている。また、これらの食品を用いた栄養介入試験では、心血管系疾患のリスクファクターである血圧・血液脂質・インシュリン感受性の改善が認められている。しかしながら、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。そこで今回、チョコレートや赤ワインに含まれる主なポリフェノールであるflavan 3-ols の循環およびエネルギー代謝への影響をラットを用いて検討することとした。
【方法】動物は７週齢のWistar系雄性ラットを用い、対照群には通常食を、flavan 3-ols群にはココアから生成したflavan 3-ols画分を0.2%含有する飼料を、また陽性対照群としてカプサイシン群を設け、0.01%カプサイシン含有飼料を2 週間自由摂食させた。飼育終了時に血圧・心拍数をTail-caff 法（MK-2000ST、室町機械製）で、エネルギー代謝を間接カロリー法（小動物用代謝計測システムMK-5000RQ、室町機械製）で、また身体密度をプレチスモグラフ法で測定し、麻酔下で採血および解剖に供した。
【結果】身体密度は対照群に比較してflavan 3-ols群およびカプサイシン群で有意に上昇した。血圧は対照群に比較してflavan 3-ols群およびカプサイシン群で有意な低下が認められた。エネルギー消費量は対照群に比較してflavan 3-ols群で有意に上昇したが、カプサイシン群では有意な差は認められなかった。
【結論】チョコレートや赤ワインに含まれるflavan 3-ols はエネルギー代謝を亢進させることが明らかとなった。これまで多くの栄養介入試験において報告のあったflavan 3-ols 含有食品の血圧・血液脂質・インシュリン感受性改善作用はエネルギー代謝改善作用に起因するものであることが示唆された。現在各群の組織中のuncoupling protein の発現を解析中であるため、これらの結果を合わせて報告する。

flavan 3-ols, circulation, energy expenditure

講演番号：3J13p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ J校舎13会場

高コレステロール食摂取ラットにおける乳酸発酵豆乳の肥満予防効果

Anti-obesitic Effects of Fermented Soymilk in Rats Fed a High Cholesterol Diet

○平畑 理映、小林 麻貴[1]、小野 三起子、江草 信太郎[2]、都築 公子[2]、福田 満[1]（武庫川女子大院・食栄、[1]武庫川女子大生環・食栄、[2]マルサンアイ・開発統括部）

○Rie Hirahata, Maki Kobayashi[1], Mikiko Ono, Shintaro Egusa[2], Kimiko Tsuzuki[2], Mitsuru Fukuda[1] (Graduate School of Human Environ. Sci., Mukogawa Women's Univ., [1]Dept. Food Sci. and Nutr., Mukogawa Women's Univ., [2]Res. Inst. Marusan-ai Co., Ltd.)

【目的】近年、メタボリックシンドロームは先進国において健康上の最も深刻な問題の一つである。本研究室では、大豆食品の中でも今後の需要が期待される豆乳に注目して、豆乳を植物性食品起源の乳酸菌で発酵させた乳酸発酵豆乳すなわち豆乳ヨーグルトの摂取によって脂質代謝改善効果が促進することを明らかにした。大豆食品の摂取が肥満抑制に効果的であるとの報告が行われているので、食事内容の偏りによる肥満の予防にも大豆食品は効果的であると推測した。本研究室では、従来、主に通常食摂取ラットについて乳酸発酵豆乳の効果を調べてきたが、今回は、高コレステロール食摂取ラットにおいて発生する肥満を乳酸発酵豆乳がどのように予防するかを調べた。

【方法】7 週齢 SD 系雄性ラットを AIN-93G 組成の基本飼料で 1 週間予備飼育した後、基本飼料の 1%をコレステロールで置換した飼料を対照飼料として、対照飼料投与群（C 群）、対照飼料の 11.7%を乳酸発酵豆乳で置換した試験飼料投与群（F-5 群、大豆タンパク質 5%含有に相当）と、対照飼料の 23.4%を乳酸発酵豆乳で置換した試験飼料投与群（F-10 群、大豆タンパク質 10%含有に相当）に分けて 1 群あたり 8 匹とし、5 週間飼育した。飼育期間中、餌と水は自由摂取とし、摂餌量、体重を測定した。毎週、尾動脈から採血し成分分析した。群分け後と飼育終了直前に X 線 CT によって内臓脂肪量を測定し、内臓脂肪量の変化を比較した。飼育終了後、肝臓を摘出して重量測定し、Folch 法により脂質量を測定した。腸間膜脂肪組織を採取し、脂質代謝関連遺伝子の発現量変化を Real time RT-PCR 法で調べた。

【結果】体重と摂餌量に群間差異はなかったが、総脂肪増加量および内臓脂肪増加量は乳酸発酵豆乳投与量依存的に抑制され、C 群に対して F-10 群で有意に低値を示した。肝臓重量も F-5 群、F-10 群で有意に低値を示した。糞中脂質排泄量は、F-10 群においてわずかに高い傾向にあった。以上の結果から、乳酸発酵豆乳の脂肪蓄積抑制効果は乳酸発酵豆乳投与量に依存性することが明らかになった。脂肪組織中の脂質代謝関連遺伝子発現については、SREBP-1 発現量が F-5 群でやや低下し、F-10 群で有意に低下した。TNFα 発現量は乳酸発酵豆乳投与量依存的に低下傾向を示したが、FAS 発現量に変化はなかった。乳酸発酵豆乳は高コレステロール食を摂取したラットの内臓脂肪組織において脂質代謝関連遺伝子発現を調節すると推定された。乳酸発酵豆乳中の機能性成分の何が内臓脂肪組織の遺伝子発現調節作用に影響するかは今後の検討課題である。

Fermented Soymilk, Visceral fat, Obesity

講演番号：3J13p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ J校舎13会場

Caco-2 培養細胞におけるフィロキノンとメナキノン-4 の膜透過

The membrane permeability of phylloqinone and menaqinone-4 in Caco-2 cells

○林　藍子、山田恵理、土居幸雄（京女大・食物栄養）
○Aiko Hayashi, Eri Yamada, Yukio Doi (Kyoto Women's Univ.)

【目的】小腸上皮細胞様機能を発現する Caco-2 細胞を用いてフィロキノン（PK）およびメナキノン-4（MK-4）の膜透過に与える脂質の影響を調べた。PK あるいは MK-4 のエマルションは、タウロコール酸ナトリウム（STC）、リゾホスファチジルコリン（Lyso-PC）、ホスファチジルコリン（PC）を用いて作成した。

【方法】PK、MK-4、STC、PC、Lyso-PC はエタノールに溶解した。有機溶媒を完全に除去した後にハンクス緩衝液を添加し、超音波処理により混合ミセルを調製し、室温で一晩放置後に使用した。Caco-2 細胞トランスウエルで 2～3 週間培養したのち実験に用いた。PK と MK-4 は、HPLC で ODS カラムを用いて分離し、白金カラムで還元後、蛍光を検出して定量した。

【結果・考察】ビタミン K 濃度を 50 μM に保ち、STC 濃度を 2～10 mM で変化させ、細胞内への移行を測定した。PK と MK-4 は、いずれも STC 濃度の低い場合は、ほとんど透過されなかったが、6～10 mM では STC 濃度の増加に伴って細胞内への移行が促進した。STC 濃度を 10 mM に保ち、ビタミン K 濃度を 10～200 μM で変化させたとき、細胞内への移行は、いずれも濃度依存的に増加した。これらの結果から、細胞内へのビタミン K の取り込みは、STC との混合ミセルの形成により大きく促進されると思われた。

ビタミン K の透過の少ない 2 mM STC 存在下で、Lyso-PC を 25～200 μM の範囲で添加したところ、PK と MK-4 は、いずれも Lyso-PC 濃度の増加に伴って細胞内への移行が増加した。Lyso-PC の代わりに、25～200 μM の PC を用いた場合も、同様な傾向が見られ、PC により透過が促進された。Lyso-PC または PC の添加による経上皮抵抗値の変化は見られないことから、リン脂質による細胞内移行の促進は、上皮細胞膜の変化ではなく、ビタミン K-STC-リン脂質混合ミセルの形成によることが考えられた。

今回いずれの実験においても、細胞内から基底膜側へのビタミン K の移行はほとんど見られなかった。腔腸から吸収されるビタミン K は、血中で高トリグリセリドリポタンパク質により運搬されることが知られているので、Caco-2 におけるビタミン K の基底膜側への分泌は、リポタンパク質の分泌と平行して起こると考えられる。そこで、試料のエマルションに、リポタンパク質が合成されるとき利用される脂肪酸、モノグリセリドなどを添加してその影響を調べたが、いずれの場合においても基底膜側への移行はほとんど見られなかった。今後 Caco-2 による高トリグリセリドリポタンパク質の分泌を確認する必要がある。

また、腔腸における PK の吸収は能動輸送によるが、MK の吸収は受動輸送による、との報告がある。本研究で PK と MK-4 の細胞内移行に大きな差が見られなかったことは、少なくとも上皮細胞内への取り込みに関しては、両者の輸送機構には大きな差がないことを示している。

phylloqinone, menaqinone, Caco-2

講演番号:3J13p11
講演日時、会場:3月24日15:49～ J校舎13会場

P-糖タンパク質によるスフィンゴ脂質の選択的消化管吸収

Selective absorption of sphingolipids by P-glycoprotein in digestive tract

○藤井　愛生[1]、酒井　祥太[1]、菅原　達也[1]、都築　毅[2]、池田　郁男[2]、間　和彦[3]、平田　孝[1]
([1]京大院・農、[2]東北大院・農、[3]日本製粉(株))

○Aoi Fujii[1], Shota Sakai[1], Tatsuya Sugwara[1], Tsuyoshi Tsuduki[2], Ikuo Ikeda[2], Kazuhiko Aida[3], Takashi Hirata[1]([1]Kyoto University, [2]Tohoku University, [3]Nippon Flour Mill Co. Ltd)

【目的】スフィンゴ脂質は抗腫瘍作用や皮膚機能改善効果を有する食品機能成分として注目されている。スフィンゴ脂質の骨格成分であるスフィンゴイド塩基は生物種によって化学構造が異なり、これまでの研究から、植物由来のものは消化管吸収されにくいことが示されてきている(Sugawara, et al. *J. Nutr.*, 2003, Sugawara, et al. *J. Lipid Res.*,2010)。その理由として、薬物排出トランスポーターである P-糖タンパク質(MDR1)との関わりが示唆されているが(Sugawara, et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2004)、その詳細なメカニズムは未だ不明である。そこで本研究では、スフィンゴイド塩基構造に依存した選択的消化管吸収機構における *in vivo* での MDR1 の関わりについて、より詳細に調べるために、ラットリンパカニューレ法を用いて評価した。

【方法】一週間予備飼育したSD系雄ラットに胸管リンパカニューレ手術を行い、動物型スフィンゴシンまたは植物型4,8-スフィンガジエニン各5μmolを含む乳化液にMDR1阻害剤（ベラパミル）を添加した試料を経胃投与し、投与前後のリンパ液を連続的に採取した。得られたリンパ液から総脂質を抽出した後、遊離スフィンゴイド塩基画分および総スフィンゴイド塩基画分からそれぞれオルトフタルアルデヒドを用いた蛍光-HPLC法で定量し、スフィンゴイド塩基のリンパ液への吸収量およびMDR1阻害剤の影響を調べた。また、LC-MS/MSを用いて、リンパ液に含まれる複合スフィンゴ脂質の化学構造の解析を行った。

【結果】投与した4,8-スフィンガジエニンのリンパ液中への回収率は、MDR1阻害剤の添加により投与後1時間の時点で有意に増加した。また、LC-MS/MS解析の結果から、4,8-スフィンガジエニンは、パルミチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸と結合したセラミドに体内で再合成されていることが明らかとなった。一方、スフィンゴシンの回収率は4,8-スフィンガジエニンの約5倍であり、MDR1阻害剤の影響は認められなかった。以上の結果から、*in vivo*におけるスフィンゴイド塩基の選択的消化管吸収にMDR1が関わることが示された。本研究は生研センターイノベーション創出事業により行われた。

P-glycoprotein, intestinal absorption, sphingolipids

講演番号：3J13p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ J校舎13会場

ヒストンコードを介した糖応答性小腸消化吸収関連遺伝子の転写制御機構

Transcriptional regulation of small intestinal genes involved in carbohydrate digestion and absorption via histone code

○井上 聖哉、望月 和樹、合田 敏尚　（静岡県大院生活健康・食栄）
○Seiya Inoue, Kazuki Mochizuki, Toshinao Goda (Grad. Sch. of Nutr. and Environ. Sci., Univ. of Shizuoka)

【目的】

小腸は管腔内に流れ込む糖質の量と質の変化を敏感に感じ取り、糖応答性小腸消化吸収関連遺伝子の発現を誘導することで、糖質の消化・吸収を効率良く行うように適応することが知られている。近年の研究から、ヒストン上に記載される情報であるヒストンコード（ヒストン修飾）による標的遺伝子の転写制御領域における転写複合体の形成促進が、このような遺伝子発現の誘導の一因となることが明らかになってきた。そこで本研究では、糖応答性小腸消化吸収関連遺伝子の発現がヒストンコードにより調節される機構を検討した。

【方法】

糖質の量が異なる食事（高糖質食と低糖質食）を通常ラットに 1 週間自由摂取させた。また、糖質の質が異なる食事（難消化性デンプン食と易消化性デンプン食）を耐糖能異常モデル OLETF ラットに 1 ヵ月間自由摂取させた。空腸組織を採取し、糖応答性小腸消化吸収関連遺伝子、ヒストン修飾関連遺伝子の発現量を real-time RT-PCR 法により測定した。*in vivo*-クロマチン免疫沈降（ChIP）法により、糖応答性小腸消化吸収関連遺伝子周辺におけるヒストン H3、H4 のアセチル化量、ヒストン H3 リジン 4 番目（K4）のメチル化量、ならびに転写複合体構成因子として知られるヒストンアセチル化酵素 GCN5 の結合量を検討した。

【結果と考察】

通常ラットおよびOLETFラットのいずれにおいても、消化されやすい糖質の量の増大にしたがって糖応答性小腸消化吸収関連遺伝子ならびにヒストンアセチル化酵素GCN5の発現量が有意に増大した。さらにこの遺伝子発現の増大と同調して、糖応答性小腸消化吸収関連遺伝子周辺におけるヒストンH3、H4のアセチル化量、ヒストンH3K4のメチル化量ならびにGCN5の結合量が増大していた。また、難消化性デンプン食を摂取したOLETFラットでは、耐糖能異常の改善が認められた。以上の結果から、ヒストン修飾とそれに伴う転写複合体構成因子の集合が小腸吸収細胞における糖応答性小腸消化吸収関連遺伝子の発現誘導に関与することが示唆された。また、難消化性デンプン食投与による糖応答性小腸消化吸収関連遺伝子の発現量の低下と耐糖能異常の改善には関連性があるものと考えられた。

Histone code, Jejunum, GCN5

講演番号：3J13p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ J校舎13会場

栗渋皮ポリフェノールのリパーゼ阻害作用

Lipase inhibition by polyphenols from chestnut astringent skin

○辻田　隆広、高久 武司（愛媛大・総合科学研究支援）
○Takahiro Tsujita, Takeshi Takaku (Ehimedai)

【目的】昨年の本大会で栗渋皮ポリフェノールを精製し、精製ポリフェノールに強いアミラーゼ阻害作用と糖吸収抑制作用が存在することを報告した。今回は膵リパーゼ阻害作用と脂肪吸収抑制作用について検討したので報告する。

【方法】栗渋皮の含水エタノール抽出物を水で再抽出、透析、Diaion HP-20、SephadexLH-20を用いて精製した。精製標品をHPLCやMALDI-TOF/MSの解析により構成成分を推測した。リパーゼ活性は、トリオレインを基質として用い、遊離する脂肪酸量を測定した。また均一に分散する4-methylunbelliferyl oleate(4-MU)を基質として用い、蛍光強度の増加を測定した。ラットへの脂肪負荷試験はラットに、コーン油を5.3 ml/Kg体重で経口投与すると同時に栗渋皮ポリフェノールを経口投与し､血中トリグリセリド量を測定した。

【結果】この精製により膵リパーゼ阻害を指標とした比活性は 2.7 倍上昇し、ポリフェノール含量も約３倍増加した。ポリフェノールの成分としては没食子酸およびエラグ酸の存在が確認され、カテキンもしくはエピカテキンのポリマーであるプロアントシアニジンを含む可能性が示唆された。基質の種類、基質エマルジョンの種類およびリパーゼの種類を変え、栗渋皮ポリフェノールによるリパーゼ活性阻害を比較した。阻害活性はトリオレインを基質とした場合に比べ 4-MU を基質とした場合の方が 300 倍以上強かった。ラットへの脂肪負荷試験では栗渋皮ポリフェノールの投与により、脂肪の吸収が抑制された。

【結論】栗渋皮抽出物のポリフェノールには強いアミラーゼ阻害作用と共にリパーゼ阻害作用も認められ、脂肪吸収抑制作用も存在することが確認された。その主成分は縮合型タンニンと加水分解型タンニンの混合物であることが推測された。

Lipase, Polyphenol, Chestnut astringent skin

講演番号：3J13p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ J校舎13会場

ユリネ摂取のラット腸内環境への影響

Effect of dietary lily bulb on intestinal luminal environment in rats

○岡崎 由佳子，福田 絵里，知地 英征，加藤 範久[1]（藤女子大・人間生活，[1]広島大院・生物圏科学）

○Yukako Okazaki, Eri Fukuda, Hideyuki Chiji, Norihisa Kato[1] (Fujijoshidai, [1]Hiroshimadaiin)

【目的】ユリネはユリ科のユリの鱗茎（球根）で，西洋では食されておらず，古くから日本と中国のみで食されている伝統的な食材である。我が国におけるユリネの主産地は北海道で，国内生産量の90%以上を占める。主成分は糖質で，タンパク質や食物繊維も多く含まれる。また，トリプシンインヒビターも存在することが知られている。ユリネは薬効のある作物として知られており，漢方薬としても利用されている。しかしながら，その栄養的・生理的作用についてはほとんど研究されていない。一方，高脂肪食は大腸がんや炎症性大腸炎といった大腸疾病の危険因子であると推測されており，脂質の過剰摂取による腸内環境の変化が大腸疾病発症に関与していると指摘されている。本研究では，高脂肪食摂取ラットの腸内環境，特にIgA（腸管免疫の指標），ムチン（腸管バリア機能の指標）及び有機酸含量に及ぼすユリネ摂取の影響を検討した。

【方法】ユリネ（北海道産）は未加熱ものを凍結乾燥後，粉末化し飼料に用いた。4週齢のSD系雄ラットを1週間予備飼育後，高脂肪食（30%牛脂）を基本食として，ユリネ凍結乾燥粉末を5%あるいは10%添加した飼料を与え，3週間飼育した。なお，ユリネのタンパク質や食物繊維等の量はカゼインやセルロース等で補正した。飼育期間中に採取した糞は，湿重量と凍結乾燥重量を測定し，水分含量を求めた。糞中IgAはELISA法により測定し，糞及び盲腸内容物中のムチンについては蛍光光度分析法を用いて測定した。盲腸内容物中の有機酸はHPLCにより分析した。

【結果】飼料摂取量および体重増加量は，5%ユリネ添加群では影響がなく，10%ユリネ添加群で低下していた。また，10%ユリネ添加群において膵臓重量が増加していた。糞中の水分含量は10%ユリネ添加群で有意に増加した。糞中IgAは，5%及び10%ユリネ添加食群で顕著に増加した。糞および盲腸内容物中のムチンについては，ユリネ添加量の増加に伴い有意に増加した。盲腸内容物のpHは5%及び10%ユリネ添加食において有意な低下が認められた。盲腸内容物の重量は5%ユリネ添加群で増加傾向を示し，10%ユリネ添加群で有意に増加した。ユリネ摂取により，盲腸内の酢酸，プロピオン酸，酪酸は増加しており，特に乳酸については，10%ユリネ添加群で顕著な増加がみられた。これらの結果より，ユリネは腸管のIgAとムチン産生および腸内発酵を促進させ，腸内環境を改善している可能性が示唆された。一方，未加熱のユリネを10%程度添加した場合，摂取量や体重増加量が低下し，その原因としてユリネ中のトリプシンインヒビターの影響が関与している可能性が示唆された。今後は，ユリネの有効成分の特定を進めていくと共に，加熱処理したユリネ乾燥粉末の影響についても検討を行う予定である。

lily bulb, intestinal luminal environment, rat

講演番号：3J13p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ J校舎13会場

ごぼう摂取のラット腸内環境への影響

Effect of dietary burdock on intestinal luminal environment in rats

○井上淳詞，岡崎由佳子[1]，大西奈々恵[2]，佐藤怜子[2]，Vivi Novita Sitanggang[2]，友竹浩之[3]，加藤範久[2]（(株）あじかん，藤女子大・人間生活[1]，広島大院・生物圏科学[2]，飯田女子短大[3]）

○Junji Inoue, Yukako Okazaki[1], Nanae Onishi[2], Reiko Sato[2], Vivi Novita Sitanggang[2], Hiroyuki Tomotake[3], Norihisa Kato[2] (Ahjikan, Co. Ltd., [1]Fujijoshidai, [2]Hiroshimadaiin, [3]Iidajoshitandai)

【目的】ごぼうは，古くから日本で食されている伝統的な食材である。ごぼうはイヌリンなどの食物繊維が豊富であり，近年，ポリフェノール含量が他の食材と比べて著しく高いことが明らかとなっている。最近，我々はごぼうを焙煎するとごぼう特有の香りが引出され，抗酸化能（ORAC値）も著しく増加することを明らかにした（１）。さらに，我々はごぼう茶の製造法を開発し，その中にオリゴ糖やポリフェノール類が豊富に含まれていることを確認した。このごぼう茶をラットに摂取させたところ，糞中２次胆汁酸（大腸がん危険因子）の減少やIgA（腸管免疫の指標）やムチン（腸管バリア機能の指標）が増加しており，腸内環境が改善していた（２）。一方，高脂肪食は大腸がんや炎症性大腸炎といった大腸疾病の危険因子であると推測されており，脂質の過剰摂取による腸内環境の変化が大腸疾病発症に関与していると指摘されている。本研究では，高脂肪食摂取ラットの腸内環境に及ぼすごぼう粉末摂取の影響を検討した。

【方法】4週齢のSD系雄ラットを1週間予備飼育後，高脂肪食（30%牛脂）を基本食として，ごぼう乾燥粉末，あるいは焙煎ごぼう粉末を5%添加した飼料を与え，3週間飼育した。粉末化したごぼう粉末と焙煎ごぼう粉末を飼料に5%添加し，なお，ごぼう粉末や焙煎ごぼう粉末のタンパク質や食物繊維等の量はカゼインやセルロース等で補正した。糞中IgAはELISA法により測定し，糞中のムチンについては蛍光光度分析法を用いて測定した。盲腸内容物中の有機酸や腸内細菌叢はHPLC法とT-RFLP法により分析した。

【結果】飼料摂取量および体重増加量は，ごぼう粉末，および焙煎ごぼう粉末添加群では影響がなく，脂肪組織重量や肝臓重量，血中脂質，グルコース，アディポネクチンも変化していなかった。糞重量は変化していなかったが，水分含量はごぼう，および焙煎ごぼう群で増加していた。盲腸内容物重量は，ごぼう群では変化はなく，焙煎ごぼう群で増加傾向にあった。糞中のIgAとムチンは，ごぼう粉末，および焙煎ごぼう粉末群で著しく増加していた。盲腸内容物の腸内細菌叢については，３群間で有意な差は見られなかった。盲腸内の酢酸とプロピオン酸が焙煎ごぼう群で増加していた。一方，乳酸については，ごぼう群で顕著な増加がみられたが，焙煎ごぼう群では大幅に減少していた。現在，さらに，糞中二次胆汁酸についても検討中で発表予定である。

１）井上淳詞他：日本調理科学会平成21年度大会研究発表要旨集 p43
２）井上淳詞他：日本農芸化学会平成22年度大会講演要旨集 p172

Burdock, Roast burdock, Intestinal luminal environment

講演番号：3J13p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ J校舎13会場

ヒト腸上皮様細胞株（Caco-2, C2bbe1および HT-29）によるラクトフェリンの吸収と放出

Absorption and release of lactoferrin by human intestinal epithelial cell lines (Caco-2, C2bbe1 and HT-29)

○秋山 友香、久原 徹哉[1]、新 光一郎[1]、大島 健司、灘野 大太、 岩附 慧二[1]、松田 幹（名大院生命農・応用分子生命科、[1]森永乳業食基研）

○Yuka Akiyama, Tetsuya Kuhara[1], Kouichirou Shin[1], Kenzi Oshima, Daita Nadano, Keiji Iwatsuki[1], Tsukasa Matsuda (Dept. Appl. Mol. Biosci. Grad. Sch. Bioagric. Sci.,Nagoya University, [1]Morinaga Milk Industry Co., Ltd, Food Science & Technology Institute)

【目的】牛乳ラクトフェリン（LF）は個体レベルで多様な生理作用を示すことが報告されており、LFの吸収は生理的に重要な意味をもつと考えられる。しかし、マウスに経口投与したLFは他のタンパク質とは異なり、門脈血中に検出される量は微量である。このようなLFの生体内への取り込みにおける分子機構は明らかとされていない。本研究では腸上皮細胞による頂端側からのLFの吸収と基底側への放出におけるLFの特異性を見出すことを目的として、LFの細胞内分布および異なるヒト腸上皮細胞株での吸収と放出を比較解析した。【方法】多孔性膜上のCaco-2細胞層の頂端側にLFおよび対照として卵アルブミン（OVA）を添加し、基底側への経細胞輸送量を経時的に測定した。またLFを添加してから3時間後の細胞を蛍光免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡によってLFの細胞内分布を解析した。次に、平板上で培養したCaco-2細胞の培養液にLFを添加し、3時間後の細胞を遠心分離法により分画し、免疫ブロッティングによって各画分でのLFを検出することでLFの細胞内での分布を生化学的に解析した。また平板上で培養した3種の腸上皮様細胞株にLFを取り込ませた後、経時的に細胞溶解液および培養上清を回収し、それぞれの回収溶液中のLF濃度を測定することにより、細胞のLF吸収速度および吸収したLFの培養上清中への放出速度を解析した。【結果】単位時間当たりにCaco-2細胞層を透過するLFはOVAの1/10以下で、基底側に輸送されるLFはわずかであることが明らかとなった。一方、免疫染色後の細胞内シグナル強度はLFの方がOVAよりも顕著に高く、LF受容体として知られるインテレクチンを高発現させたCaco-2細胞においてはLFのシグナル強度がさらに上昇した。またLFを含む培養液により3時間平板培養した後のCaco-2細胞を細胞分画すると、LFは複数の画分にわたって検出されるが、核画分に特に強く検出された。したがって、LFはOVAに比べ細胞内に吸収されやすく、その機構にインテレクチンが関与している可能性、ならびに吸収されたLFの一部は核に輸送される可能性が示唆された。平板上での培養実験では、3種の腸上皮様細胞株の培養液にOVAおよびLFを加えて3時間培養した後、経時的に回収した細胞溶解液中のこれらタンパク質濃度は、時間依存的に減少する一方で、培養上清中の濃度は時間依存的に上昇したことから、一旦取り込まれたタンパク質が時間とともに培養上清に放出されることが明らかとなった。腸上皮細胞による吸収および放出速度はいずれの細胞においてもLFの方がOVAより速く、この傾向はHT29で顕著であり、HT29によるLFの吸収、放出速度は他細胞の約3倍であった。

milk lactoferrin, intestinal epithelial cell, transcytosis

講演番号:3J13p17
講演日時、会場:3月24日17:15～ J校舎13会場

腸管上皮細胞におけるフィトケミカルによるフルクトース吸収活性の制御

Regulation of fructose uptake activity by phytochemical in intestinal epithelial cells

○淡　壮平、薩　秀夫、権藤　祐輔、清水　誠（東大院・農生科）
○Sohei Awara, Hideo Satsu, Yusuke Gondo, Makoto Shimizu (University of Tokyo)

【目的】近年、フルクトース（果糖）摂取量の増加とそれに伴う肥満及び生活習慣病との関連が指摘されており、フルクトースがこれらの疾患の原因あるいは悪化の一因となっている可能性が示唆されている。従って過剰なフルクトースの吸収を抑制することによって、上記疾患が予防・改善されることが期待される。フルクトースは腸管上皮細胞の管腔側に発現するグルコーストランスポーターの一種であるGLUT5を介して細胞内に取り込まれることが報告されている。我々はこれまでの研究で、ヒト腸管上皮モデルCaco-2細胞を用いて腸管上皮細胞におけるフルクトース吸収活性評価系を構築した。そこで本研究では、構築した評価系を用いてフルクトース吸収活性を制御する食品因子の探索および解析をおこなうこととした。
【方法】ヒト腸管上皮モデル細胞として、ヒト結腸癌由来Caco-2細胞を用いた。フルクトース吸収活性評価系として、Caco-2細胞をプレート上に2週間培養し腸管上皮様に分化させた後、^{3}H標識したフルクトースを添加して一定時間インキュベートし、その後細胞を回収し細胞内に含まれるトリチウム量を測定することでフルクトース吸収活性とした。この際、フィトケミカルをフルクトースと同時に添加することにより、フィトケミカルがフルクトース吸収活性に及ぼす影響を検討した。また透過性膜上にCaco-2細胞を培養し2週間培養して単層を形成させた後、上記と同様に^{3}H-フルクトースを管腔側に加え、一定時間後基底膜側への透過量を定量した。また同時に細胞を回収し細胞内への取込量も測定した。さらにこのときフィトケミカルを同時に添加し、フルクトース透過・吸収活性に及ぼす影響についても検討をおこなった。
【結果】フィトケミカルが腸管上皮フルクトース吸収活性に及ぼす影響について、約40種類のフィトケミカル類を用いてスクリーニングした結果、ノビレチン、タンジェレチンなどポリメトキシフラボンが高いフルクトース吸収阻害活性を有していることが見出された。これらのポリメトキシフラボンのうち、柑橘類における含有量の多いノビレチンについて詳細な解析をおこなったところ、ノビレチンの濃度依存的にフルクトース吸収活性の阻害が確認された。またノビレチンは、グルコースの吸収活性をフルクトースより弱い程度で阻害するものの、アミノ酸、ジペプチドの吸収活性には影響を与えないことが明らかとなった。これより、ノビレチンは単糖の吸収活性を特異的に抑制することが示唆された。またKinetics解析の結果より、ノビレチンはフルクトース吸収活性のKm値には大きな変化を与えないものの、Vmax値を大きく減少させることが示された。さらに、透過性膜を用いた腸管上皮フルクトース透過量に対するノビレチンの影響を検討した結果、ノビレチンは濃度依存的にフルクトースの基底膜側への透過及び細胞内への取込を阻害することが見出された。以上より、ノビレチンは腸管上皮におけるフルクトース吸収・透過を抑制することが示唆された。

Caco-2, fructose, nobiletin

講演番号：3J13p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ J校舎13会場

タイトル　腸管上皮細胞におけるスフィンゴシン1-リン酸の生理機能解析
Title The functional analysis of sphingosine-1-phosphate in intestinal epithelial cells
○一本松 悠、岩本 拓、清水 誠、薩 秀夫（東大院農生科・応生化）
○Yu Ipponmatsu, Taku Iwamoto, Makoto Shimizu, Hideo Satsu(The University of Tokyo)

【目的】スフィンゴ脂質の代謝産物であるスフィンゴシン 1-リン酸(S1P)は生理活性脂質として、細胞遊走や増殖、サイトカイン産生の制御など多彩な生理作用を有することが報告されている。S1P の生理作用は主に G タンパク質共役型受容体である S1P 受容体を介して発揮されることが知られている。S1P 受容体には S1P1 から S1P5 までの 5 種類が存在し、それぞれ異なった組織に発現している。S1P は腸管においても多く存在することが報告されており、我々はこれまで腸管上皮細胞に S1P2 受容体が高発現していることを見出している。そこで本研究では、腸管上皮細胞における炎症メディエーターに対する S1P の生理作用を解析することとした。
【方法】腸管上皮モデル細胞株であるMos13にS1Pを添加し、炎症メディエーター(IL-6、MCP-1、COX-2)のmRNA発現量をreal time PCR法を用いて解析した。またIL-6及びMCP-1の分泌量についてはELISA法を用いて検討した。IL-6の転写活性に対するS1Pの作用については、マウスIL-6のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだレポーターベクターを構築し、レポーターアッセイを用いて検討した。
【結果】腸管上皮細胞における炎症メディエーターのmRNA発現量に対するS1Pの作用を検討した結果、いずれも添加したS1Pの濃度依存的にIL-6、MCP-1、COX-2のmRNA発現量の増加がみられた。また、IL-6とMCP-1についてはS1P添加によって濃度依存的な分泌量の増加も確認された。このS1Pの作用にどのS1P受容体が関与しているか検討することとし、S1P2の選択的アゴニストであるCYM5520を添加したところS1Pと同様なIL-6分泌量の亢進がみられたが、S1P1の選択的アゴニストであるSEW2871では変化が見られなかった。さらにS1P2の選択的アンタゴニストであるJTE013で処理したところ、S1PによるIL-6及びMCP-1の分泌量増加が抑制された一方で、S1P1の選択的アンタゴニストであるW146では分泌量の増加が抑制されなかった。このことから、IL-6とMCP-1に対するS1Pの生理作用にはS1P2が関与していることが示唆された。またIL-6転写活性に対するS1Pの作用を検討したところ、CYM5520添加により有意な転写活性の亢進がみられた。さらにIL-6プロモーター上のCRE配列に変異を入れるとCYM5520による転写活性の亢進はみられなくなり、この制御にはCREが関与していることが示唆された。そこでCREの上流に位置するcAMPカスケードの関与について検討することとし、プロテインキナーゼAの阻害剤であるH-89で処理したところ、S1PによるIL-6分泌量増加が抑制された。以上より腸管上皮モデル細胞においてS1PはS1P2受容体に作用しcAMPカスケードを介してIL-6の転写活性を亢進し、発現・分泌を増加させることが示唆され、S1Pが腸管における炎症反応に関与することが示唆された。S1PによるMCP-1及びCOX-2の発現亢進機構についても現在解析中である。

sphingosine-1-phpsphate, intestinal epithelial cell,interleukin-6

講演番号：3J13p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ J校舎13会場

タイトル　腸管におけるエクオールによる抗炎症作用の解析

Title　Anti-inflammatory effect of equol in the intestine

○岩柳智裕、荻原春、橘伸彦[1]、和根崎智[1]、河野光登[1]、清水誠、薩秀夫（東大院・農生科・応生化、[1]不二製油・フードサイエンス研）

○Chihiro Iwayanagi, Haru Ogiwara, Nobuhiko Tachibana, Satoshi Wanezaki, Mitsutaka Kohno, Makoto Shimizu, Hideo Satsu (The University of Tokyo, [1]Fujioil Co., Ltd.)

【目的】エクオールは主要な大豆イソフラボンであるダイゼインの代謝物であり、様々な生理作用を有することが知られている。我々はこれまでに、エクオールが腸管上皮モデル細胞にて核内受容体の一種であるpregnane X receptor (PXR)を介して解毒・排出酵素の発現を制御することを見出している。しかしながら近年では、PXRは新たに炎症のマスターレギュレーターであるNF-κBの活性化を阻害し炎症反応を抑制することが報告されている。そこで本研究では、エクオールがNF-κBの活性化及びその標的遺伝子の発現に及ぼす影響を検討することとした。またエクオールがin vivoにおいても炎症反応を制御するかについて、大腸炎モデルマウスを用いて解析することとした。

【方法】腸管上皮モデル細胞株としてヒト結腸癌由来LS180細胞を用いた。NF-κBの応答配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に含むレポーターベクターをLS180細胞に遺伝子導入した後TNF-αを添加し、ルシフェラーゼ活性を測定することでNF-κB依存的転写活性を測定した。またNF-κBの標的遺伝子としてCOX-2及びTNF-αを選び、そのmRNA発現量変化をreal-time PCR法を用いて解析した。一方大腸炎モデルマウスとしてdextran sulfate sodium（DSS）誘導大腸炎モデルマウスを用いることとし、C57BL/6マウスにDSSを3%含む水を１週間程度自由飲水させることで大腸炎を誘発した。DSS飲水開始後、大腸炎症状と相関がある体重変化を測定した。また解剖に供した後、結腸の長さの測定及び切片を作成してH&E染色をおこなった。さらに大腸粘膜層からRNAを抽出し、炎症性メディエーターのmRNA発現量をreal-time PCR法にて測定した。

【結果】LS180細胞にTNF-αを添加することによって、NF-κB依存的転写活性の亢進が確認された。そこでPXR発現ベクターを遺伝子導入しさらにエクオールを添加したところ、TNF-αによるNF-κB依存的転写活性の亢進は有意に抑制された。またTNF-α処理によってみられたCOX-2及びTNF-αのmRNA発現量増加は、PXR発現ベクターを共発現かつエクオールを添加することによって抑制された。次にDSS誘導大腸炎モデルマウスにエクオールを前もって投与しさらにDSS自由飲水下でエクオール投与を継続した結果、DSSによる体重の減少がエクオール投与群では有意に抑制された。また大腸炎症状でみられる結腸の短縮がエクオール投与群では軽減され、好中球の浸潤も抑制される傾向がH&E染色により観察された。さらに大腸粘膜層においてDSSによりCOX-2、TNF-α、MIP-2など炎症メディエーターのmRNA発現量の増加がみられたが、エクオール投与群ではいずれも顕著に抑制された。

equol, PXR, inflammation

講演番号：3J13p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ J校舎13会場

タウリンがTXNIP転写活性に与える影響の解析

The effect of taurine on transcriptional activity of TXNIP

○権藤祐輔、薩　秀夫、清水　誠（東大院農生科・応生化）
○Yusuke Gondo, Hideo Satsu, Makoto Shimizu (The University of Tokyo)

【目的】遊離アミノ酸の1つであるタウリンは、魚介類に多く含まれ主に食品から摂取される。生体内に取り込まれたタウリンは、各組織において抗酸化作用・抗炎症作用・浸透圧調節作用といった多彩な生理作用が知られているものの、その詳細な作用機序についてはほとんど明らかとなっていない。演者らは、タウリンの生理作用に関する作用機序の解析として遺伝子レベルでの検討をおこなうために、ヒト結腸ガン由来Caco-2細胞にタウリンを添加し、DNAマイクロアレイによってタウリンが遺伝子発現変化に及ぼす影響を網羅的に解析した。その結果、タウリン添加によってthioredoxin interacting protein (TXNIP) のmRNA発現量が顕著に増加し、転写活性レベルにおいても亢進が確認された。そこで、本研究ではタウリンによるTXNIP mRNA発現亢進機構の解析として、主としてTXNIPプロモーター領域中のタウリン応答配列を同定することを目的として研究を進めた。
【方法】2週間培養したCaco-2細胞にタウリンを添加して一定時間培養した後、リアルタイムRT-PCRを用いてTXNIP mRNA発現量を検討した。また転写活性への影響を検討するために、TXNIPプロモーター領域（-1299 / +256）を含むレポーターベクターを構築し、Caco-2細胞にトランスフェクションさせた後、タウリンを添加し24時間後にルシフェラーゼアッセイをおこなった。さらに詳細なプロモーター解析を進めるために、TXNIPプロモーター領域の一部（-109 / +256, -39 / +256, -39 / +142, -39 / +76）を含むレポーターベクターをそれぞれ構築し、転写活性を検討した。
【結果】タウリン添加によってTXNIP転写活性（-1299 / +256）が亢進することが確認された。そこでTXNIPプロモーター領域中のタウリン応答配列を明らかにするために、TXNIPのプロモーター領域を欠損させていくことでタウリンの影響を検討した。その結果、-39 / +256の領域まで転写活性の増加が認めたものの、-39 / +142においては認められなかった。これよりタウリンによるTXNIPの転写活性亢進には、少なくともTXNIPプロモーター領域中の+143 / +256が重要であることが示唆された。並行して、タウリン添加によってみられたTXNIPのmRNA発現亢進は、タウリンの構造類似体であるβアラニンやγ-aminobutyric acid (GABA) 添加ではみられなかった。これらのアミノ酸はタウリンと同様にtaurine transporterの基質であることから、タウリンとβアラニンを同時に添加することで競合的にタウリンの細胞内への輸送を阻害したところ、タウリンによるTXNIP mRNA発現亢進は抑制された。これより、TXNIP mRNA発現亢進には細胞内へのタウリンの輸送が関与していることが示唆された。

taurine, TXNIP, promoter

講演番号：3J14a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ J校舎14会場

D-キシロース-グリシン-β-アラニン系メイラード反応により生成する新奇ピロロピロール化合物の同定

Identification of Novel Pyrrolopyrrole Compounds Formed in a D-Xylose-Glycine-β-Alanine Maillard reaction

○横関　俊昭、渡辺　寛人[1]、早瀬　文孝（明治大農・農化、[1]明治大農・生命科）
○Toshiaki Yokozeki, Hirohito Watanabe[1], Fumitaka Hayase（Meiji Univ., [1]Meiji Univ.）

【目的】メイラード反応とは、アミノ化合物とカルボニル化合物の間で起こる非酵素的褐変反応である。この反応は食品の加工、貯蔵、調理の際に起こり、食品の品質形成や劣化に関与する重要な反応である。反応最終生成物であるメラノイジンは難分解性褐色高分子化合物であり、その複雑な構造のために構造や生成経路について未だ不明な点が多い。我々はこれらの解明を目的として、モデル系反応において、青色色素やその前駆体と考えられているピロロピロールアルデヒド（PPA）などを同定してきた。D-キシロース-グリシンモデル系においては PPA-1[1]、D-キシロース-β-アラニンモデル系において PPA-B1[2]を同定しているが、これらはメラノイジン生成の重要な中間体であると推測されている。本研究では、上記の 2 種のアミノ酸を混合した D-キシロース-グリシン-β-アラニンモデル系において、新奇ピロロピロール化合物の生成を確認し、構造解析を行った。
【方法】D-キシロース(1M)とグリシン（0.3M）およびβ-アラニン(0.7M)を炭酸水素ナトリウム(0.1M)含有 60%エタノール溶液(pH7.9)中で 26.5℃にて 48 時間インキュベートした。この反応溶液を各種クロマトグラフィーにて精製し、主要生成物について LC-ESI-Qtof-MS、NMR による構造解析を行った。
【結果】陰イオン交換クロマトグラフィーにて反応溶液を PPA 画分および青色色素画分に分画した。PPA 画分を固相抽出にて精製後、逆相 HPLC により分析したところ、4 種の PPA を検出した。2 種はすでに同定されている PPA-1 および PPA-B1 であり、残りの 2 種を新規 PPA として PPA-GB1、PPA-GB2 と命名した。
LC-ESI-Qtof-MS による質量解析、組成演算の結果、PPA-GB1、PPA-GB2 ともに分子量 338、組成式 $C_{15}H_{18}N_2O_7$ と決定した。NMR による構造解析の結果、PPA-GB1、PPA-GB2 は互いに構造異性体であり、キシロース 2 分子、グリシン 1 分子、β-アラニン 1 分子からなるピロロピロール-2-カルブアルデヒドであった。また、青色色素画分からは PPA-GB1 と PPA-GB2 を前駆体とする青色色素の生成を確認した。複数のアミノ酸の存在下においても、ピロロピロール骨格を有する化合物が生成することは、メラノイジン生成におけるこの骨格の重要性を強く示唆するものである。

[1] F. Hayase, et al, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1126: 53–58 (2008).
[2] 平松，谷川，渡辺，早瀬，日本農芸化学会 2011 年度大会要旨 p237

Maillard reaction,Pyrrolopyrrole,Pigments

講演番号：3J14a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ J校舎14会場

D-キシロース－6-アミノヘキサン酸系メイラード反応により生成する新奇ピロロピロール化合物の同定

Identification of Novel Pyrrolopyrrole Compounds Formed in a D-Xylose－6-Aminohexanoic Acid

○谷川誠治、渡辺寛人[1]、早瀬文孝（明治大農・農化、[1]明治大農・生命科）
○Seiji Tanigawa, Hirohito Watanabe, and Fumitaka Hayase (Meiji Univ.)

【目的】　食品の加工、貯蔵、調理の際には、タンパク質や糖質をはじめとする食品成分間の反応が起こる。その一つとして知られるメイラード反応は、カルボニル化合物とアミノ化合物間の非酵素的褐変反応であり、食品の品質形成や劣化に関する重要な反応である。その最終生成物である褐色色素のメラノイジンは、難分解性の高分子化合物であるため、その構造や生成経路には不明な点が多い。D-キシロースーグリシンモデル系において Blue-M1 [1]、Red-M1 [2]をはじめとする色素化合物が同定されており、それらはピロロピロール骨格を有し、単独で褐変することなどからメラノイジンの重要な中間体であると推測されている。本研究では、D-キシロース－6-アミノヘキサン酸モデル系において、新奇ピロロピロール化合物の生成を確認し、構造解析を行った。
【方法】　D-キシロースと 6-アミノヘキサン酸を 60%エタノールに溶解し(pH 8.1)、26.5℃にて 24 時間インキュベートした。反応溶液を各種クロマトグラフィーにて精製し、主要化合物を LC-ESI-Qtof-MS、NMR により構造解析を行った。
【結果】　反応溶液をゲルろ過クロマトグラフィーにて高分子画分と低分子画分に分画した。両画分を濃縮後、主要生成物を逆相 HPLC により精製し、高分子画分から赤色色素、低分子画分から黄色色素を得、それぞれ Red-AH1、PPA-AH1 と命名した。LC-ESI-Qtof-MS による質量解析、組成演算の結果、Red-AH1 は分子量 891、組成式 $C_{44}H_{67}N_4O_{15}$ であり、PPA-AH1 は分子量 436、組成式 $C_{22}H_{32}N_2O_7$ であると決定した。NMR による構造解析の結果、Red-AH1 は Red-M1 同様、アゼピン構造、ピロロピロール構造を有する化合物であり、PPA-AH1 は、キシロース 2 分子、6-アミノヘキサン酸 2 分子からなるピロロピロール-2-カルブアルデヒドであった。これらの化合物も Blue-M1 同様ピロロピロール骨格を有していたことは、メラノイジン生成に対するこの骨格の重要性をより示唆するものである。

[1] F. Hayase, et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (8), 1512-1514 (1999)
[2] F. Hayase, et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 73 (10), 2287-2292 (2009)

Maillard reaction, Pyrropyrrole, Pigments

講演番号：3J14a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ J校舎14会場

メイラード反応で生じるフルピペート類ならびにジピロロン類の特徴づけ

Characterization of Furpipates and Dilysyl-dipyrrolones Formed by Maillard Reaction

○増崎 瑠里子、能見 祐理、寺沢 なお子[1]、村田 容常（お茶大院・ライフサイエンス、[1]金沢大・人間科学）

○Ruriko Masuzaki, Yuri Nomi, Naoko Terasawa[1], and Masatsune Murata (Ochanomizu Univ., [1]Kanazawa Univ.)

【目的】フルピペート類（furpipate (**1**), decarboxylated-furpipate (**2**), hydroxymethylfurpipate (**3**), decarboxylated-hydroxymethylfurpipate (**4**)）、ジピロロン類（dilysyl-dipyrrolone A (**5**), dilysyl-dipyrrolone B (**6**)）は、本研究室で見出されたメイラード黄色色素である[1, 2]。これらはフルフラールまたはペントースとアミノ酸との反応で生成する低分子化合物であるが、その食品学的性状は未詳である。ここではこれらの色素類を特徴づけるため、色素特性、呈味性、抗菌活性、抗酸化活性、ACE阻害活性について調べた。

【方法】**1** 及び **2** についてはフルフラールとリジンを、**3** 及び **4** についてはヒドロキシメチルフルフラールとリジンを、**5** 及び **6** についてはキシロースとリジンを、それぞれ 0.5 M 酢酸緩衝液（pH 5.0）に溶解後、加熱反応させ、ODSカラム及びHPLCを用いて調製した。調製した色素類のうち、**5** 及び **6** の呈味性を官能検査により、**1~6** の抗菌活性を合成培地を用いたペーパーディスク法により調べた。また、**1**, **2**, **5** 及び **6** の抗酸化活性をDPPHラジカル消去活性、ORAC活性、ロダン鉄法によるリノール酸酸化測定により、**1~6**のACE阻害活性をACE Kit-WSTにより、調べた。

【結果】各色素の極大吸収波長を比べると、フルピペート類に比べ、ジピロロン類の極大吸収波長の方が長波長側にあった。ジピロロン類では **5** 及び **6** が同じ極大吸収（440 nm）を示し、フルピペート類では **2** に比べ **1** が、**4** に比べ **3** が約 5~10 nm長波長側に極大吸収を示した。色素としての検知閾値は、**1** が 3.0 μg/mL, **2** が 40 μg/mL, **3** が 4.6 μg/mL, **4** が 16 μg/mL, **5** が 2.9 μg/mL, **6** が 3.6 μg/mLであった。**5** 及び **6** は試料濃度 1 %でも呈味性を示さなかった。また、甘味、塩味、苦味、酸味、うま味を混合した五基本味混合溶液に添加した際の味増強効果も認められなかった。抗菌活性は試料濃度 1 mg/mL において全ての色素で見られなかった。抗酸化活性試験では、**5** 及び **6** が Tolox とほぼ同等のDPPHラジカル阻害活性を、ORAC活性ではほぼ半量の活性を、ロダン鉄法によるリノール酸酸化測定では、試料重量 0.1 mg の時、α-トコフェロールの 0.2 mg よりも高い酸化抑制効果を示した。**1** 及び **2** は抗酸化活性を示さなかった。ACE阻害活性では、フルピペート類はいずれも活性を示し、ジピロロン類は活性を示さなかった。

1) Totsuka *et al.*, *Food Sci. Technol. Res.*, **15**, 45 (2009)., 2) Sakamoto *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2065 (2009)

Maillard reaction, Antioxidative activity, ACE inhibition

講演番号：3J14a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ J校舎14会場

5種類の醤油のAEDA法による香気成分の比較

Comparison to the Key Aroma Compounds in Five Types of Japanese Soy Sauce by AEDA

○金子　秀、熊沢　賢二、西村　修（小川香料株式会社　解析研究所）
○Shu Kaneko, Kenji Kumazawa, Osamu Nishimura (Ogawa Co. Ltd. Analytical Laboratory)

【目的】醤油は、最も汎用的な調味料の一つであり、日本ではJAS規格によって5種類（濃口、淡口、溜、再仕込、白）の製品に分類されている。醤油は、色、味とともに香りが品質に重要な役割を果たしており、濃口を中心にこれまで数多くの研究がなされている。近年、Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA)法によるスクリーニングとそれらの鍵成分の定量及びそれらを再構築した溶液の官能評価により、濃口の重要香気成分について詳細な報告がなされている[1)]。他方、JAS規格の他の醤油については、その香気寄与成分に関して、あまり詳細な研究報告がなされていない。そこで本研究では、JAS規格で分類されている5種類の醤油について、AEDA法により香気寄与成分を明らかにし、さらに、香気寄与成分と官能特徴の関係について検討した。
【方法】実験試料は、市販の醤油を使用した。醤油香気濃縮物は、醤油をSP700（三菱化学社製）を充填したカラムに通液し、引き続いて蒸留水、ジクロロメタンを通液して得られたジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、SAFE（Solvent Assisted Flavor Evaporation）蒸留（40℃、<5.0 x 10^{-3}Pa）することにより得た。各醤油の香気寄与成分はAEDAおよびGC-MSを用いて同定した。各醤油の官能評価は、7段階尺度採点法にて行った。
【結果】各醤油香気濃縮物のAEDAにより、新規な成分を含む25の香気寄与成分を明らかにした。これらの中で、3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanone(sotolon)、methionalは全ての醤油香気濃縮物から高いFDファクターで検出され、官能評価におけるcaramel-like、cooked potato-likeな香調がいずれのサンプルにおいても高い値を示したこととよく一致した。また、フェノール系化合物（2-methoxyphenol、4-ethyl-2-methoxyphenol、2-methoxy-4-vinylphenol）は、濃口、溜、再仕込において高いFDファクターを示したが、淡口、白では低い又は非検出であった。このことは、官能評価におけるburnt様な香調が、濃口、溜、再仕込で強く、淡口と白では弱かったこととよく一致した。
一方、濃口の主要香気成分の一つである5(or 2)-ethyl-4-hydroxy-2(or 5)-methyl-3(2*H*)-furanone(HEMF)は、再仕込でも高いFDファクターを示したが、淡口、溜ではやや低く、白では検出されなかった。また、4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone(HDMF)は、濃口、溜で高いFDファクターを示したが、再仕込、淡口では低く、白では非検出であった。
これらの結果は、各醤油の香気には全ての種類に共通する成分と個々の醤油で大きく異なる成分が存在し、濃口の重要香気成分としてよく知られている成分であっても、他の醤油において必ずしも重要な成分ではない可能性が示唆された。

1) Steinhaus et al., *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6262-6269.

soy sauce, aroma extract dilution analysis, methional, sotolon, HEMF, HDMF

講演番号：3J14a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ J校舎14会場

食用ホオズキの香気成分分析

Investigation of volatile compounds in strawberry tomatoes

○阿閉　周之、櫻井　和俊（高砂香料工業（株）研究開発本部）
○Hiroyuki Atoji, Kazutoshi Sakurai (Takasago International Corporation)

【目的】ホオズキはナス科ホオズキ属の植物で、日本では観賞用として馴染み深いが、ヨーロッパや中国においては食用種の果実がフルーツとして一般に食されている。近年では日本でもこれらの品種の栽培が広がりを見せており、各地の特産品として今後期待される食材の一つである。果実は独特の甘い芳香を有しているが、その香気成分についての報告例は少なく、今回詳細な分析を行うこととした。
【方法】山形県産および長野県産の食用ホオズキ果実の香気成分をダイナミックヘッドスペース法（アロマスコープ®法）により捕集・抽出した。得られた香気抽出物はGCとGC/MS分析に供し、成分の同定を行った。
【結果】山形県産・長野県産とも、各種エステル類を主成分として同定したほか、Benzyl methyl ether などのメチルエーテル類を多数同定した。また、山形県産のホオズキからは 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone (Mesifuran) 、 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (Furaneol®: Firmenich SA) 、 5-Ethyl-4-methoxy-2-methyl-3(2H)-franone (Homofuraneol methyl ether)、長野県産のホオズキからもMesifuran などのフラノン類が検出され、食用ホオズキが持つ甘い香りにこれらの成分が寄与していると考えられた。

strawberry tomato, dynamic headspace analysis

講演番号：3J14a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ J校舎14会場

発芽玄米酒粕製パンの香気成分

Flavor constituents of a bread using sake lees with germinated brown rice.

○小木曽　加奈、金子 昌二[1]、中澤　弥子、吉岡　由美、佐藤　晶子、岡崎　光雄[2]（長野県短大・生活科学、[1]長野県工技センター、[2]岡崎酒造）

○Kana Kogiso, Shoji Kaneko[1], Hiroko Nakazawa, Yumi Yoshioka, Akiko Sato, Mitsuo Okazaki[2] (Naganokentandai, Nagano Pref. Gen. Ind. Tec. Cent.[1], Okazaki Brewer[2])

【目的】発芽玄米酒粕は、発芽玄米を原料とする清酒の残さである。これは一般的な清酒醸造過程で精米を経る際に取り除かれてしまう成分が酒粕にそのまま残ると考えられ、機能性に富むことが予想される。我々は食品産業廃棄物の再利用の面から、ぬかや精米粕のでない環境に優しい発芽玄米清酒や産業廃棄物として処理されがちな酒粕を製パン時に添加することで、その有効利用方法を検討している。本発表では、パン作成時に発芽玄米酒粕または吟醸粕を添加したものを使用して官能試験及び機器分析を行い、その香ばしさを比較した。

【方法】製パンは1斤タイプ 自動ホームベーカリー（製品番号SD-BH103-Pパナソニック社製）を用いて2時間コースにて行った。小麦粉の一部代替材料として発芽玄米酒粕、または吟醸粕を用いた。なお、発芽玄米酒粕と吟醸粕の違いは清酒製造の際、発芽玄米酒粕は焙煎発芽玄米（美山錦）を使用し、吟醸粕は精白米（美山錦59%精米）を使用したかである。各酒粕入りパンには強力粉を減量した代わりに発芽玄米酒粕または吟醸粕を10%添加した。水分量は酒粕の水分含量を鑑み、調整をして製パンを行った。官能検査はあらかじめ官能試験を実施し、健康で味覚に問題のない大学生及び教員（全32名）（女性31名、男性1名）を選抜した。比較するそれぞれのパンは上部・下部で差が出ないよう、同じ部位が当たるように調整して被験者に渡し、それぞれ官能試験を行った。統計解析はJMP8.01を用いた。それぞれの項目で等分散ならば分散分析（ANOVA）を、分散が異なる場合にはWelchの検定を行い、それぞれの酒粕入りパンの差を検討した。有意水準は$p<0.05$とした。さらにGC-MSによる成分分析を酒粕、作成したパンの両方で行った。

【結果】官能試験の結果、吟醸粕製パンよりも発芽玄米酒粕製パンの方が「香ばしさ($p=0.0365$)」、「酒粕臭($p=0.0026$)」においてより強くなることが示された。GC-MSで成分分析を行ったところ、22種類の成分が同定された。酒粕の香気成分は吟醸粕の方がethyl caproate、ethyl octanoate、ethyl decanoate、propanolが多く、いわゆる吟醸香と呼ばれる香り成分が多く認められた。一方、発芽玄米酒粕の方ではisobutyl alcohol、isoamyl alcohol、isoamyl acetate、isobutanal、isovaleraldehyde、ethyl hexadecanoateといったウイスキーや泡盛などに検出される香気成分がより多く検出された。発芽玄米を加えて作成したパンは吟醸酒粕を加えて作成したパンよりacetoaldehyde、diacetyl、propanol、dimethyl disulfide、isobutyl alcohol、isoamyl alcohol、phenethyl alcohol、ethyl hexadecanoateが多く、このことが発芽玄米酒粕製パンの香ばしさにも関係しているのではないかと示唆された。

この研究は財団法人ホクト生物科学振興財団の助成を受けたものである。

Sake lees, Germinated brown rice, Flavor constituents

講演番号：3J14a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ J校舎14会場

固相抽出素子（Magic Chemisorber）によるカレーパウダーの香気成分分析

Analysis of volatile flabor compounds in curry powder by GC/MS with a solid phase extraction element (Magic Chemisorber)

○則武智哉、岩本陽二、清水博、吉屋晴夫（(株) UBE科学分析センター）
○Tomoya Noritake, Youji Iwamoto, Hiroshi Shimizu, Haruo Yoshiya (UBE Scientific Analysis Laboratory, Inc.)

【目的】

食品をはじめ化学品原材料などの品質管理において異臭は大きな問題となっており、迅速な原因究明が求められている。このようなニーズに対し、これまで対象材料や匂いの種類・強さによって、ヘッドスペース法、SPME法（固相マイクロ抽出）および固相抽出素子（Magic Chemisorber、以下MCと略す）を選択し、異臭の原因物質の探索を行ってきた。こうした取組みの中、先の大会において、MCを用いた場合、カレーパウダーの香気成分クミナールの感度がヘッドスペース法の100倍以上、スターアニスではアネトールの感度が50倍以上向上したことを報告した。今回、さらにMCを用いてカレーパウダーの香気成分（7成分に着目）を対象に分析条件検討を行った。

【方法】

ヘッドスペース用バイアルビンに試料（カレーパウダー）とMCを加え、所定時間暴露し、香気成分の吸着を行った。吸着後、MCを取り出し、ダブルショットパイロライザー（フロンティア・ラボ製）にて熱抽出を行い、GC/MS（Agilent製 6890Aおよび日本電子製 JMS GC-mate Ⅱ）分析を行った。なお、分析用GCカラムとしては、J&W製 DB-WAX等を用いた。

【結果】

カレーパウダーの香気成分として、リモネン、テレピネン、酢酸、テレピネオールアセテート、クミナール、アネトールおよびオイゲノールに着目した。7成分の検出量を指標に１．カレーパウダーの暴露時間（抽出時間）、２．パイロライザーでの熱脱着時間、３．カレーパウダーの試料量を検討し、操作性を考慮し分析条件の設定を行った。設定した条件にてMC、SPMEおよびヘッドスペース法にて感度を比較したところ、MCが最も感度が高く、次いでSPME、ヘッドスペースの順であった。また、水、メタノールまたはクロロホルム共存下で香気成分の検出感度を比較した。水、メタノール、クロロホルムの順で化合物の検出感度は低くなり、沸点の低い溶媒ほど化合物の検出が阻害されることが分かった。

Magic Chemisorber, SPME, GC/MS

講演番号：3J14a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ J校舎14会場

有機ニンジンの香気成分の特徴

Characteristics of organic carrots flavor

○田中福代、唐澤敏彦、建部雅子（農研機構・中央農研）
○Fukuyo Tanaka, Toshihiko Karasawa, MasakoTakebe (NARO)

【目的】有機栽培作物に対して消費者の好感度は非常に高いと思われる。これまでに，有機野菜の嗜好性の特徴を検証するために，糖，アミノ酸，有機酸，アスコルビン酸を中心に成分含量の分析がなされたが，作物のサイズや窒素吸収経過を揃えるとこれらの一般品質成分に両者の相異は認められず，むしろ生育経過との規則性が示唆された。そこで，演者らは二次代謝産物を含めた総合的な評価を目指し，代謝物プロファイリングを用いて有機農産物の風味の特徴を解析しようとしている。

ニンジンは有機栽培に導入されることの多い作物の一つであり，独特の風味を持つため，ニオイが消費者の嗜好性に及ぼす影響は大きい。このため，まず栽培様式による香気成分プロファイルの特徴を解析し，併せて，香気成分の変動をもたらす栽培上の要因を推定する。

【方法】〈試験区〉 中央農研内圃場に2008年に有機栽培区と慣行栽培区を設け，2011年まで4作の栽培を継続している。この圃場の産物と，つくば市他の既知の農家の有機・慣行栽培と市販のニンジンを収集し，香気成分を分析した。品種は向陽二号とし，11-12月収穫の作型に統一した。

〈試料調製・分析〉 新鮮試料を刻み， 40-50gを秤取し，その20%のNaClを添加，マッシュ状とし，ろ液を試料液とした。この試料液4mlの気相を20mlの専用バイアル中でSPMEファイバー(DVB/CAR/PDMS,2cm) に吸着させ，GC/MS (DB-WAXorDB-5;0.25mm,60m,0.25μm) により分析，成分のプロファイリングを行った。

【結果】〈成分変動の特徴〉 栽培条件により変動の大きい成分として以下の成分が注目された；ethanol, β-myrcene, β-caryophyllene, bornyl acetate, terpinolene, 2-nonenal, thymol methyl ether。また，岐根等の解析結果から，養分吸収における有機資材の効果よりも，無農薬栽培による環境生物と作物の化学相互作用がもたらす効果が大である可能性が示された。

〈栽培法が香気成分プロファイルに及ぼす影響の評価〉 2009年は両栽培法の香気プロファイルの主成分分析の結果に顕著な差は認められなかった。2010年以降になると，中央農研圃場で比較すると，主成分スコアに異なる傾向が認められた。有機転換からの時間経過で土壌に差異が生じ，ニンジンの香気成分が異なり始めたものと推定された。一方，研究所外から収集した試料を含めて解析すると，所内の有機と慣行よりも生産者(生産地)による差の方が大きくなった。市場では多様な条件下での産物が扱われているため，市販のニンジンで栽培法による差異を認めるのは困難であることが推察された。有機栽培の年数につれて香気成分プロファイルの差異が拡大するとすれば，香気成分の変動における栽培様式，生産者や地域，施肥量等の要因の寄与率の推移を評価する必要がある。

今後，水溶性成分のプロファイルや簡易嗜好性テストを併せ，総合的な品質評価を進めたい。

carrot, flavor, organically produced

講演番号：3J14a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ J校舎14会場

石菖葉部の香気成分とその香りの効果

Volatile components in *Acorus Gramineus* and its odor effects for human

○竹下 善庸、田中 彩加、赤壁 善彦（山口大・農・生物機能）
○Yoshihiro Takeshita, Ayaka Tanaka, Yoshihiko Akakabe (Yamaguchi Univ.)

【目的】石菖(*Acorus Gramineus*)は、山野の川岸などに生える多年草で、本州、四国、九州、さらに中国にかけて分布している。古くから、根部は乾燥して漢方薬として用いられ、葉部は風呂湯に浮かべ、あるいは岩風呂において床に敷き詰められて用いられてきた。これらには独特の香気があり、その香気成分に様々な薬理効果が報告されている。しかしながら、石菖葉部の成分組成に関する報告は少ない。そこで今回は、石菖葉部より精油を調製し、その香気成分の同定を行うとともに、その香りのヒトに対する効果を研究目的とした。
【方法】山口県山口市徳地地域で6月と11月に採取した石菖の葉部を用いて、SDE法により精油を調製し、GC-MS分析により成分を同定した。また、得られた精油を嗅いで、生理的変化を確認した。
【結果】石菖葉部より精油を調製し、GC-MSしたところ、主要な香気成分が5-6割含まれていることが分かり、単離して構造決定したところ、β-asaroneであることが判明し、その異性体のα-asaroneも検出された。また、その他成分も同定した。さらに、その香りのヒトに対する生理的変化を測定したところ、興味深い結果を得た。

Acorus Gramineus, volatile, odor

講演番号：3J14a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ J校舎14会場

カモミール精油成分の分析と生理活性

Compositional analysis and bioactivities of the essential oil from chamomile

○見通 真衣[1]、中山 博登[2]、杉本 圭一郎[2]、栗山 磯子[1]、実宝 智子[3]、金沢 和樹[4]、佐々木 芳恵[5]、紙透 伸治[5]、菅原 二三男[5]、吉田 弘美[1,6]、水品 善之[1,6]（[1]神戸学院大栄養・栄養、[2]長岡香料・技開研、[3]千里金蘭大・生活科学、[4]神戸大農・生機化、[5]東理大院理工・応生科、[6]神戸学院大・LSC）

○Mai Mitoshi[1], Hiroto Nakayama[2], Keiichiro Sugimoto[2], Isoko Kuriyama[1], Tomoko Jippo[3], Kazuki Kanazawa[4], Yoshie Sasaki[5], Shinji Kamisuki[5], Fumio Sugawara[5], Hiromi Yoshida[1,6], Yoshiyuki Mizushina[1,6]（[1]Kobe-Gakuin Univ., Dept. of Nutr. Sci., [2]Nagaoka Perfumery Co., [3]Senri Kinran Univ., [4]Kobe Univ., [5]Tokyo Univ. of Sci., [6]Kobe-Gakuin Univ., LSC）

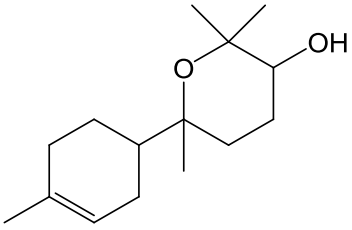
【目的】ハーブやスパイスなど食品として利用される植物の香気成分には、抗菌作用やリラックス（ストレス緩和）作用などが知られている。植物精油の哺乳類由来DNA合成酵素（DNAポリメラーゼ，pol）に対する阻害活性を測定し、精油中成分の新規な生理活性と健康機能性の探索を行った。

【方法】植物由来の精油20種類（オレンジ、カモミール、キャラウェイ、キャロット、クミン、クラリセージ、グローブ、シトロネラ、サンダルウッド、スペアミント、セイジ、セロリシード、ナツメグ、タイムレッド、バジル、マジョラム、ユーカリ、ライム、レモン、レモングラス）は、水蒸気蒸留法により抽出された市販品を使用した。哺乳類のpolは精製酵素を準備して、*in vitro*で活性測定を実施した。抗酸化活性はL-ORAC法で測定した。ヒト大腸がん細胞（HCT116 cells）増殖抑制活性はWST-1法で測定した。ラット好塩基球性白血病（RBL-2H3）細胞における脱顆粒反応抑制活性は、顆粒に含まれるβ-ヘキソサミニダーゼの遊離量で評価した。抗炎症活性はマウス耳へ起炎剤TPAの塗布による浮腫重量差から測定した。

【結果】20種類の精油において、DNA複製型のpolα阻害活性とヒトがん細胞増殖抑制活性に相関が見られたが、DNA修復・組換え型のpolλ阻害活性とは相関が見られなかった。RBL-2H3細胞における脱顆粒反応抑制活性は、polλ阻害活性とやや相関があった。抗酸化活性については、pol阻害活性、がん細胞増殖抑制活性、およびRBL-2H3細胞における脱顆粒反応抑制活性との相関性が見られなかった。

用いた20種類の精油のうち、カモミール（ジャーマンカモミール：*Matricaria chamomilla* L.，エジプト産，シャラボ社，仏）がこれらの活性を強く阻害した。GS/MSによりカモミールの成分を分析したところ、少なくとも222成分が検出され、うち83成分を同定した（同定率90.01%）。α-Bisabolol oxide A【図１】が主要成分（37.90%）であり、本物質は、α-Bisabolol（カモミール精油中の1.93%）よりも強いpolαとλ阻害活性、ヒト大腸がん細胞増殖抑制活性を示した。

α-Bisabolol oxide Aを高含有するカモミール精油は、pol阻害活性に基づく抗がん・抗炎症機能性が期待できる。



【図１】α-Bisabolol oxide A

Chamomile, alpha-Bisabolol oxide A, Bioactivity

講演番号：3J14a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ J校舎14会場

北海道産赤ワインにおける特徴的な香気成分の探索
Studies on characteristic aroma components of Hokkaido red wine

○曽 少豊、妙田 貴生、戸枝 一喜、西澤 信、中川 純一、藤森 嶺
（東農大生物産業・食香）
○Shao Feng Tseng, , Takao Myoda, Kazuki Toeda, Makoto Nishizawa,
Junichi Nakagawa, Takane Fujimori
(Faculty of Bio-Industry, Tokyo University of Agriculture.)

【目的】
ブドウ果汁を発酵して得られるワインは，原料，酵母，製造法の組み合わせにより多様な製品が生み出される。製品により色調や香味は異なるが，とくに香味に関わる香気は製品を特徴付ける重要な要素と考えられている。ワイン香気に関する研究は数多くされてきたが、ワインらしい香気示す特定の成分は未だに明らかにされていない。そこで本研究は，北海道産赤ワインを試料として種々の方法で香気成分を抽出し，機器分析と官能評価を駆使して特徴的香気の特定を試みた。
【方法】
北海道赤ワインの香気成分を Prapak Q を用いたカラム濃縮法，Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) および Head Space Sorptive Extraction (HSSE) 法で捕集し，GC-MS に供して成分を分析した。また，GC-O (Gas Chromatography–Olfactometry) 分析を実施して Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) および Original Aroma Simultaneously Input to the Sniffing port method (OASIS) 法で重要香気を特定した。
【結果および考察】
種々の方法により抽出した北海道産赤ワインの香気成分を比較したところ，塩析処理を組み合わせたシーケンシャル SBSE 法を適用することで，効率よく香気成分を抽出できることが明らかとなった。次に，GC-O 分析を実施して AEDA および OASIS 法により重要香気成分の選別を試みた。その結果，2, 3 ブタンジオール、2-フェニルエチルアルコール、メチオノール、コハク酸ジエチル、青葉アルコール、4-エチルアセトフェノン、ベンジルアルコール、γ-ブチルラクトン、ヘキサン酸、4-エチルフェノール、酢酸、イソプロパンノール、イソアミルアルコールおよび 4-エチル-2-メトキシフェノールの計 15 重要香気成分を選別した。現在はこれらの結果に基づいて北海道産赤ワイン香気の再構成を試みており，官能検査を組み合わせて特徴香気を明らかにしていく。

SBSE、HSSE、wine aroma

講演番号：3J14a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ J校舎14会場

NIRSによって計測される唾液腺活動に伴う血流変化に対する鰹節フレーバーの添加効果

Added flavorings enhance salivary hemodynamic responses to tastes detected by near-infrared spectroscopy -Flavor creation using optical imaging-

○松本 知奈、齋藤 佳奈、中村 明朗、斉藤 司、南木 昂、伏木 亨[1]、森 憲作[2]（長谷川香料（株）・総合研、[1]京大院・農、[2]東大院・医）

○Tomona Matsumoto, Kana Saito, Akio Nakamura, Tsukasa Saito, Takashi Nammoku, Tohru Fushiki[1] and Kensaku Mori[2] (R&D Center, T. Hasegawa Co., Ltd., [1]Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)

【目的】鰹だしにおける風味には香りの寄与が大きく、鰹節の香りがだしの味と相互作用することにより風味が大きく増強して感じられる。我々は鰹節の香りがNIRSで計測されるだし味に対する応答を増強することを報告したが、NIRSによりこめかみ部付近から計測される味覚刺激による応答には、唾液腺活動が大きく反映されることが示されている。よって鰹節の香りは味覚との相互作用により唾液腺活動を増強することが示唆される。本研究では、この増強が鰹だしの香りと味の組合せにより生ずる現象と考え、鰹節の香り添加により風味増強を感じた被験者群と感じなかった被験者群について、唾液腺活動に伴う血流変化（唾液腺応答）を計測した。更に、鰹節抽出物から見出した新規重要香気成分(4*Z*,7*Z*)-4,7-Tridecadienalに着目し、その添加効果をNIRSにより捉えられるか検討した。

【方法】だしの味成分のみで構成しただし溶液（N）、だし溶液に鰹節リコンストフレーバーを添加しただし溶液（F）、更に(4*Z*,7*Z*)-4,7-Tridecadienalを加えた鰹節フレーバーを添加しただし溶液を呈示試料とした。10名の被験者に各試料の風味評価をするタスクを課し、だし溶液（N）を呈示した約5分後に上記3種類の試料を未知試料として呈示した際の官能評価中の血流変化を、光トポグラフィ装置ETG-4000（㈱日立メディコ社製）により測定した。タスク中30秒間に計測された血流変化量を応答の大きさとして、各ピーク比（各試料に対する応答の大きさを、前に飲用しただし溶液（N）に対する応答の大きさで割った値）を用いてだし溶液（N）とフレーバー添加だし溶液の応答を比較した。

【結果】だし溶液（N）に鰹節リコンストフレーバーを添加したところ、風味増強を感じた被験者A群でのみフレーバー添加によりだし味に対する応答が増強した。更に、鰹節から新たに見出した重要香気成分(4*Z*,7*Z*)-4,7-Tridecadienalを加えると添加効果を感じなかった被験者B群も風味が増強したと感じるようになり、この時、A,B群共に(4*Z*,7*Z*)-4,7-Tridecadienal含有鰹節フレーバーの添加によりだし溶液に対する唾液腺応答が増強した。(4*Z*,7*Z*)-4,7-Tridecadienal添加による風味増強と唾液腺応答の増強には正の相関があることがNIRSにより捉えられた。本研究の結果は、NIRSで計測される唾液腺応答が被験者の食経験に基づく味とにおいの相互作用に影響を受けることを示す。特に(4*Z*,7*Z*)-4,7-Tridecadienalを含む鰹節フレーバーは高い風味増強効果を有し、重要香気成分は1成分でも唾液腺活動に大きく影響することが示された。

NIRS, saliva, dried bonito

講演番号：3J14a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ J校舎14会場

鶏だしの品質に寄与する香気成分の選定

Identification of volatile flavor compounds affecting to the quality of chicken soup stock

○高倉友紀子、林和寛、水島まゆこ、増沢拓也（味の素　食品研究所）
○Yukiko Takakura, Kazuhiro Hayashi, Mayuko Mizushima, Takuya Masuzawa (Institute of Food Sciences & Technologies, Ajinomoto Co., Inc.)

【目的】
　鶏だしは、中華料理の湯（たん）を初めとしてチキンブイヨンなど洋風調理にも使用され、食のベースとなるものである。しかし、鶏だしの品質に寄与している香気成分についての定量的な解析はあまり行われていない。本研究は、鶏だしの品質に寄与する香気成分を選定することを目的とする。

【方法】
＜鶏だしの調製法＞
　カットした丸鶏を下茹で後、あくや内臓を取り除いて前処理した。前処理した丸鶏の１．６倍量の水を寸胴鍋にいれ沸騰するまで強火で加熱し、沸騰したら弱火にしてあくを取り除きながら４時間煮込んだ。煮込んだ液をろ過し、鶏だしとした。
＜香気分析＞
　調製した鶏だしを水蒸気蒸留法及び、鶏だしエーテル抽出物のSAFE蒸留法により、香気濃縮物を調製した。調製した香気濃縮物はGC-MSとGC-においかぎ法により解析した。

【結果】
＜寄与香気成分の選定＞
　鶏だし香気成分の抽出法を検討した結果、元の鶏だしの風味が最もよく再現された水蒸気蒸留法を選定した。AEDA(Aroma Extract Dilution Analysis)法により抽出液中の香気寄与度の高い化合物を選定。各成分の鶏だしへの添加評価から、品質への寄与が高い成分を絞り込んだ。
＜選定香気成分の効果確認＞
　鶏だし中に含まれる各成分の濃度を定量し、希釈した鶏だしに各成分を添加して評価することにより、鶏だし風味の再現性を確認した。また、各成分の配合バランスや濃度による、風味特性の変化についても検討した。

chicken soup stock, flavor compound

講演番号：3J14a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ J校舎14会場

ベタレインがマウス悪性黒色腫細胞のメラニン形成に及ぼす影響

Inhibitory effects of cactus-derived betalain on the melanogenesis in melamoma cells.

○渡邊 智之[1]、堤 千香子[2]、香川 祐輝[1]、田辺 渚[2]、細野 崇[1,2]、川上 忠夫[3]、
関 泰一郎[1,2]、有賀 豊彦[1,2]
([1]日大院・応生科、[2]日大・生命化、[3]株式会社リバー食品)
○Tomoyuki Watanabe[1], Chikako Tsutsumi[2], Yuki Kagawa[1], Nagisa Tanabe[2], Takashi Hosono[1,2],
Tadao Kawakami[3], Taiichiro Seki[1,2], Toyohiko Ariga[1,2] ([1,2]Nihon University, [3]River Foods Co Ltd.)

【目的】Prickly pear cactus (cactus) は北米からメキシコにかけて広がる乾燥荒野に散在し自生するヒラウチワサボテン亜科（Opuntidae）に属する *Opuntia engelmannii* の濃赤色の美味な果実である。Cactus は、ドーパミンを起源とする強力な抗酸化成分ベタレイン（betalain）を含有している。本研究では、この betalain の機能性を明らかにすることを目的として、betalain のメラニン形成抑制効果およびその作用メカニズムについてマウス悪性黒色腫細胞 (B16F10 メラノーマ細胞) を用いて検討した。

【方法】α-MSH によりメラニン合成を誘発した B16F10 メラノーマ細胞に betanin とそのアグリコンである betanidin を4日間添加培養後、細胞溶解液の405 nm の吸光度を測定し、メラニンを定量した。また、細胞溶解液中のチロシナーゼ活性を L-DOPA を基質として測定し、チロシナーゼタンパク質はウエスタンブロッティングにより解析した。また、マッシュルームチロシナーゼおよび未処理の B16F10 メラノーマ細胞由来チロシナーゼ活性に及ぼすbetalain の影響についても検討した。

【結果】B16F10 メラノーマ細胞のメラニン生成量およびチロシナーゼ活性は betalain の濃度依存的に減少した。このことから、betalain は B16F10 メラノーマ細胞におけるチロシナーゼ活性を減少させてメラニン形成を抑制することが明らかになった。一方、B16F10 メラノーマ細胞におけるチロシナーゼのタンパク質発現は betalain 添加・非添加群間に差異はなく、betalain はチロシナーゼタンパク質発現には影響しないことが確認された。

これらの結果から、B16F10 メラノーマ細胞において、cactus 由来の betalain は、チロシナーゼによるチロシンの酸化に対して基質アナログとして作用し、活性を阻害することにより、メラニン形成を抑制することが示唆された。

Keyword：betalain, melanin, tyrosinase

講演番号：3J14a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ J校舎14会場

熟成中の赤ワインの色素重合体の変化

Changes in Polymeric Pigments of Red Wines during Bottle Storage

○藤原 陽、久本 雅嗣、鈴木 淳平、斉藤 史恵、奥田 徹（山梨大・ワイン研）
○Akira Fujiwara, Masashi Hisamoto, Junpei Suzuki, Fumie Saitoh, Tohru Okuda (University of Yamanashi)

【目的】赤ワインの赤色は、ブドウ果皮から溶出するアントシアニンに由来する。しかし、熟成が進むにつれてブドウ由来のアントシアニンは減少し、醸造後数年経過するとほとんどなくなり、色調も熟成によって赤色から赤褐色へと変化する。この色調の変化は、アントシアニンが非酵素的酸化を受けたり、他のフラボノイドやカルボニル化合物、タンニンなどと反応して、色素重合体（ピラノアントシアニン、アントシアニンータンニン高分子複合体）が形成され、ワインの品質に密接に関連している。本研究は、カベルネ・ソーヴィニヨン及びマスカット・ベリーAワインなどの赤ワインに含まれるアントシアニンや色素重合体の化学構造やその量について調べ、どのくらい赤ワインの色に貢献しているかを検討し、赤ワインの品質をより安定・向上させることを目的とする。
【方法】赤ワイン中の色素成分の経年変動を観測するため、2000年～2009年に山梨大学ワイン科学研究センターで製造し、15℃で1.8 Lのガラス瓶中に保存しているカベルネ・ソーヴィニヨンとマスカット・ベリーAのワインを試験試料とした。それぞれのワインを１年ごとに３年間、420、520、620 nmの吸光度、Color hue、Color intensity、Wine color in acid、Polymeric pigment color、全フェノール量、全アントシアニン量及び超高速液体クロマトグラフィー－飛行時間型質量分析装置（UPLC-DAD-TOFMS）でワイン中に含まれる各成分の定性・定量分析を行った。また、赤ワインからアントシアニンータンニン高分子複合体を各種クロマトグラフィーで分離し、その部分構造の解析を行った。
【結果】製造年が新しいワインは、ブドウ由来のアントシアニン（主にMalvidin 3-*O*-glucosideやMalvidin 3-*O*-(6-acetyl)-glucoside）が赤色色素成分の全体の約90％を占めていて、時間が経過するにつれて、ブドウ由来のアントシアニンが減少し、Vitisin Aなどのピラノアントシアニンやアントシアニンータンニン高分子複合体が赤色色素成分の全体の多く占めてくることが認められた。ピラノアントシアニンは、赤ワインの発酵中に形成され、時間が経過してもその量に変化はなかった。同じ製造年でも時間が経過すると、アントシアニンータンニン高分子複合体が多くなることが分かった。また、精製したアントシアニンータンニン高分子複合体は、赤褐色を呈していることから、アントシアニンータンニン高分子複合体が、赤ワインの色調に大きく影響を及ぼしていることが考えられた。

Wine, Anthocyanin, Polymeric Pigments

講演番号：3J14p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ J校舎14会場

桑実中の機能性ポリフェノールの研究

Investigation of functional polyphenols in mulberry fruit

○阿部　麻里奈、安岡　顕人（前橋工科大・工）
Marina ABE, Akihito YASUOKA

【目的】桑は漢方や茶として利用されてきた。樹皮にはプレニルフラボノイドやクマリン、葉にはイソクエルシトリンなどが含まれており、消炎、利尿、鎮咳などの効果が報告されている。一方、果実の有効成分に関する研究は少ない。最近、植物ポリフェノールの一部が核内受容体の活性化を通じて様々な生理作用を表していることが示されつつある。なかでも CAR と PXR は生体異物を認識し、p450 酵素や輸送体の遺伝子を活性化することにより解毒を促進している。最近では、脂質代謝を含めたエネルギー代謝も制御していることが報告されている。本研究では核内受容体 CAR の活性化を指標として桑実中の解毒や脂質代謝を促進するような成分を見出し、桑実を用いた食品産業の活性化に貢献することを目標としている。
【方法】桑実は前橋市内の生産者に提供を依頼した。まず凍結した桑実を破砕し、n-ヘキサンで脂質を除去しメタノールで不溶性成分を抽出した。さらにこれを濃縮した後、酢酸エチルと水を加え、濃縮物を溶かした。酢酸エチルを除去し水溶性成分を得て、水飽和ブタノールを用いて成分を抽出し、これを濃縮してフラボノイドやアントシアニジンなど含むポリフェノール粗抽出物を得た。途中、メタノール濃縮前に塩酸処理することにより、配糖を除去した粗抽出物も得た。これらを希釈し、アセトニトリル5から45％を60分かけて流すという条件を設定したHPLCを用いて分析し、約１５画分分離した。HepG2細胞にレポーター遺伝子（PBREM-PGL、TK-PhRL）とCAR発現ベクター（mCAR、ｈCAR）を導入し、分離したこれらの画分とポジティブコントロール(mCARにはTCPOBOP、ｈCARにはCITCO)を用いて48時間処理したのち、細胞を溶解してルシフェラーゼアッセイによりCARの活性化能を検討した。
【結果】桑実から得たポリフェノール粗抽出物を HPLC を用いて分析した結果、配糖を除去しない粗抽出物では大きなピークが 8 個と配糖体と思われる小さなピークがいくつか検出された。配糖を除去した粗抽出物では大きなピークは 4 個検出された。フラボノイドの純品（cyanidin 3-o-rutinoside、chrysin、galangin、quercetin）の HPLC 分析結果と比較したところ、桑の実にはシアニジンが主要成分として含まれていることが推定された。配糖を除去していない粗抽出物の約 15 の画分のうち８分画について、核内受容体 CAR 活性能の分布を検討したところ、細胞毒性が多少出た分画があった。今後、配糖を除去した粗抽出物の核内受容体 CAR 活性能の分布を検討すると共に、桑の実中の核内受容体 CAR 活性成分の同定を行う予定である。

Mulberry, Flavonoid, HepG2 cell

講演番号：3J14p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ J校舎14会場

タイトル　*Lactobacillus plantarum* OLL2712の脂質代謝改善効果に関する研究
Title　The effect of *Lactobacillus plantarum* OLL2712 to improve lipid metabolism.
○利光　孝之、北　純子、池上　秀二（株式会社明治　食機能科学研究所）
○Takayuki Toshimitsu, Junko Kita, Shuji Ikegami (Meiji Co., Ltd. Food Science Research Labs.)

【目的】脂肪細胞が産生する adiponectin は脂肪組織の慢性炎症に対する抗炎症効果が認められ、脂質代謝を亢進して脂肪の蓄積を抑制することから、メタボリックシンドロームの改善には脂肪細胞からの adiponectin の分泌を増加させることが重要である。一方、免疫系細胞が産生する抗炎症性サイトカインである IL-10 の増加は脂肪組織及び全身性の慢性炎症を緩和し、メタボリックシンドロームを改善することが示唆されている。そこで、本研究では脂肪細胞の adiponectin 産生を促進し、かつ免疫系細胞の IL-10 産生も促進する乳酸菌を選抜し、肥満・糖尿病を発症する KKAy マウスでの効果を検証した。
【方法】当社が保有する*Lactobacillus*属乳酸菌の中から、プロバイオティクス特性に特に優れた23株を選抜し、スクリーニングに用いた。脂肪細胞のモデルである3T3-L1細胞にTNFαを添加して炎症を誘導した場合と非添加の場合のそれぞれについて、各種乳酸菌の脱脂粉乳培養上清を添加し、adiponectin及び抗酸化酵素遺伝子発現量を測定した。また、各種乳酸菌の生菌体又は加熱死菌体をマウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)及びマウス腹腔由来マクロファージ細胞に添加し、IL-10産生量に及ぼす影響を調べた。さらに、特にadiponectin及びIL-10産生促進効果が高い乳酸菌株を選定し、KKAyマウスに乳酸菌脱脂粉乳培養物を3週間経口投与した。週一回4時間の絶食後に尾静脈より採血し、血糖値、血中中性脂肪値を測定した。解剖時に内臓脂肪重量と内臓脂肪組織のadiponectin及び抗酸化酵素遺伝子発現量を測定し、糞便や脂肪組織由来マクロファージについても解析を行った。
【結果】3T3-L1細胞のadiponectin及び抗酸化酵素遺伝子の発現量を有意に促進し、IL-6発現量を抑制する乳酸菌として、*L. plantarum* OLL2712を見出した。また、OLL2712の菌体はBMDCやマクロファージのIL-10産生を最も強く誘導することが明らかとなり、肥満による慢性炎症を緩和してメタボリックシンドロームを改善する可能性が示唆された。さらに、OLL2712の脱脂粉乳培養物をKKAyマウスに経口投与したところ、脂肪組織のadiponectin及び抗酸化酵素遺伝子の発現量を有意に促進し、血中の炎症性サイトカイン濃度を有意に低減した。また、内臓脂肪の蓄積を有意に抑制し、血中中性脂肪及び遊離脂肪酸も有意に抑制した。なお、乳酸菌投与期間中の摂餌量に群間の差はなかった。以上の結果より、*L. plantarum* OLL2712はメタボリックシンドロームを改善する可能性を持った乳酸菌であることが示唆された。現在、KKAyマウスの腸内菌叢や脂肪組織のマクロファージ浸潤に乳酸菌が及ぼす影響について解析を行っている。

Keyword1 *L. plantarum* OLL2712,　Keyword2 adiponectin,　Keyword3 IL-10

講演番号：3J14p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ J校舎14会場

トマト種子由来サポニンの含有量と血中コレステロールに及ぼす影響

The content of tomato seed origin saponin, and the influence to the blood cholesterol level

○山中 孝雄[1,2]、木下 恵美子[1]（[1]キッコーマン 研究開発本部、[2]日本デルモンテ）
○Takao Yamanaka[1,2]、Emiko Kinoshita[1]（[1]Kikkoman R&D, [2]Nippon Del Monte）

【目的】トマトは世界で最も多く栽培、消費されている野菜であり、多様な栄養成分を含むことから、その機能性について広く研究がなされてきた。我々は、トマト果実に含まれるサポニンの機能性研究を進める過程で、トマト種子中に Tomatoside A や Dehydrotomatoside が偏在することを確認した。Tomatoside A は、*in vitro* 試験においてコレステロール吸着能を示すとともに、マウスへの混餌投与試験において、高コレステロール食による血中コレステロール濃度の上昇を抑制する効果が観察された[1)]。しかしながら、トマト種子由来のサポニンに関しては、その含有量や生理機能などまだ明らかになっていない点が多い。本研究では、トマト果実中の Tomatoside A 含有量を測定するとともに、その生理機能である血中コレステロール上昇抑制作用について、より詳細な調査をおこなった。
【方法】5品種のトマト果実中に含まれる種子重量を測定し、各品種のTomatoside A含有量をLC/MS/MSを用いて測定した。6週齢のC57BL6雄性マウスを4群に分け、高コレステロール食（1%コレステロール、及び0.2%コール酸ナトリウムを含む）を対照に、混餌率0-0.1%となるように、Tomatoside Aを28日間混餌投与した。混餌投与期間中、7日ごとに採血して血液中の総コレステロール濃度を測定するとともに、投与期間終了後にHDLコレステロール濃度を合わせて測定した。また、投与期間終了前に糞の回収、投与期間終了後に肝臓の摘出をおこない、糞中および肝臓中の総コレステロール量を測定した。さらに、肝臓よりRNAを抽出して、RT-PCR法によりコレステロール代謝に関与する酵素のmRNA発現量を測定した。
【結果】トマト果実１個あたりのTomatoside A含有量は約1-5mgであり、品種間に差がみられた。また、Tomatoside A含有量は、トマト果実中の種子重量に概ね依存する傾向であった。Tomatoside Aを混餌投与したマウスでは、高コレステロール食による血中の総コレステロール濃度の上昇が抑制され、その効果は混餌率0.004%でも確認された。Tomatoside A を混餌投与したマウスでは、糞中のコレステロール排泄量が多く、一方で肝臓では、コレステロールの蓄積量が有意に少なかった。Tomatoside A 混餌マウスでは、肝臓でコレステロールの代謝に関与する酵素であるCholsterol-７α-hydroxylaseのmRNA 発現量が有意に高いことがわかった。これまでに得られた試験結果から、トマト種子由来サポニンであるTomatoside Aのコレステロール上昇抑制作用は、コレステロール吸収阻害と代謝促進が複合的に作用することにより、その有効性を発揮している可能性が考えられた。
1)山中ら 日本農芸化学会2011年度大会

tomato, saponin, cholesterol

講演番号：3J14p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ J校舎14会場

マクサ抽出物の破骨細胞形成抑制作用

Suppressive effect of Ceylon moss extract on osteoclast formation in vitro.

○ 高山真規子、三和敬明、呉静[1]、伏見圭司[1]、崔宰熏[1]、西本壮吾、中村健一郎、小山智之、河岸洋和[1,2]、矢澤一良（東京海洋大院、[1]静大院・創造、[2]静大農・応生化）

○ Makiko Takayama, Takaaki Miwa, Jing Wu[1], Keiji Fushimi[1], Jae-Hoon Choi[1], Sogo Nishimoto, Kenichiro Nakamura, Tomoyuki Koyama, Hirokazu Kawagishi[1,2], Kazunaga Yazawa(Tokyo University of Marine Science and Technology, [1]Educational Division, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

【目的】高齢社会が抱える問題の一つに、著しい骨粗鬆症患者数の増加があげられる。全骨粗鬆症患者の約8割を占める閉経後骨粗鬆症は、主に更年期以降の女性が罹患する。骨粗鬆症は骨折リスクを上昇させるだけでなく、骨折をトリガーとした複合的な疾患に繋がることが問題視されている。我々は、日常の食生活から骨粗鬆症を予防することが重要であると捉えている。そこで、骨粗鬆症予防効果を示す天然物由来成分の探索を目的とし、海藻を中心に様々な天然物を対象としたスクリーニングを行ったところ、マクサ抽出物が骨代謝に関連することを見出した。

【方法】MC3T3-E1骨芽細胞株と骨髄細胞の共培養系にマクサ抽出物を添加し、培養を行った。骨髄細胞から破骨細胞形成への指標である酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（TRAP）を染色し、陽性を示す多核破骨細胞数を計測した。また、卵巣摘出(OVX)操作により、体内エストロゲン量を減少させた骨粗鬆症モデルマウスを作製し、マクサ抽出物を30日間経口投与した。投与終了後、大腿骨の乾燥重量、及び海綿骨存在範囲を計測し、マクサ抽出物の骨吸収抑制能を評価した。

【結果】マクサ抽出物は、濃度依存的にTRAP活性を抑制することが明らかとなった。また、OVXマウスへのマクサ抽出物の投与により、骨量減少の抑制、及び海綿骨存在範囲の拡大が誘導された。

【考察】マクサ抽出物は、骨髄細胞から破骨細胞への形成抑制能、及びOVXマウスの骨量減少の抑制能を示すことから、生体内においても破骨細胞形成を抑制することが強く示唆され、結果として骨量減少を抑制していると考えられる。現在、マクサ抽出物より、破骨細胞形成に対して抑制作用を示す活性成分の同定を進めている。

osteoclast, Ceylon moss, health foods

講演番号：3J14p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ J校舎14会場

水環境浄化型植物「ヒシ」の高機能性素材としての可能性

Possibility as high physiological function of water environment purification type plant "*Trapa japonica*"

○武富 和美、安田 みどり[1]、日野 まど香[1]、宮山 瞳[1] （西九大・短大、[1]西九大・健栄）
○Kazumi Takedomi, Midori Yasuda[1], Madoka Hino[1], Hitomi Miyayama[1]（Nishikyudai・Junior College, [1]Nishikyudai・Health and Nutrition Sciences）

【目的】水草の一種であるヒシ（*Trapa japonica*）は、一年草の水草で、池沼やクリークに生育している。ヒシは、水中の窒素やリンなどの栄養塩を吸収して、アオコや淡水赤潮の発生を抑制することから、水質浄化と環境保全に役立つ水環境浄化型植物として知られている。佐賀平野や筑後平野の川やクリークには、昔からヒシが自生しており、その実を茹でて食用とするだけでなく、様々な疾病の民間薬としても用いられてきた。最近では、焼酎の原料にも利用されたりしている。本研究では、本来は廃棄される部位であるヒシの実の外皮について様々な生理機能性を調べ、高機能性素材として利用価値があるかについて検討した。

【方法】試料として佐賀県産のワビシ、オニビシ、福岡県産のトウビシを用いた。乾燥したヒシの実の外皮を熱水にて抽出し、凍結乾燥したものを実験に供した。なお、比較として緑茶（煎茶）を用いた。試料中の総ポリフェノールの定量および抗酸化能は、それぞれフォーリン・チオカルト法、DPPH（2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl）ラジカル補足活性法にて測定した。糖質分解酵素の阻害活性は、α-アミラーゼ、α-グルコシダーゼに対するヒシの外皮の阻害活性を調べた。また、リパーゼおよびアンジオテンシン変換酵素（ACE）の阻害活性は、それぞれ、リパーゼキットS（DSファーマバイオメディカル株式会社）、ACE Kit-WST（同仁化学研究所）を用いて調べた。また、美白作用の一つであるチロシナーゼ阻害活性については、L-チロシンを基質として用い、分光光度法により測定した。

【結果】ヒシの外皮乾燥物中の総ポリフェノール含量は、ワビシ、オニビシ、トウビシ、緑茶それぞれ、9.8、12.2、12.0、10.5 g／100 gであった。DPPHラジカル補足活性は、ポリフェノール含量に依存し、いずれも緑茶に匹敵するほどの高い抗酸化活性を示した。また、ヒシの外皮は、いずれの種類においてもα-アミラーゼ、α-グルコシダーゼ、リパーゼ、ACEの阻害活性を示し、これらの活性は緑茶に比べて高かった。また、チロシナーゼの阻害活性も認められた。以上のことから、ヒシの外皮は、高機能性素材として、生活習慣病の予防を目的とした食品、美白を目的とした化粧品等への利用が期待される。

Trapa japonica, polyphenol, physiological function

講演番号:3J14p07
講演日時、会場:3月24日15:05～ J校舎14会場

*in vitro*での食品成分によるストロンチウムの吸着特性

in vutro Adsorption property of food constituent

○八並一寿（玉川大・農）
○Kazuhisa Yatsunami (Tamagawa Univ.)

【目的】福島原発事故で環境に放出された放射性元素による食品汚染で、体内被曝が問題とされる。演者は、洗浄などの処理をした食品、吸着作用を示す食品、放射線防御作用が知られる食品、便通促進作用のある食品やその成分を除染食品定義した1)。本研究では、除染食品の機能性判定手段の一つとして、安定ストロンチウムと食品成分との吸着活性を検討した。

【方法】標準Srは、0.1%となるように炭酸ストロンチウムを0.1mol/L硝酸水溶液に溶解した。この母液のpHを1MのNaOHとHClで調整した。市販50ml溶PP製遠心管に、Sr濃度が50～100μg/mlになるように調製した溶液を25ml入れ、これに食品成分を0.01g～0.50gを秤量して加え、卓上振とう機で15分間振とうした。振とう後、10000rpm、１分遠心した上澄を試験溶液とした。Srの定量は、o-クレゾールフタレインコンプレクソンによるCa定量プロトコル2)に準じた。o-クレゾールフタレインコンプレクソン40mg、ジエタノールアミン250ml、ジエチルアミン250ml、ポリビニルピロリドン1.0g、8-ヒドロキシキノリン1.25gを混合し、褐色ビンに保存した。測定は、試験溶液50μｌ、2.5ml蒸留水、0.5ml反応溶液をよく混合し、10分後にブランクを対照として、570nmの吸光度を測定した。

【結果】食品成分として試薬のアルギン酸ナトリウムのSr吸着量(pH7)を検討した。0.1gの添加量まで添加量と吸着量が直線関係を示し、この曲線の傾きから1g当りの吸着量を求めた。アルギン酸を含む食品の例として、沖縄産乾燥もずくとSrの吸着量を比較したところ、アルギン酸の吸着量はもずくよりも高かった。なおアルギン酸は、0.05ｇ以上ではCaの減少量が認められず、Srは良好に吸着するが、Caはほとんど吸着しなかった。吸着時のpHを２～９まで変化させてSrの吸着量の変化を検討したところ、アルギン酸はpH２とpH９で吸着量は低下するが、pH５やpH６でのSrの吸着は高く、もずくも同様の傾向を示した。試薬のアルギン酸のSr吸着量は、試薬のペクチンよりも高かった。pH５やpH６でのSrの吸着も、アルギン酸の方が高かった。

【考察】体内被曝の除染効果は、アップルペクチンで報告されている3)。本研究で、試薬ではあるが、アルギン酸ナトリウムのSrの吸着量が、ペクチンより高かったことは、アルギン酸を含む海藻類が効果的な除染食品素材となる可能性を示唆した。

1)八並：FOOD Style21、15(6)17(2011) 2) 西口他：近畿中国四国農業研究センター研究報告、(6) 141 (2007) 3)Nesterenko *et al.*：Annals of the New York Academy of Science1181:303 (2009)

strontium, foodstuffs, adsorption

講演番号：3J14p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ J校舎14会場

鶏卵白プロテアーゼ分解物による抗疲労効果

Anti-fatigue effect by protease digest of chicken egg white

○釣木　隆弘、渡部　耕平、田辺　聖子、木村　守、増田　泰伸（キユーピー（株））
○Takahiro Tsuruki, Kohei Watabe, Kiyoko Tanabe, Mamoru Kimura, Yasunobu Masuda (Kewpie Corporation)

【目的】鶏卵白をプロテアーゼで処理した加水分解物は、in vitroおよびin vivoで抗酸化作用を示すことを確認している。卵白加水分解物の消化管吸収性の確認を行うとともに、活性酸素の低減によって期待できる抗疲労効果の確認を行った。
【方法】消化管吸収性の確認にはSDラット（♂、7週齢）を用いた。絶食16時間後、卵白加水分解物を1,000 mg/kg body weightずつ経口投与した後、経時的に門脈より採血し、血中アミノ酸濃度を測定した。抗疲労効果の確認にはddYマウス（♂、7週齢）を用いた。AIN-93G組成を基礎とした飼料に卵白加水分解物を20%混合し、14日間与えた。対照にはカゼインもしくは卵白を20%与えた。摂取11日目から14日目まで毎日、体重の15%のおもりをつけて水泳をさせ、水泳持続時間の測定を行った。
【結果】卵白加水分解物の経口投与後1時間までの吸収性を卵白と比較したところ、有意に高い吸収がみられた。また、抗疲労効果では11日目以降、卵白加水分解物を摂取した群では、カゼイン、卵白に対して有意に長い水泳時間を示し、14日目の水泳持続時間(秒)は、カゼイン群で181.8±23.3、卵白加水分解物群で306.5±58.1であった。

egg white, fatigue, peptide

講演番号：3J14p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ J校舎14会場

食品成分による生体タンパク質品質管理機構の活性化

Activation of protein quality control systems induced by food chemicals

○大西 康太、中畑 恵利奈、石坂 朱里[1]、河合 慶親[1,2]、寺尾 純二[1]、木岡 紀幸[3]、入江 一浩、村上 明（京大院農・食品生物、[1]徳島大院・ヘルスバイオサイエンス、[2]名大院・生命農学、[3]京大院農・応用生命）

○Kohta Ohnishi, Erina Nakahata, Akari Ishisaka[1], Yoshichika Kawai[1,2], Junji Terao[1], Noriyuki Kioka[3], Kazuhiro Irie, Akira Murakami (Food Sci & Biotech, Kyoto Univ, [1]Health Biosci, Univ of Tokushima, [2]Bioagricultural Sci, Nagoya Univ, [3]Applied Life Sci, Kyoto Univ)

【目的】Zerumbone (ZER) は、東南アジア産ハナショウガの根茎に含まれる抗発がん性セスキテルペンである。本物質は、活性発現に必須である α,β-不飽和カルボニル基を介し、生体タンパク質のチオール基との間に共有結合を形成する。これまでに、ZER による非特異的なタンパク質修飾が、熱ショック応答を誘導し、HSP70 などの分子シャペロンの発現を増強することを、培養細胞系で明らかにしている。本研究では、ZER の生体分子への結合や HSP 誘導活性を、*in vivo* において評価した。さらに、修飾を受けたタンパク質の化学的挙動について、タンパク質分解機構に着目して解析することを試みた。

【方法と結果】SD ラット（雄性・9 週齢）に対し、ZER を 50 mg/kg で一週間、経口投与し、血漿・肝臓・小腸粘膜などを回収した。まず、ZER のチオール付加体を認識する抗体を用いた競合 ELISA により、血漿及び各臓器における ZER 付加体の検出を試みた。その結果、解析した全ての生体サンプルによって有意な競合が認められ、*in vivo* においても、ZER が生体分子との間に共有結合を形成することが証明できた。また、肝臓における HSP70 の発現をウェスタンブロットにより検出したところ、ZER 投与により、HSP70 の発現が有意に増強することが明らかとなった。以上の結果から、ZER は、*in vivo* においても、生体分子に対して非特異的に付加し、変性ストレスを与えることで、HSP などの生体防御因子を誘導する可能性が示唆された。続いて、ZER 修飾タンパク質の化学的挙動について検証した。Hepa1c1c7 マウス肝臓がん細胞を、ZER の biotin 標識体で 6 時間処理すると、細胞内タンパク質に対する非特異的結合が時間依存的に増加した。しかし、その後、本標識体を培地から除去すると、18 時間後には、細胞内の ZER 修飾タンパク質はほとんど消失した。この結果は、ZER により修飾を受けた異常タンパク質が、何らかのタンパク質品質管理機構により認識され、分解を受けた可能性を示唆している。現在、細胞内の代表的なタンパク質分解系であるユビキチン・プロテアソームシステム及びオートファジーの関与を想定し、修飾タンパク質分解機構の解析を行っている。

zerumbone, heat shock protein, protein quality control

講演番号：3J14p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ J校舎14会場

短期食餌性亜鉛欠乏がもたらすラットの味嗜好性変化の解析

The effect of short-term zinc deficiency on taste preference in rat

○山本 遼、岡田 晋治、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Ryo Yamamoto, Shinji Okada, Takumi Misaka (Dept.Appl.Biol.Chem., The Univ.Tokyo)

【目的】必須微量元素である亜鉛の欠乏は、味覚障害の一因であることが知られている。これまで、亜鉛欠乏ラットをモデル動物とした味嗜好性変化の解析では、二瓶選択試験による評価が数多く行われてきた。しかし、二瓶選択試験は操作が簡便である一方、評価に長時間かかるため、様々な濃度での解析が困難である。また、味溶液摂取後の報酬系などの影響を排除することができないため、味覚依存的な変化について評価ができていない可能性もある。実際にこの試験法では、亜鉛欠乏時の味嗜好性の変化について相反する結果も提示されており、結論には未だ至っていない。そこで本研究では、短時間で評価が可能であり、味覚以外の副次的要因を排除することができるリッキング試験を評価系として用い、亜鉛欠乏ラットの味嗜好性について再評価を行った。
【方法】4週令のSD系雄性ラットを1週間予備飼育した後に、ペアフィーディング群（以下PF群）と亜鉛欠乏群（以下ZD群）に群分けし、PF群には亜鉛含有量30 mg/kg餌、ZD群には亜鉛含有量＜0.6 mg/kg餌を与えて飼育を開始した。なお、この条件では開始7-9日目において、高濃度塩味（300 mM NaCl）に対する顕著な忌避性減少が、本研究室において48時間二瓶選択試験により観察されている（阿生山、2010年度本大会発表）。そこで、亜鉛欠乏食投与開始8日目における各基本味嗜好性の変化を、リッキング試験によって解析を行った。試験では、最初にイオン交換水を提示し、その後味溶液を濃度の薄い方から順に、それぞれ30秒間ずつ提示した。そしてその時間内にラットが提示した溶液を舐めた回数を比較することで、各溶液に対する嗜好性を各々算出した。なお、試験の最後にはもう一度イオン交換水を提示し、テスト中に飲水欲求が充足していないかを確認した。また、次の溶液の提示まではそれぞれ30秒間あけることで、一時的な飲水欲求による溶液を舐めた回数の低下を防いだ。
【結果】忌避行動を示す高濃度の塩味については、500 mM、700 mM NaClの提示に対して、PF群よりZD群で有意にリック数が多かった。一方で、酸味（クエン酸）、苦味（デナトニウム）の提示に対してはいずれの濃度でも両群間でリック数の顕著な差は認められなかった。これにより、短期食餌性亜鉛欠乏では塩味に対して嗜好性の変化が生じることが示唆された。

zinc deficiency, licking, taste

講演番号：3J14p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ J校舎14会場

塩封入人工餌を用いた小型魚類の塩味嗜好性の解析

Feeding behavioral assay of medaka fish for salty taste component

〇齊藤 健佑、高木 陽介、岡田 晋治、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
〇Kensuke Saito, Yosuke Takagi, Shinji Okada, Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【目的】味覚は栄養分の嗜好や毒物の忌避など、感覚情報を処理して生物の生存のための行動を誘発する。小型魚類は胚や稚魚の生体の透明性からin vivoでの機能解析が容易であるという利点を持つ。魚類と哺乳類での相同性を探ることによって脊椎動物の味覚系に共通する機能を調べることができ、また相違点を探ることにより脊椎動物の味覚系の進化系統的な解析が可能になることが期待される。本研究では、5基本味のうち他の基本味と比べて研究が遅れている塩味の受容機構の解明の足がかりとして、モデル動物であるメダカの塩味受容機構を解明するため、行動学的アッセイ系を構築して摂食行動の量的評価による解析を目指した。
【方法】当研究室では、蛍光物質含有人工餌を用いた小型魚類の味嗜好性の行動評価系を開発し、これまで旨味（アミノ酸）、苦味（デナトニウム）、酸味（プロトン）について、メダカの嗜好性・忌避性の濃度依存を明らかにしてきた。本解析では、この評価系を塩味嗜好性の解析に適用した。吸水速度の低いアガロースを担体として融解させた後に蛍光色素を溶解させた油脂及び塩化ナトリウム水溶液（終濃度が100～1000 mM に相当する量）を高温下で攪拌乳化し、水中油滴型（O/W）エマルションを形成させた。この混合物を冷却して凝固させた後にシリカゲルで乾燥し粉砕・分級といった作業を経て、最終的に塩化ナトリウムを含有した微小なサイズの人工餌を得ることができた。この人工餌を孵化後10日齢の稚魚に150秒間自由摂食させた後、消化管内に取り込まれた食餌を蛍光顕微鏡で観察、その蛍光強度から摂食量を測定した。
【結果】塩化ナトリウムを含有した人工餌を用いた摂食行動評価では、メダカは低濃度の塩化ナトリウムを含む人工餌を、味物質を含まない人工餌よりも多く摂食する結果が得られたことから、塩味に対して嗜好性を示すことが明らかになった。一方、高濃度の塩化ナトリウムを含む人工餌に対しては忌避性を示した。このような塩化ナトリウムに対する嗜好行動の二相性は哺乳類と同様であり、脊椎動物における塩味受容機構の共通性が示唆された。次に、齧歯類において低濃度の塩化ナトリウム受容を阻害するアミロライドを加えた人工餌を作製し、同様の摂食行動評価を行ったところ、低濃度の塩化ナトリウム嗜好行動がメダカにおいてもアミロライド濃度依存的に阻害されることが示された。齧歯類の低濃度の塩化ナトリウムに対する味受容体であるENaCの相同分子がメダカには存在しないため、アミロライド感受性を示す他の分子が低濃度の塩味受容体として機能していることが示唆された。

feeding behavior assay, salty taste, medaka fish

講演番号：3J14p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ J校舎14会場

フレーバー化合物によるヒト甘味受容体活性化機構の解析

Sweet flavor compounds activate human sweet receptor

○藤原 聡[1,2]、中北 智哉[2]、岡田 晋治[2]、齋藤 佳奈[1]、南木 昂[1]、阿部 啓子[2]、三坂 巧[2]（[1]長谷川香料（株）、[2]東大院農生科・応生化）

○Satoshi Fujiwara[1,2], Tomoya Nakagita[2], Shinji Okada[2], Kana Saito[1], Takashi Nammoku[1], Keiko Abe[2], and Takumi Misaka[2] ([1]R&D Center, T. Hasegawa Co., Ltd. [2]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【目的】食品香料（フレーバー）は様々な風味改善効果を有することが報告されている。フレーバーによる風味改善効果は、主として嗅覚を介した匂いの影響であると考えられており、実際にストロベリーやバニラの香りによる甘味増強効果や、セロリに含まれる香気成分セダネノライドの風味改善効果はノーズクリップを着用するとほぼ消失する。一方、シンナムアルデヒド水溶液は、ノーズクリップ着用時でも0.1から0.5 mg/mlの範囲で濃度依存的に甘味が強くなることが報告されている。この実験結果は、フレーバー化合物が舌上の甘味受容体を活性化する可能性を示唆するものである。そこで、本研究ではヒト甘味受容体発現細胞を用いることにより、フレーバー化合物が受容体レベルでの甘味受容へ与える影響を解析した。

【方法】風味が甘いとされるフレーバー化合物の中から様々な構造的特徴を有する化合物94種を選定し、ヒト甘味受容体（hT1R2/hT1R3）およびGタンパク質(hG16gust44)を安定発現させた細胞へ投与した。リガンド投与により生じるヒト甘味受容体発現細胞内のCa^{2+}濃度上昇を受容体活性化の指標として、各サンプルのアゴニスト活性を評価した。フレーバー化合物は水溶性の低いものが多いため、DMSOで1 Mに一次希釈した後にアッセイバッファーで目的の濃度に調製し、細胞に投与した。

【結果】フレーバー化合物94種のうちシンナムアルデヒド（CA）と*p*-メトキシシンナムアルデヒド（PMCA）に濃度依存的なヒト甘味受容体アゴニスト活性が観察された。さらに、コントロール実験として甘味阻害剤ラクチゾールを同時添加する実験を行った結果、CAおよびPMCA投与による細胞内Ca^{2+}上昇は抑制された。また、hT1R2、hT1R3のうちhT1R3のみを安定発現させた細胞に1 mM CAおよび1 mM PMCAを投与した際には細胞内Ca^{2+}濃度の上昇は観察されなかった。これに対し、ノーズクリップ着用の官能評価試験を行ない、CAおよびPMCAの甘味評価を行った結果、低ナトリウムバッファーに1 mM CAまたはPMCAを添加すると甘味強度が有意に増強することを確認した。これらの結果から、CAおよびPMCAがヒト甘味受容体を介して甘味を誘起する可能性が強く示唆される。現在、hT1R3に変異を導入した変異体実験により、CAおよびPMCAとヒト甘味受容体との結合領域の解明を目指している。

cinnamaldehyde, *p*-methoxycinnamaldehyde, human sweet receptor

講演番号：3J14p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ J校舎14会場

シンナムアルデヒド構造類縁体が有するヒト甘味受容体活性調節機構の解析

Modulate effect of cinnamaldehyde analogs on activity of human sweet receptor

○中北 智哉、藤原 聡[1]、赤尾 寛子[1]、南木 昂[1]、三坂 巧（東大院農生科・応生化、[1]長谷川香料(株)）

○Tomoya Nakagita, Satoshi Fujiwara[1], Hiroko Akao[1], Takashi Nammoku[1], Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [1]T. Hasegawa Co., Ltd.)

【目的】ヒト甘味受容体はhT1R2 / hT1R3からなるヘテロダイマーの受容体であり、低分子からタンパク質まで様々な構造の甘味物質を受容することが知られている。我々はフレーバー成分の一種であるp-メトキシシンナムアルデヒド(以下PMCA)が甘味受容体を活性化し、甘味を呈することを見出した。PMCAは自身が甘味を呈するだけでなく、スクロース、アスパルテーム等、他の甘味料に対し少量添加することにより甘味の相乗的な増強効果をも有する。一方、PMCAは甘味抑制剤であるラクチゾールと構造的に類似している。分子の大きさはほぼ等しく、部分構造には共通点がある。類似構造物質が同じ受容体に対して、活性化と阻害という相反する作用を示すのが何に起因するのかを調べるために本研究を実施した。具体的にはPMCAの類縁体を用いることによるリガンド側のアプローチ、及びアミノ酸置換した変異体を作製することによる受容体側のアプローチを用いて、構造活性相関を双方の視点により解析することにした。
【方法】ヒト甘味受容体hT1R2 / hT1R3およびキメラGタンパク質Gα16gust44を安定的に発現させた培養細胞を用いて、リガンド投与時の細胞内Ca^{2+}濃度上昇を指標に検証を行った。点変異の導入はPMCAの受容部位であるhT1R3膜貫通領域を対象とし、変異体を安定発現する培養細胞についても多数作製を行った。リガンドにはアスパルテームを用い、終濃度がEC_{50}付近である1 mMとなるように投与した。PMCAまたはその類縁体はアスパルテームに適当量混合し、アスパルテームに対する細胞応答をどのように変化させるかを観察した。
【結果】シンナムアルデヒド類縁体をアスパルテームと共にヒト甘味受容体発現細胞に投与したところ、細胞応答を増強するもの、抑制するものが存在することを見出した。同一箇所の官能基の変化であっても効果は多様であった。

例えば、側鎖を持つ類縁体を野生型受容体に投与したところ、側鎖の短いものについてはアスパルテームに対する応答を増強したが、長いものについては応答を抑制する傾向が認められた。これら類縁体に関しては、hT1R3膜貫通領域の変異体を用いた実験により、一様に増強・抑制効果が薄くなる変異体が見出されたことから、hT1R3膜貫通領域に作用することで応答増強・抑制効果をもたらしていることが強く示唆された。

human-sweet-receptor, p-methoxycinnamaldehyde, sweet-modulator

講演番号：3J14p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ J校舎14会場

蛍光物質を含有するリガンドを測定可能な客観的甘味評価系の開発

Establishment of a New Cell-Based Assay To Measure the Sweetness Intensities of Ligands Including Fluorescent Substances

○戸田　安香、三坂　巧（東大院農生科・応生化）
○Yasuka Toda, Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo)

【目的】近年、味覚受容体が同定され、受容体を発現させた細胞を用いた客観的味覚評価系の開発がなされてきた。この評価系は、新規呈味調節物質の探索や呈味調節作用のメカニズム解明などに役立てられている。しかし、味物質添加後の細胞応答の検出は主にCa^{2+}感受性蛍光指示薬を用いた蛍光検出法により行なわれるため、リガンド溶液中に蛍光物質が含まれる場合には正確な細胞応答の測定ができない場合があった。食品中にはビタミン類やメーラード反応物質など多くの蛍光物質が存在するため、蛍光を有するサンプルにも利用可能な味覚評価系の開発は、測定可能なリガンドの範囲を広げるために重要であると考えられた。そこで、本研究では腔腸類由来のCa^{2+}結合型発光タンパク質を用い、味物質添加時の細胞内Ca^{2+}濃度変化を蛍光値ではなく発光値として検出する新規甘味評価系の開発を行なった。
【方法と結果】甘味受容体安定発現細胞株へ発光タンパク質を一過的に発現させた。この細胞に甘味物質を添加した際の発光強度の変化をマイクロプレートリーダーにて測定した。その結果、甘味物質濃度依存的な発光値が得られ、発光検出系にて得られる甘味物質に対するEC_{50}値は蛍光検出系で得られるEC_{50}値と同等であった。また、甘味物質添加により得られるシグナル・バックグラウンド比も両測定法で差がなかったことから、本発光検出法が従来の蛍光検出法と同様に、甘味評価系に適用可能であることが明らかとなった。次に、食品中に含まれる蛍光物質の例としてリボフラビンを用い、蛍光物質共存下での甘味物質に対する細胞応答の検出を行なった。結果、蛍光検出系を用いた場合には実際の甘味物質に対する細胞応答が検出不可能になってしまうような高濃度のリボフラビン共存下においても、発光検出系を用いた場合には変わらず甘味応答の検出が可能であった。よって、本評価系は蛍光を有するサンプルについても評価が可能な優れた味覚評価系であり、基礎研究のみならず、食品産業の場においても役立つものと期待している。

cell-base assay, luminescence, sweet taste receptor

講演番号：3J14p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ J校舎14会場

甘味受容体におけるアルコール類の相互作用部位の同定

Characterization of the interaction sites for monohydric alcohols on sweet taste receptor

○鈴木 あゆ、中北 智哉、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Ayu Suzuki, Tomoya Nakagita, Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem. , the Univ. Tokyo)

(目的・背景)

マウスではエタノールが嗜好される味として認識されていること、さらに甘味受容体を構成するサブユニットのひとつである T1R3 のノックアウトマウスにおいてエタノールの嗜好性が落ちることが二瓶選択法により示されている。また、サッカリン溶液を刺激とする味覚嫌悪学習によりエタノールへの嗜好性が落ちることから、エタノールが甘味受容体を介して受容されていることが予想されている。本研究においては、甘味受容体を発現させた培養細胞を用いた客観的甘味評価系で低級アルコール類が甘味受容体を活性化するかどうかについて検討するとともに、低級アルコール類の甘味受容体への相互作用部位を明らかにすることを目的として研究を行った。

(方法・結果)

甘味受容体およびキメラ G 蛋白質を発現させた培養細胞にカルシウム蛍光指示薬 Fura-2 を負荷した後、リガンドを添加した。リガンド添加時に甘味受容体が活性化されることによって生じる細胞内カルシウムイオン濃度変化を、カルシウム指示薬の蛍光強度変化として記録した。リガンドとして多種のアルコールを用いたところ、マウス甘味受容体はメタノール・エタノール・1-プロパノール・2-プロパノールという一価低級アルコールによって活性化されることが明らかになった。活性化強度はアルコールの炭素数と相関が認められ、炭素数 3 のプロパノールが最も強く受容体を活性化した。低級アルコールの甘味受容体への作用部位を同定するため、様々な部位に変異を導入した甘味受容体変異体を用いて、相互作用部位の同定を行っていく。

sweet, taste receptor, alcohol

講演番号：3J14p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ J校舎14会場

味神経における味覚情報コーディング機構の解析

Analysis of taste information-coding mechanisms in gustatory neurons

○前田 尚廣、黒川 あずさ、山本 くるみ、長井 千草、石丸 喜朗、應本 真、三坂 巧、松本 一朗、阿部 啓子（東大院農生科・応生化）

○Naohiro Maeda, Azusa Kurokawa, Kurumi Yamamoto, Chigusa Nagai, Yoshiro Ishimaru, Makoto Ohmoto, Takumi Misaka, Ichiro Matsumoto, Keiko Abe (Univ. of Tokyo)

【目的】甘味、苦味などの味のモダリティーが異なる味覚として識別されるメカニズムを神経回路の配線様式を調べることにより解明する。

【方法】当研究グループでは、甘味・旨味受容体T1r3、苦味受容体T2r5、酸味受容体Pkd1l3のそれぞれの発現制御領域を用いて神経トレーサーである小麦胚芽レクチン（WGA）を発現させた3種のトランスジェニックマウス（T1r3-WGA、T2r5-WGA、Pkd1l3-WGAマウス）が作製されている。これらのマウスにおいては、WGAを発現する味蕾細胞から情報を受け取る末梢神経細胞へとWGAタンパク質が輸送されており、特定の味覚を伝える神経細胞が標識されている。本研究では、これらのマウスにおいて標識されたそれぞれの味覚モダリティーを伝える神経細胞が同じ細胞か、異なる細胞かを調べるため、細胞の遺伝子発現様式を比較した。

【結果】ラットの末梢味神経細胞を含む顔面神経膝神経節（GG)、舌咽神経下神経節（PG)、迷走神経節状神経節（NG)、および味神経細胞を含まない三叉神経節に関するDNAマイクロアレイデータを比較し、マウスにおいてこれらの組織に発現する遺伝子を*in situ*ハイブリダイゼーションにより同定した。Eya1、5-HT3AはGGとNPG（マウスのPGとNGを含む組織のこと）に、Eya2はGGにのみ、5-HT3BはNPGにのみ、それぞれ発現していた。T1r3-WGA、T2r5-WGA、Pkd1l3-WGAマウスのGG、NPGではWGA陽性細胞集団の全体にEya１が発現していた。T1r3-WGAマウスのGGではWGA陽性細胞の約半数がEya2を発現していたが、T2r5-WGAマウスのGGではEya2とWGAの重なりは観察されなかった。また、T1r3-WGAマウスのNPGにおいて、5-HT3Bを発現する細胞中のWGA陽性細胞の割合は8割程度であったが、T2r5-WGA,Pkd1l3-WGAマウスのNPGにおいて、5-HT3B発現細胞にWGAのシグナルはほとんど観察されなかった。T1r3-WGA、T2r5-WGAマウスのNPGにおいて、WGA陽性細胞の半数程度が5-HT3Aを発現していたが、Pkd1l3-WGAマウスのNPGにおいてWGA陽性細胞の2割程度しか5-HT3Aを発現していなかった。このように、それぞれの味を伝える神経細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを見出すことができた。

【課題】本研究では特定の分子マーカーを発現している味神経細胞においてのみ味覚伝導路が分離している様子を見出すにとどまった。分子マーカーに規定されない細胞集団における伝導路の分離・統合の様子を議論するためには上述のトランスジェニックマウスを異なる切り口から解析する必要がある。

Taste, coding, gene expression profiling

講演番号：3J14p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ J校舎14会場

アカゲザル味覚関連遺伝子群の茸状・有郭乳頭味蕾における発現解析

Expression analysis of taste signal transduction molecules in fungiform and circumvallate papillae of *Macaca mulatta*

○阿部 美樹[1]、石丸 喜朗[1]、朝倉 富子[1]、今井 啓雄[2]、阿部 啓子[1,3]（[1]東大院農生科・応生化、[2]京大霊長類研、[3]KAST）

○Miki Abe, Yoshiro Ishimaru, Tomiko Asakura, Hiroo Imai[1], Keiko Abe ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kyoto Univ., [3]KAST)

【目的】哺乳類における味覚受容伝達の分子機構は、主にげっ歯類をモデル生物として用いて解析されてきた。組織学的解析から、乳頭の部位ごとに異なる発現様式を示す味覚受容体や下流シグナル伝達因子が存在することが明らかとなっている。一方、ヒトに関しては、苦味受容体遺伝子*TAS2R*ファミリーが、多種類の*Tas2r*遺伝子が同じ細胞に共発現するマウスとは異なり、味細胞ごとに多様な発現様式を示すことが報告されているに過ぎない。我々は昨年度の本大会において、ヒトと近縁種であるアカゲザルの*TAS2R*遺伝子が、ヒトと同様に多様な発現様式を示すことを報告した。本研究では、アカゲザルをモデル動物として用いて、味覚受容体と下流シグナル伝達因子群の茸状・有郭乳頭味蕾における発現解析を行い、味覚関連遺伝子群の発現様式に関して進化的な知見を得ることを目的とした。
【方法】舌前部に散在する茸状乳頭と舌後部にある有郭乳頭上皮の凍結切片を作製し、*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて、アカゲザルの味覚受容体遺伝子と下流シグナル伝達因子の発現解析を行った。味覚受容体としては、TAS1Rファミリー（甘味・うま味)、TAS2Rファミリー（苦味)、PKD1L3（酸味)、下流シグナル伝達因子としては、Gタンパク質αサブユニットgustducinとGα14、及び、エフェクターであるPLC-β2を用いた。さらに、蛍光二重*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて、各遺伝子を発現する細胞の相関関係を調べた。
【結果】*TAS1R*、*TAS2R*、*PKD1L3*の各味覚受容体遺伝子は、味蕾中のそれぞれ異なる味細胞で排他的に発現していた。つまり、マウスと同様に、アカゲザルでも基本味ごとに受容する味細胞が分かれていることが示唆された。次に、各遺伝子について詳細に解析したところ、*TAS1R*ファミリーに関しては、主に茸状乳頭に*Tas1r1*（うま味)、有郭乳頭に*Tas1r2*（甘味）が発現するマウスとは異なって、いずれの乳頭でも*TAS1R1*と*TAS1R2*が互いに別々の味細胞に発現していた。また、*PKD1L3*は、有郭乳頭特異的に発現するマウスとは異なり、有郭乳頭だけでなく茸状乳頭でも発現していた。Gタンパク質に関しては、*GNAT3*（gustducin）が茸状乳頭と有郭乳頭の両方で発現するのに対して、*GNA14*（Gα14）は有郭乳頭だけで発現することはマウスと同様であった。しかし、有郭乳頭において*GNA14*を発現する細胞は、その割合がマウスと比較して顕著に小さく、*TAS1R2*発現細胞と排他的である点は異なっていた。以上の実験結果から、同じ哺乳類に属する霊長類とげっ歯類では、味覚関連遺伝子の発現様式に関して、共通点と相違点があることが判明した。

macaque, G protein , taste receptor

講演番号：3J14p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ J校舎14会場

メダカPLC-β2発現細胞を起点とした経シナプス性トレーサー輸送の経時的解析

The developmental change in the accumulation of the trans-synaptic tracer originated from medaka PLC-β2-expressing cells

○家木 誉史、岡田 晋治、藍原 祥子、應本 真、阿部 啓子、安岡 顕人[1]、三坂 巧（東大院農生科・応生化、[1]前橋工科大・生物工学科）

○Takashi Ieki, Shinji Okada, Yoshiko Aihara, Makoto Ohmoto, Keiko Abe, Akihito Yasuoka[1], Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [1]Dept. Biol. Engn., Maebashi Inst. Tech.)

【目的】呈味物質の味情報は、味蕾に存在する味細胞で受容された後に、味神経を介して中枢神経系に伝達され処理される。しかし、その伝達経路の詳細は未解明な部分が多い。本研究では小型実験魚を使用し、経シナプス性トレーサーである小麦胚芽レクチン（WGA）を遺伝子工学的に使用することで、味覚情報伝達経路を可視化することを目的としている。

【方法と結果】メダカの旨味・苦味受容細胞を含む味蕾細胞に特異的に発現するPLC-β2遺伝子のプロモーター制御下でWGAトランスジーンを発現するトランスジェニック（Tg）メダカを作出した。このTgメダカ成魚（6か月齢以上）では、標的味蕾細胞でWGA mRNAおよびタンパク質が発現し、味神経や脳の味覚中枢、さらに終脳領域のいくつかの神経核において神経細胞に輸送されたWGAタンパク質が観察された（昨年度本大会発表）。本年度は、各神経同士の接続様式についての知見を得るため、12日齢、3か月齢、9か月齢のTgメダカについて免疫組織染色を行いWGAタンパク質の局在を観察することにより、WGAタンパク質輸送の経時的な変化を解析した。

その結果、いずれの日齢のメダカにおいてもWGAタンパク質は味細胞における発現が確認されたものの、味神経や中枢における局在には明確な差が認められた。12日齢では、味神経に加えて、脳の延髄領域の味覚1次中枢である迷走葉（XL）と反射経路上の神経核である迷走神経運動核（NXm）、網様体（RF）の神経細胞にWGAタンパク質の存在が観察された。3か月齢では、これらの神経核に加えて味覚2次中枢である峡の第2味覚核（NGS）および味覚3次中枢の一つとされる視床後核（NPT）の神経細胞にまでWGAタンパク質が認められた。さらに9か月齢になると、3か月齢に比べて各神経細胞の染色強度が強まり、味覚3次中枢の一つである視床下部の下葉分散核（NDLI）や哺乳類の扁桃体や海馬に相当するとされる終脳領域の神経核においてもWGAタンパク質の存在が観察された。これらの結果から、PLC-β2発現細胞から中枢までの情報伝達神経の接続経路が示唆された。

wheat germ agglutinin, taste signaling, gustatory neural pathway

講演番号：3J14p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ J校舎14会場

メダカを用いた新規経シナプス性トレーサー探索系の開発

Construction of the screening system for a novel trans-synaptic tracer using medaka fish

○池永 直弥、家木 誉史、岡田 晋治、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Naoya Ikenaga, Takashi Ieki, Shinji Okada, Takumi Misaka (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【目的】食物中の味物質は口腔などに存在する味蕾中の味細胞で受容され、その情報は接続する神経を介して中枢に送られ、味として認識される。この味情報の伝達・処理の機構には不明な点が多い。近年、経シナプス性トレーサーである小麦胚芽レクチン（WGA）をトランスジーンとして用いて、標的細胞を起点とする神経回路を可視化する技術が開発された。この技術を用いて、5 基本味それぞれの情報伝達経路については解明が進んできた。しかし、各経路の相関は不明であり、これを明らかにするために 2 種類以上の経路を区別して可視化できる新規の経シナプス性トレーサー・トランスジーンの開発が望まれている。

脊椎動物のモデル生物の 1 つであるメダカは、遺伝子導入が容易であること、多産であること、体が小さいため広い領域の観察が容易であることなどの利点を持ち、新規トレーサー・トランスジーン候補の検討に適していると考えられる。また、PLC-β2 プロモーター制御下で WGA トランスジーンを味蕾細胞に発現するトランスジェニック（Tg）メダカでは、受精後 12 日（孵化後 2 日）の時点で味蕾細胞から味神経への WGA タンパク質輸送が観察され（家木ら、本大会発表）、このプロモーターを用いることでハイスループットに検討を行うことができると考えられる。本研究では、Tg 個体作出方法の改良や染色条件の検討を行い、メダカを用いて効率良くトレーサー・トランスジーンの探索・検討を行う系を確立することを目的とした。

【方法と結果】PLC-β2 プロモーター下流に WGA 遺伝子を連結したトランスジーンを用いて検討を行った。まず、受精卵への微量遺伝子注入によって作出される Tg 個体の割合を高めること、そして、各 Tg 個体はモザイクであるため、外来遺伝子が導入される細胞の割合を高めることを目指した。挿入トランスジーンのサイズを小さくするため、WGA 発現トランスジーンとレポーター遺伝子発現トランスジーンとに分け、同時に注入する方法を用い、両者の混合比を変えて注入を行った。さらに、発生の初期段階にトランスジーンが挿入されることを期待して、1 細胞期の受精卵のみに注入を行った。また、レポーター遺伝子の発現にレンズ特異的発現を誘導する mouse gamma-F crystalline プロモーターを用いることで、孵化前の Tg 個体選別を可能とし、選抜の簡便化を目指した。現在、Tg 個体の出現率、Tg 個体中での陽性細胞の割合を調べている。今後、なるべく早期で、かつ確実に WGA タンパク質の神経への輸送を調べることができる条件を決定するため、経時的なサンプリングを行い、染色法の検討を行う予定である。

medaka fish, trans-synaptic tracer, taste

講演番号:3J14p20
講演日時、会場:3月24日17:48～ J校舎14会場

タイトル　脳味覚野・体性感覚野におけるSNAP25遺伝子発現の離乳マウスにおける経時的変化

Title　Developmental change in expression patterns of SNAP25 in taste cortex of postnatal mouse

○伊藤　俊輔、川上　晋平[1]、應本　真、岡田　晋治、藍澤　広行、三坂　巧（東大院農生化・応生化、[1]森永製菓(株)・ヘルスケア事業部）

○Shunsuke Ito, Shinpei Kawakami[1], Makoto Ohmoto, Shinji Okada, Hiroyuki Aizawa, Takumi MIsaka(Dept.Appl.Biol.Chem, The Univ of Tokyo, [1]Morinaga & CO., LTD.)

【目的】食品摂食時の感覚は大脳皮質の味覚野や体性感覚野において認識される。視覚系では開眼後の視覚経験により大脳皮質視覚野の投射地図が不可逆的に変化する可塑性が知られているが、食経験による大脳皮質可塑性についての知見は少ない。我々は昨年度までの本大会で、マウスが固形離乳食を摂取することで、数日以内にシナプス関連タンパク質SNAP25の大脳皮質での発現量が増加する事を報告した。本年度は、離乳後のマウス成育過程におけるSNAP25タンパク質及びmRNAの発現を経時的に観察することにより、食経験による脳の変化を調べた。

【方法・結果】離乳前後の各週齢のマウスについて、大脳皮質味覚・体性感覚野のサンプルを、抗SNAP25抗体を用いたウエスタンブロッティングに供した。その結果、SNAP25タンパク質の蓄積量は哺乳期の2週齢に比べ離乳直後の3週齢では2倍となり、4週齢をピークとして4倍程度にまで増加し、8週齢までにほぼ同程度に戻った。このことから離乳後の食経験により脳の感覚野が変化していることが示唆された。

次に、離乳前後の各週齢のマウスの大脳皮質味覚・体性感覚野からTotal RNAを抽出し、逆転写後にRT-qPCRを行った。その結果、SNAP25のmRNA量は2週齢に比べ離乳直後の3週齢で1.5倍となり、5週齢では2.5倍まで増加しその後は10週齢まで変動がなかった。このことからSNAP25のタンパク質の増加はmRNA発現量の増加に伴うものと示唆された。一方、SNAP25タンパク質減少のメカニズムはmRNA発現量の変動では説明がつかず、タンパク質安定化や化学修飾など異なるメカニズムの存在が考えられた。

さらに、SNAP25タンパク質の蓄積部位を免疫組織染色法により検討した結果、4層の上部（A/B層）では2週齢から10週齢まですべての時期において発現しており、2週齢では4層の上部以外の発現が見られない一方、3週齢では2、3、4(C層)、5、6層で発現が見られた。このSNAP25タンパク質蓄積部位は3週齢から10週齢まで変化しなかった。以上の結果から、固形食摂食前の2週齢から摂食後の3週齢にかけて味覚野及び体性感覚野の領域内で蓄積部位が大きく変動していることが明らかとなった。

SNAP25, Developmental, plasticity

講演番号：3J15a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ J校舎15会場

炭酸水の体温低下抑制作用

The effect of carbonated water on body temperature

○沢村信一、岡部利恵、三富敦浩、粟野いづみ、瀧原孝宣、成川真隆[1]、渡辺達夫[1]（(株)伊藤園、[1]静岡県大・食栄）

○Shin-ichi Sawamura, Rie Okabe, Atsuhiro Mitomi, Izumi Awano, Takanobu Takihara, Masataka Narukawa[1], Tatsuo Watanabe[1](ITO EN, [1]Univ. Shizuoka)

【目的】炭酸飲料は嗜好飲料として広く飲まれているが、その機能性に関する報告は少ない。炭酸水は口腔内で刺激と爽快感をもたらす。一方、一般的に刺激を有する食品成分には体温を上昇させる効果がある。このことから、炭酸水の刺激に着目し、体温への影響を検証した。更に、炭酸水の刺激の受容機構を明らかにするために、温度や刺激の受容体であるTRPV1, TRPA1発現細胞の応答を確認した。

【方法】体温への効果検証：寺澤の報告[1)]に従って冷え性の女性７名を選抜し、被験者とした。冷涼環境下（20.5～22.4℃）において、8～9℃に調整した水及びガスボリュームの異なる無糖炭酸水（ガスボリューム 4, 2, 1）を飲用し、摂取前、摂取後 2、4、6、8、10、20、30、40 分の手の皮膚温（左手中指の内側）をサーモビジョン CPA-8200（(株）チノー)により測定した。また、併せて舌下温を電子体温計（オムロン電子体温計 MC-672L）により測定した。

温度受容体活性測定：TRPV1 もしくは TRPA1 遺伝子を導入した HEK293 細胞に、細胞内カルシウムイオン指示薬である Fluo4-AM を取り込ませ、炭酸水投与直後の細胞内カルシウムイオン濃度の変化を FLEXstationⅡ（Molecular Devices）で測定した。

【結果】体温への効果：冷涼環境により、全被験飲料において試験開始後の手の皮膚温が低下した。また、舌下温は、飲料摂取直後に急激に低下し、徐々に回復した。その中で、ガスボリューム４の炭酸水では、水摂取時と比較して手の皮膚温の低下が有意に抑制され、舌下温の回復が促進された。また、ガスボリューム２では舌下温の有意な回復が確認された。ガスボリューム１では有意な効果は確認されなかった。以上より、炭酸水が手の皮膚と舌下において体温低下を抑制することが示され、ガスボリュームが大きいほどその効果が大きいことが示唆された。

温度受容体活性：炭酸水は TRPV1 活性を示さず、TRPA1 を活性化させた。

これらの結果から、炭酸水はTRPA1を介して体温産生を促進し、放熱を抑制したことにより、体温低下抑制効果を示したことが示唆された。

1）寺澤捷年、生薬学雑誌、41、85-96（1987）。

carbonated water, human body temperature, TRP channels

講演番号：3J15a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ J校舎15会場

炭酸飲料嚥下時の舌圧と咽頭部における速度との関係

Relationship between tongue pressure and velocity in pharynx at swallowing carbonated drink

○森髙初惠、高松のぞみ、橘宏美、北出昌美、沢村信一[1]、瀧原孝宣[1]、粟野いづみ[1]、小野高裕[2]、田峰謙一[2]、堀一浩[3]（昭和女大・生、[1]伊藤園・中央研、[2]大阪大・歯、[3]新潟大・歯）

○Hatsue Moritaka, Nozomi Takamatsu, Hiromi Tachibana, Shin-ichi Sawamura[1], Takanobu Takihara[1], Izumi Awano[1], Takahiro Ono[2], Kenichi Tamine[2], Kazuhiro Hori[3] (Showajodai, [1]ITO EN, [2]Osakadai, [3]Niigatadai)

【目的】　咀嚼・嚥下過程において、舌は重要な役割を果たす。しかし、嚥下時の舌運動の定量的な評価は非常に困難であり、これまでにビデオ嚥下造影検査、超音波画像診断装置あるいはMRIによる評価方法等が報告されているが、まだ多くの課題がある。小野らは舌と口蓋との接触様相の定量的評価が可能な簡便な圧力センサ型の測定装置を開発し報告している。本報告では、二酸化炭素の溶解圧が異なる炭酸飲料について、舌圧力センサシートを用いて嚥下時の舌運動を定量的に評価し、咽頭部における炭酸飲料の移動速度との関係について検討した。

【方法】　果糖ぶどう糖液糖、クエン酸、クエン酸ナトリウムを原料とし、ガスボリューム0、1.5、2.7の3種類の炭酸飲料（以後、GV0飲料、GV 1.5飲料、GV 2.7飲料とする）を試料とした。T字型に5個の感圧点を配列した薄い舌圧センサシートを硬口蓋に貼付し、炭酸飲料嚥下時に発生する舌圧を解析した。咽頭部における炭酸飲料通過時の最大速度、最大速度平均、速度平均はパルスドップラー法により超音波診断測定装置を用いて測定した。あわせて、官能評価を実施した。測定時の炭酸飲料の温度は10℃、1回の摂取量は14mlとした。被験者は嚥下機能に異常のない21～23歳の女子学生20名とした。

【結果】　炭酸飲料嚥下時の舌の硬口蓋への接触順位は硬口蓋正中部では前方部、中央部、後方部と、前方から後方へ向かって舌圧が発生した。硬口蓋後方周辺部への接触は硬口蓋中央部接触後であった。舌の接触順位にはガス圧による差は認められなかった。舌圧発生の持続時間はガス圧によらず硬口蓋後方中央部が最も短く、どの部位においてもGV 1.5とGV 2.7飲料はGV 0飲料よりも有意に長かった。舌圧のピーク値は、全ての部位においてGV 1.5とGV 2.7飲料がGV 0飲料よりも有意に大きかったが、部位による相違は認められなかった。官能評価においては、GV 1.5とGV 2.7飲料はGV 0飲料と比較し、飲み込み難く、スーと飲み込めないと評価された。咽頭部での炭酸飲料の最大速度は、GV 2.7飲料はGV 0炭酸飲料よりも有意に速かったが、GV 1.5飲料では他の炭酸飲料との間に有意差は認められなかった。最大速度平均および速度平均は、GV 0飲料はGV 1.5あるいはGV 2.7飲料よりも有意に遅かった。以上のことより、GV1.5およびGV 2.7飲料は、GV 0飲料と比較して、舌を硬口蓋に強く、長く接触させることによってより大きな力で咽頭部へ押し出され、その結果、咽頭部での最大速度平均および速度平均が速くなったと考えられる。

carbonated drink、tongue pressure、maximum velocity in pharynx

講演番号：3J15a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ J校舎15会場

シンナムアルデヒドのう蝕原因菌 *Streptococcus mutans* に対する抗菌作用

Antimicrobial activity of cinnam aldehyde against *Streptococcus mutans*

○伊藤　央貴，湊　健一郎，小原　章裕　（名城大・農）
○Oki Ito, Kenichiro Minato, Akihiro Ohara　（Meijo university）

【目的】

香辛料中のいくつかの化合物が抗菌活性を有することが知られている。本実験では，香辛料の中でもシナモンの主要香気成分であるシンナムアルデヒドとその構造類似物について，う蝕原因菌 *Streptococcus mutans* に対する抗菌・抗う蝕作用について検討し，すでに報告している。そこで，シンナムアルデヒドの抗う蝕作用の作用機構の検討を行った。

【方法】

シンナムアルデヒドの抗う蝕作用を *S. mutans* に対する抗菌作用により検討し，培養液中の生菌数をコロニーカウント法により調べた。また，シンナムアルデヒドの抗菌作用様式を検討するため，*S. mutans* 培養液中の合計細胞数と生存細胞数の経時的変化を濁度測定とコロニーカウント法によりそれぞれ調べた。さらに，シンナムアルデヒドの *S. mutans* に対する抗菌作用機構を検討するため，*S. mutans* 中の脂肪酸への作用をガスクロマトグラフィーで分析した。一方で，シンナムアルデヒドによる *S. mutans* 中のタンパク質組成変化を SDS-PAGE によって調べた。

【結果】

シンナムアルデヒドはプラーク形成と同様に *S. mutans* の生育を抑制したことから，シンナムアルデヒドの抗プラーク活性は *S. mutans* に対する抗菌活性が要因であると考えられた。抗菌作用様式の検討については，シンナムアルデヒドにより *S.mutans* 培養液中の合計細胞数の増加が抑制されたが，減少しなかったため，溶菌作用ではなく殺菌・静菌作用であると考えられた。さらに，シンナムアルデヒドにより生存細胞数が減少する傾向が見られたため，シンナムアルデヒドは *S. mutans* に対して殺菌作用を示していると考えられた。また，シンナムアルデヒドは *S. mutans* 中の脂肪酸とタンパク質の組成を変化させた。以上の結果から，シンナムアルデヒドのプラーク形成抑制作用は *S. mutans* に対する殺菌作用によるものであり，殺菌作用を示した要因として *S. mutans* 中の脂肪酸とタンパク質の組成が変化したことが考えられた。

Cinnam aldehyde, *Streptococcus mutans*, antimicrobial activity

講演番号：3J15a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ J校舎15会場

ナノサイズ粒子ビタミンEの小腸における吸収機構の解析

Cellular uptake mechanism of vitamin E nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells

○室田佳恵子[1,2]、村上陽子[3]、菅田望[2]、原田聖也[1]、大久保剛[4]、伊佐治知也[4]、河田照雄[3]、寺尾純二[2]、松村康生[5]（[1]近畿大理工・生命科、[2]徳島大院・ヘルスバイオサイエンス、[3]京大院農・食品生物、[4]日油（株）、[5]京大院農・農）

○Kaeko Murota[1,2], Yoko Murakami[3], Nozomi Sugata[2], Kiyonari Harada[1], Takeshi Ohkubo[4], Tomoya Isaji[4], Teruo Kawada[3], Junji Terao[2], Yasuki Matsumura[3] ([1]Dep. Life Sci., Fac. Sci. Eng., Kinki Univ., [2]Grad. Sch. Nutr. Biosci., Univ. Tokushima, [3]Div. Food Sci. Technol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]NOF Co., [5]Div. Agron. Hort. Sci., Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ.)

【目的】近年機能性分子の吸収性を高める目的で微細加工技術が利用されている。本研究では、ビタミンEをナノサイズ粒子に加工したものを用い、小腸における吸収機構をヒト小腸Caco-2細胞で検討した。

【方法】Transwell上で約3週間分化させたCaco-2細胞の刷子縁側に、ナノサイズ粒子ビタミンE（ナノVE、平均粒経100 nm以下）、マイクロサイズ粒子ビタミンE粉末（粉末VE、エマルションを粉末化したもの）、および擬似ミセル化ビタミンE（ミセルVE）を胆汁酸塩溶液に溶解して添加し、8 hr後に培地および細胞層からビタミンEを抽出し蛍光HPLCにて定量した。ビタミンE添加溶液の条件を変化させて細胞への取り込み量および基底膜側への輸送量の変化を測定した。

【結果および考察】ビタミンEの吸収はミセルVEを添加したときに最も高かった。ナノVEは粉末VEよりもやや吸収性を向上させたが、ミセルVEには及ばなかった。ナノサイズの微粒子化により飲作用で粒子が細胞に取り込まれるかを調べたところ、高張液によりエンドサイトーシスを阻害しても吸収量に変化はみられなかった。一方、ナノVEとともに膵リパーゼを添加することによりビタミンEの吸収は増加し、リパーゼ阻害剤を加えるとその効果は消失した。以上の結果より、ビタミンEのナノサイズ微粒子化を行っても腸管細胞への直接の取り込みが増加することはなく、食事由来ビタミンEと同様膵酵素による脂質消化作用をうける必要があることが示された。すなわち、ナノサイズ化による吸収促進作用機構として、直接吸収性を高めるのではなく、消化管管腔内液における可溶化が増大することにより小腸粘膜への到達率が上昇すること、微細化による表面積の拡大により消化酵素の作用を受けやすくなること、の2点が推定された。したがって、食品成分の吸収性を高める微細加工を行うにあたっては、単に粒経を小さくするのみでなく、消化管内での消化酵素作用を考慮することが重要であると考えられる。

nanoparticle, intestinal absorption, vitamin E

講演番号：3J15a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ J校舎15会場

Phytolおよびその代謝物が糖・脂質代謝異常に及ぼす影響

Phytol intake improves glucose and fat metabolism via activation of PPARα in obese mice.

○安　芝英、後藤　剛、高橋　春弥、永井　宏幸、金　英一、高橋 信之、河田 照雄（京大院農・食品生物）

○Ji-Yeong An, Tsuyoshi Goto, Haruya Takahashi, Hiroyuki Nagai, Young-Il Kim, Nobuyuki Takahashi, Teruo Kawada (Kyodai)

【目的】

糖・脂質代謝を制御するセンサーとしてリガンド要求性の核内受容体型転写因子である PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors)が挙げられる。PPARs にはα、γ、δの3つのサブタイプが存在し、その中でも PPARαは肝臓や筋肉で多く発現し、脂肪酸酸化系関連遺伝子の発現を制御し、PPARαの活性化は生活習慣病を予防・改善することが示されている。

クロロフィルの分解産物である phytol ($C_{20}H_{40}O$) とその代謝物である phytanic acid, pristanic acid は PPARαのリガンドとして作用することが示されていたが、肥満に伴う代謝異常症に対する影響は検討されていない。そこで、本研究では phytol が糖・脂質代謝異常に及ぼす影響を動物および細胞レベルで検討した。さらに、phytol の代謝改善作用における PPARαの役割について検討することとした。

【方法】

5 週齢の肥満・糖尿病モデルマウス（KK-Ay, ♂）を用い、0.2、0.5% phytol を含む高脂肪食で 5 週間の摂食実験を行った。飼育 25 日目に経口糖負荷試験、32 日目インスリン負荷試験を行った。35 日目に解剖を実施し、体重・各種臓器重量、血中パラメータ、肝臓中性脂肪含量などについて解析を行った。

また、phytol, phytanic acid, pristanic acid の PPARs に対する作用をレポーターアッセイにより検討した。更に、phytol やその代謝物の作用における PPARαの関与について検討するため、マウス初代培養肝細胞を用いて中性脂肪蓄積量や脂肪酸酸化系関連因子の遺伝子発現などを検討した。

【結果と考察】

phytol 摂食により、血糖値、血中中性脂肪量が有意に減少した。また、耐糖能異常、インスリン抵抗性が改善された。このことから phytol が肥満に伴う糖・脂質代謝異常を改善することが示唆された。レポーターアッセイにおいて、phytol, phytanic acid, pristanic acid は強く PPARαを活性化させることが示された。マウス初代培養肝細胞をにおいて、phytol は中性脂肪蓄積量を有意に減少させた。この作用は PPARα欠損マウスより単離した初代培養肝細胞では認められなかった。また、phytolは PPARα依存的に脂肪酸酸化系関連遺伝子の発現を上昇させた。

これらのことから、phytol, phytanic acid, pristanic acid は PPARα依存的に脂肪酸酸化を上昇させ、中性脂肪蓄積を減少させることが示唆された。

Keyword1: phytol Keyword2: PPARα Keyword3: obesity

講演番号：3J15a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ J校舎15会場

メープルシロップ抽出物が糖尿病モデルマウス肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響

Effects of a maple syrup extract given to diabetes model mice on their hepatic gene expression.

○飯田晃太[1]、林ちひろ[1]、渡部由貴[2]、亀井飛鳥[2]、石島智子[1]、阿部啓子[1,2]、中井雄治[1]
([1]東大院農生科・応生化、[2]KAST)
○Kota Iida[1], Chihiro Hayashi[1], Yuki Watanabe[2], Asuka Kamei[2], Tomoko Ishijima[1], Keiko Abe[1,2], Yuji Nakai[1]
([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]KAST)

【背景】

サトウカエデ(*Acer saccharum*)の樹液を煮詰めて作られた天然甘味料であるメープルシロップは、ポリフェノールを含むフェノール性化合物を主とした数種の抗酸化物質含有、*in vitro*での抗酸化能、抗腫瘍効果が報告されている。しかし*in vivo*における機能性は、肝臓保護効果(Watanabe *et al.*, BBB(2011)75(12), 110532-1-3)についての報告だけと非常に乏しい。一方、先行研究において特定のポリフェノール及びその高含有抽出物に糖尿病改善効果があることが示されている。そこでポリフェノール高含有のメープルシロップブタノール抽出物(MSE)を用いて、*in vivo*におけるその糖尿病改善効果を検証した。

【目的】

本研究はMSEの糖尿病モデルマウス肝臓における機能性の解析からその有効性を解明する。

【方法】

4週齢のKKA^{y}雄マウスを1週間の予備飼育後、AIN93G組成の正常食摂取群(対照群)と正常食に0.1 %のMSEを混餌したMSE含有食摂取群(MSE群)の2群に分け(各群n=8)、6週間の本飼育を行った。本飼育最終日に解剖を行い、血清、肝臓をサンプルリングした。血清は生化学検査を行い、肝臓からはtotal RNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析により2群間の遺伝子発現プロファイルの差異を統計的に比較した。

【結果】

血液生化学検査の結果、MSE群において肝障害マーカーであるAST、ALT値が有意に減少し、肝臓脂肪酸β酸化亢進の指標である総ケトン体値が有意に上昇していた。またDNAマイクロアレイ解析の結果から、肝臓における2群間の遺伝子発現プロファイルが異なることが示唆され、MSE群において脂質代謝に関わる遺伝子群の発現上昇、炎症応答に関わる遺伝子群の発現低下が抽出された。これらの結果から、MSEはKKA^{y}マウス肝臓において炎症緩和、脂質異化促進効果を発揮し、糖尿病改善効果を持つ可能性が示唆された。

なお本研究は、カナダ農務・農産食品省のカナダ農務・農産食品推進プログラムから財政的援助を受けた、ケベック農業開発評議会の援助により実施した。

maple syrup, DNA microarray, liver

講演番号：3J15a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ J校舎15会場

オリーブに含まれるマスリン酸による炎症及び浮腫軽減作用

Anti-inflammatory and anti-edema activities of maslinic acid in olive

○福光 聡、安本 秀幸[1]、間 和彦、落合 潔（日本製粉・中研、[1]東洋オリーブ）
○Satoshi Fukumitsu, Hideyuki Yasumoto[1], Kazuhiko Aida, Kiyoshi Ochiai
(Nippon Flour Mills Co., Ltd., [1]TOYO OLIVE CO., LTD.)

【目的】古くから地中海沿岸食は、心疾患や炎症疾患の発症リスクを低減すると言われている。近年、これらの疾病予防とオリーブの摂取の関連性が明らかとなってきている。日本では、香川県小豆島がオリーブの国内最大の産地となっており、オリーブオイルや果実の塩漬け、葉を茶として加工するなど産業資源となっている。これまでに、私達は、マウス由来マクロファージ細胞株RAW 264.7を用いた試験で、小豆島で産出するオリーブ採油粕から炎症抑制成分マスリン酸を単離した。作用メカニズムとして、マスリン酸はIκ-Bαのリン酸化を抑制することでNF-κBの核内移行が抑制され、炎症が抑制される可能性が示された。また、マスリン酸はMAPKsのリン酸化は抑制しないことが示された[1)]。本研究では、浮腫モデルマウスを用い、オリーブから精製したマスリン酸が浮腫及び炎症に及ぼす影響を検討した。

【方法】1%カラゲニンを足蹠皮下に投与し、浮腫を惹起したマウス（5週齢BALB/c、雄）を用い、マスリン酸摂取が浮腫や炎症性サイトカインに及ぼす影響を検討した。マスリン酸は、オリーブ採油粕から含水エタノール抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより純度90%以上に精製したものを使用した。ガラゲニンで浮腫を惹起する前後1時間に油に乳化したマスリン酸を用量100mg/kgまたは200mg/kgで各1回（計2回）経口投与した。ガラゲニン皮下投与後、2，3，4時間後に足蹠の厚さ、炎症因子の転写レベルでの発現量、血中のサイトカイン濃度について測定した。

【結果】マスリン酸（100mg/kg及び200mg/kg）摂取群で、カラゲニン浮腫マウスと比較して足蹠の厚さが有意に抑制された。また、200mg/kgのマスリン酸摂取群で、足蹠の*TNF-α*と*IL-6*の転写レベルでの発現が有意に抑制された。血中TNF-α及びIL-6の濃度は、マスリン酸摂取群で、平均値の低下が認められた。以上の結果から、オリーブに含まれるマスリン酸摂取により、浮腫及び炎症が抑制されることが示された。

1) 日本食品科学工学会 第58回大会

Olive, Maslinic aicd, Anti-inflammation

講演番号：3J15a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ J校舎15会場

ラットを用いた野菜フラボノイド長期摂取時の適正量の比較検討

○八巻幸二、石川祐子、高橋陽子（農研機構・食総研）
○Kohji Yamaki, Yuko Takano-Ishikawa, Yoko Takahashi(NARO, NFRI)

【目的】野菜に含まれる非栄養成分の機能性成分フラボノイドは、その含量として高くないため、十分な機能性を発揮するためにはその含量を高める必要がある。しかし安全な食品としてどの程度まで高めるかは、その適正摂取量を把握する必要がある。しかしフラボノイド等の最大適正摂取量を検討した例は少なく、またその摂取量での有害性はほとんど確認されていない。そこで、ラットを用いて有効な摂取量と有害性等の出現する摂取量の関係を調べた。
【方法】フラボノイドとして、ケルセチン、カテキン、クリシンを粉末飼料に0. 01%, 0.03%, 0.1%, 0.3%, 1.0%添加、4週間飼育後、血液中のパラメータとして総コレステロールと細胞障害のマーカーとしてGOT,GPT、細胞膜の酸化障害マーカーとして8-oxoprostaglandinを測定した。またDNAの障害マーカーとして尿の8-OHdGを測定した。栄養状態のマーカーとして血清中のプレアルブミン値を測定した。
【結果】体重はいくつかのフラボノイド食で減少傾向は認められたが有意な低下は確認されなかった。肝臓障害指標としてGOTで、ケルセチンは0.01%含有食から用量依存的に有意な低下を示したのに対し、カテキン、クリシンでは低下傾向は確認された。Lag timeとして求める血液中の抗酸化能はどのフラボノイドも低下傾向であった。酸化ストレスのマーカーである尿中8-OHdGは0.3%以上でカテキン、クリシンで上昇が確認された。肝障害GOT指標でケルセチンは低下作用を示した。以上の結果8-OHdGで確認される有害性は0.3%以上で発症する傾向があると考えられる。有効性に関してはそれぞれのフラボノイドによって異なると考えられる。用量依存性が確認されず、その作用が明確でないマーカーが幾つかあり、さらに詳細なデータの蓄積が必要と考えている。

Flavonoids, intake, GOT

講演番号：3J15a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ J校舎15会場

NF-κBシグナルはイソチオシアネート誘導アポトーシスを正に制御する

NF-κB signaling positively regulates ITC-induced apoptosis

○安部 奈緒美、村田 芳行、中村 宜督（岡山大院・自然科学）
○Naomi Abe, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura (Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

【目的】イソチオシアネート（ITC）はワサビや大根などのアブラナ科野菜に含まれる辛み成分として知られており、発がん抑制作用を有していることが様々な動物実験から明らかとなっている。また、疫学的研究からイソチオシアネートを含む野菜の摂取頻度とがんの罹患率に負の相関があることも数多く報告されていることから、そのがん予防効果が期待されている。主にパパイヤやクレソンに含まれるベンジルイソチオシアネート（BITC）も他の ITC 類と同様にがん予防活性を持っており、これまでに細胞周期の停止やアポトーシスを誘導することが明らかとなっている。転写因子 NF-κB は主に免疫反応を制御する一方で、アポトーシスや細胞周期調節に関わる遺伝子の発現も制御している。そこで本研究では、BITC のアポトーシス誘導における NF-κB シグナルの役割を、ヒト大腸がん細胞 HT-29 を用いて解析した。

【方法と結果】HT-29 細胞の増殖に BITC がどのような影響を与えるかを MTT 法により評価した結果、BITC は濃度依存的に細胞の増殖を抑制した。アガロース電気泳動法によりアポトーシスの指標のひとつである DNA 断片化を評価したところ、BITC のアポトーシス誘導作用は低濃度においてのみ見られ、高濃度では見られなかった。次に、BITC が NF-κB 経路に与える作用をウェスタンブロット法により評価した結果、BITC はより低濃度で IκB kinase（IKK）のリン酸化を増強し、IκBα の発現を抑制した。これらの結果は低濃度の BITC による NF-κB シグナリングの活性化を示していることから、さらに核内の NF-κB レベルを評価したところ、NF-κB の核内移行の増強も確認された。そこで、NF-κB の標的遺伝子の一つであり、増殖に寄与する細胞周期調節因子 cyclinD1 の遺伝子発現に対する BITC の作用を RT-PCR 法により評価した結果、予想に反して BITC は cyclinD1 の mRNA レベルを抑制した。

最近、NF-κBがβ-cateninによるcyclinD1発現を下方制御することが報告された。また、HT-29細胞ではβ-cateninが過剰発現していることも知られている。そこで、これらの可能性を検証する目的で、β-cateninとNF-κBの分子間相互作用を免疫沈降法により評価した。その結果、低濃度BITCはNF-κBとβ-cateninの分子間相互作用を増強した。さらに、β-cateninとプロモーター配列との相互作用をクロマチン免疫沈降法により評価した結果、cyclinD1の転写を誘導する際に見られるβ-cateninのTBE0siteへの結合は低濃度BITCにより抑制され、cyclinD1の遺伝子発現の抑制と一致した。

以上の結果から、BITCはNF-κBの核内移行を増強することで、β-catenin依存的なcyclinD1発現を抑制し、HT-29細胞のアポトーシスを正に制御することが示唆された。

isothiocyanate、nf-kappab、apoptosis

講演番号：3J15a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ J校舎15会場

デヒドロジンゲロンのアナログによるヒト大腸がん細胞増殖抑制効果

Growth inhibitory effect of dehydrozingerone analogs on human colon cancer cells

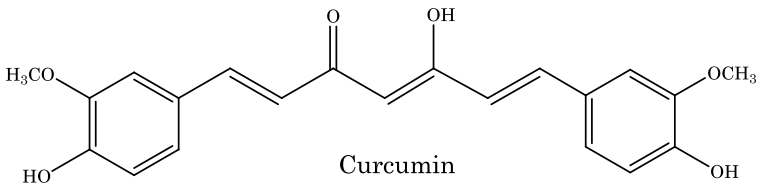
○山田　恭正、与五沢　真吾¹、Qi Sun ¹、玉木　友梨、酒井敏行¹
（同志社女子大・食栄、¹京都府立医大・分子標的癌予防医学）

○Yasumasa Yamada, Shingo Yogosawa ¹ , Qi Sun ¹, Yuri Tamaki, Toshiyuki Sakai ¹ (Doshisha Women's Coll. Dept. of Food Science and Nutrition, ¹ Kyoto Prefect. Univ. of Medicine Dept. of Molecular-targeting Cancer prevention)

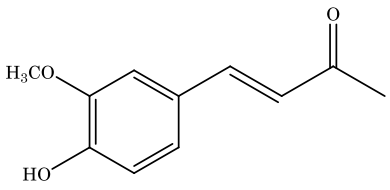
【目的】デヒドロジンゲロンの構造はクルクミンの半量体に相当するバニリルケトンの一種である。クルクミンはウコン(Curcuma longa)に含まれ、抗酸化性、抗変異原性、抗プロモーター活性などを有し、癌予防効果が期待されている食品成分である。一方、デヒドロジンゲロン（以下DHZと略す）は、ショウガ(Zingiber officinale)の辛味成分で抗酸化性、抗炎症作用、Epstein-Barrウイルス活性化阻害作用などの報告がある。しかし、癌との関連についてはクルクミン類似の構造因子を持つが、抗腫瘍性の分子メカニズムについてはほとんど研究されていない。本研究では、先ずDHZのアナログを合成して培養した癌細胞の増殖抑制効果を調べることを目的とした。

【方法】バニリン、イソバニリン、オルトバニリンなどの芳香族アルデヒドとアセトンなどのケトンの間でClaisen-Schmidt 縮合反応を行い、芳香環にアルケニルケトン側鎖を導入したDHZのアナログを合成した。次にこれらのアナログを用いてヒト大腸癌由来HT-29細胞に対する増殖抑制効果を調べた。また、増殖抑制効果が見られた被検サンプルについては、細胞周期をフローサイトメトリーで観察した。

【結果】DHZでは濃度依存的に細胞増殖抑制効果が見られたが、有意な細胞死増加は観察されなかった。クルクミンでは、細胞増殖抑制効果が観察される濃度でアポトーシスが誘導され、細胞死が観察される現象とは対照的で、両化合物の作用メカニズムが異なる可能性が考えられた。



Curcumin



Dehydrozingerone

dehydrozingerone, curcumin, colon cancer cell

講演番号：3J15a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ J校舎15会場

*Lactobacillus plantarum*の免疫調節作用に関わる因子の探索

Study of immune modulatory molecules in *Lactobacillus plantarum*

○杉浦　雅彦、奥津　雄太、信田　幸大[1]、田中　尚人[2]、佐藤　英一、保井　久子[3]、岡田　早苗
（東農大応生科・化学、[1]カゴメ（株）、[2]東農大・菌株、[3]元信州大）

○Masahiko Sugiura、Yuta Okutsu、Yukihiro Nobuta[1]、Naoto Tanaka[2]、Eiichi Satoh、Hisako Yasui[3]、Sanae Okada （Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agr., [1]KAGOME CO. LTD., [2]NRIC, Tokyo Univ. Agr., [3]Former Shinsyu Univ.）

【目的】近年、一部の乳酸菌において花粉症などで Th2 細胞へと傾いた活性バランスを、Th1 細胞側へと誘導するサイトカイン（IL-12、IFN-γ）を産生誘導させ、アレルギーを低減させる菌株が確認されている。2005 年森田らは碁石茶から分離した *Lactobacillus plantarum* 株の抗花粉症作用についてパイエル板を用いて IFN-γ 誘導能を指標に検討し、菌株間に IFN-γ 誘導能に差があることを報告した[1)]。そして 2008 年奥野らは同じく誘導には細胞構造を維持した細胞壁画分 Intact Cell Wall（ICW）が重要であること、さらに菌株間の活性の違いは細胞内容物（pp）に起因している可能性を報告した[2)]。そこで本研究ではマクロファージを用いて IL-12（p40）誘導能を指標に菌株間の活性差の因子を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 を用いて、新たに長野県の伝統発酵食品「すんき」から分離した *Lactobacillus plantarum* の菌株間において菌体による IL-12（p40）誘導能の違いが認められた。その中から IL-12（p40）誘導能が高い株の SNK1、低い株の SNK47 を供試菌株として選抜した。次に、選抜株の ICW と pp をそれぞれ調製し、各々の画分の IL-12（p40）誘導能を測定した。その結果、両株とも ICW では活性に差はなく、pp では活性もなかった。しかし、ICW に pp を混合した場合は活性が高くなることが確認された。そしてさらにいずれの株の ICW も菌体での活性が高かった SNK1 の pp を含む混合物で活性が高く、一方の SNK47 の pp を含む混合物と比べ IL-12（p40）誘導能に差が認められた。以上のことから、菌株間の活性差が pp 由来であることが示唆された。

pp は主に DNA、RNA、タンパク質を含有している。そこで、以下の方法で pp の中の活性要因の探索を行った。まず、SNK1、SNK47 から調製した pp に対して DNase、RNase、protease の各酵素処理を行い、それぞれを DNase-pp、RNase-pp、Protease-pp として作製し、これらを前述と同様に ICW と混合試験した。また、SNK1、SNK47 の菌体から DNA、RNA、タンパク質の疎精製物を抽出し、同じく ICWとの混合試験を行った。その結果、両株共に RNase-pp において IL-12（p40）誘導能が最も低下し、さらに抽出物においては RNA 画分において最も IL-12（p40）誘導能が上昇した。以上の2つの結果から、菌株間の活性差は RNA に起因する可能性が考えられた。

[1)]森田ら 2005 年度農化大会要旨集　p. 112
[2)]奥野ら 2010 年度農化大会要旨集　p. 43

Lactobacillus plantarum,　Immuno modulatory factor,　Intact Cell Wall

講演番号：3J15a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ J校舎15会場

タイトル　松樹皮抽出物(フラバンジェノール®)の外用による美白作用の検討
Title　the Whitening effect of Pine Bark Extract for external application on the skin.
○草場 宣廷、神谷 智康、池口 主弥、髙垣 欣也、中山 樹一郎[1]（㈱東洋新薬、[1]福岡大学・医）
○Nobutaka Kusaba, Tomoyasu Kamiya, Motoya Ikeguchi, Kinya Takagaki, Juichiro Nakayama[1]
(Toyo Shinyaku, [1]Fukuoka Univ)

【目的】松樹皮抽出物(フラバンジェノール®)には内服による美白作用があることが知られているが、外用（塗布）の場合に同様の効果があるかは不明である。そこで本研究では松樹皮抽出物を外用で用いた場合の美白作用を検討した。

【方法】顔面のシミを主訴とする健常成人女性を対象に、二重盲検無作為群間並行法で試験を実施した。被験者には、試験内容を十分に説明した後に文書による試験参加の同意を得た後に、スクリーニングを行った。皮膚科医が顔面のシミを確認した被験者に関して、コントローラーが無作為に4群に割り付けて試験に組み入れた。
被験者には松樹皮抽出物を含有する化粧水（高濃度、中濃度、低濃度)、または外見で区別がつかないように調製した松樹皮抽出物を含まない化粧水（プラセボ化粧水）のいずれか1種類を配布し、試験開始より12週間の間、毎朝・夕（1日2回）にシミの部分に化粧水を塗布させた。
試験開始前、及び試験開始後12週目にシミの部分のL^*値の測定を行い、シミの明度の変動を検討した。
測定の際には医師による問診も行い、有害事象の有無、及び試験品の試験部位（シミ）への効果に対する自覚症状を確認した。

【結果】解析対象となった被験者58名の平均年齢は46.1±4.7歳であった。
試験部位（シミ）における試験開始前と試験開始後12週目のΔL^*値に関して分散分析で解析したところ、有意差（$p < 0.05$）がみられ、各群の比較ではプラセボ化粧水使用群（ΔL^*値:-0.57±1.83）と松樹皮抽出物高濃度含有化粧水使用群（ΔL^*値:0.68±1.17）の間で有意な差が認められた（$p < 0.05$)。
試験品の試験部位（シミ）への効果に対する自覚症状に関しては、「やや効果を感じた」「効果を感じた」被験者の割合は、プラセボ化粧水使用群で41%であったのに対して、松樹皮抽出物高濃度含有化粧水使用群では69%であった。
また、医師による問診の結果、有害事象の発現は認められなかった。

以上の結果より、松樹皮抽出物の外用での使用には、美白作用があることが示唆された。

Pine Bark Extract, clinical trial, whitening

講演番号：3J15a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ J校舎15会場

LC/MS/MS 法を用いた 6-gingerol 、6-shogaol の高感度分析、および生姜摂取時の血中濃度の解析

○石川 茉莉花、加藤 範久、矢中 規之、（広島大院・生物圏科学）
Marika Ishikawa, Norihisa Kato, Noriyuki Yanaka (Grad Sch., Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

【目的】生姜は古来より漢方処方に用いられており、健康維持や増進に広く利用されている。近年、生姜の機能性について多くの研究がなされ、抗菌、整腸、および熱産生作用効果などが注目されており、それに伴い、生姜を原材料とした加工食品や飲料、さらにはサプリメントなどが開発されている。生姜に含まれる6-gingerol、および6-shogaolなどの成分の機能性が注目され、6-gingerol、および6-shogaolの成分分析については、HPLCと吸光度測定（OD法）の組み合わせが一般的に用いられているが、最終製品によっては成分濃度が低いために、従来のHPLC/OD法では定量することが困難な場合がある。そこで、本研究ではLC/MS/MS法を用いて6-gingerol、および6-shogaolの高感度の分析系を用いた定量を試みるとともに、生姜抽出物を経口で摂取した際の上記機能性成分の血中濃度の推移について、抱合体を含めて分析することを目的とした。
【方法】生姜粉末、あるいは生姜加工製品を100mg/mlになるようにアセトニトリル、あるいはエタノールで溶解し、LC/MS/MS法を用いて分析した。0.1%ギ酸、および5mMギ酸アンモニウムを含む10%アセトニトリル、および0.1%ギ酸を含む95%アセトニトリルの2液のグラジエント、流速0.4mL/min、カラム温度40℃によって6-gingerol、および6-shogaolを分離した。6-gingerol、および6-shogaolの同定・定量はタンデム四重極型質量分析(ACQUITY TQD, Waters)を用いて、6-gingerolのフラグメントイオンをm/z177、および6-shogaolのフラグメントイオンをm/z137に設定し測定を行った。さらに、生姜抽出物溶液を調製し、マウス体重1kgあたり14mgの6-gingerol、および4mgの6-shogaolとなるようにマウスに経口投与を行った。血液を採取し、血清をメタノール抽出後、分析に供した。グルクロン酸抱合体については、血清をβ-glucuronidaseで37℃2時間反応させた後、同様にメタノール抽出し、LC/MS/MS分析に供した。
【結果】LC/MS/MS 法を用いた分析法によって、6-gingerol は 0.5ppb、および 6-shogaol は 1ppb の濃度まで定量可能であった。生姜製品中における 6-gingerol、および 6-shogaol の定量実験における生姜乾燥粉末に関しては、エタノール抽出によって分析可能であったが、生姜製品に関しては 50%アセトニトリルによる抽出法が適していた。また、生姜抽出溶液をマウスに経口投与した 15 分後、血液中には 6-gingerol、および 6-shogaol は検出されず、6-gingerol glucronide、および 6-shogaol glucronide として存在していたことから、6-gingerol、および 6-shogaol の多くがグルクロン酸抱合を受けて、吸収されることが示唆された。

6-gingerol, LC/MS/MS, ginger

講演番号：3J15a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ J校舎15会場

タイトル　ジオスゲニンは、ヒト肝臓培養細胞においてLXRの転写活性を阻害し、脂肪蓄積を抑制する

Title Diosgenin suppresses triglyceride accumulation by inhibition of LXR transactivation in human cultured hepatocyte.

○森脇さや香[1]、植村卓[1]、後藤剛[1]、武谷圭子[2]、星野彰平[2]、柘植信昭[2]、槇島誠[3]、高橋信之[1]、河田照雄[1]（京大院農・食品生物[1]、ハウス食品･ソマテックセンター[2]、日大医･生化学[3]）

○Sayaka Moriwaki[1], Taku Uemura[1], Tsuyoshi Goto[1], Keiko Taketani[2], Shohei Hoshino[2], Nobuaki Tsuge[2], Makoto Makishima[3], Nobuyuki Takahashi[1], Teruo Kawada[1] (Kyotodai[1], Housefoods[2], Nichidai[3])

【目的】フェヌグリークはカレー粉に含まれる香辛料の一つである。当研究室の先行研究において、フェヌグリークを肥満糖尿病モデルマウスに摂食させると、血中中性脂肪値の減少および脂肪肝が改善した。解析の結果、フェヌグリークは、肝臓における脂質合成関連遺伝子のmRNA発現量の減少による脂質合成系の抑制を介して、肥満に伴う脂質代謝異常を改善することが示唆された。今回、フェヌグリークの脂質代謝異常改善に関与する活性成分として、フェヌグリーク中のサポニンアグリコンであるジオスゲニン(Dios)に着目し、Diosがヒト培養肝細胞であるHepG2細胞の中性脂肪蓄積に及ぼす影響について検討した。

【方法】HepG2細胞をDiosで処理し、脂質代謝に与える影響を検討した。中性脂肪蓄積、脂質合成関連遺伝子のmRNA発現量、および肝臓での脂質合成関連遺伝子発現の中心的な制御因子であるliver-X-receptor (LXR)の転写活性の測定を行った。

【結果】Diosは、HepG2細胞において中性脂肪蓄積と、脂質合成関連遺伝子のmRNA発現量を濃度依存的に有意に抑制した。さらにDiosはLXR合成アゴニストによるLXRの転写活性化を抑制し、LXRアンタゴニスト様の作用を示した。以上より、DiosはLXRの活性化を抑えることで、HepG2細胞の脂質合成関連遺伝子のmRNA発現量を抑制し、その結果、中性脂肪蓄積を減少させることが示唆された。

diosgenin, lipogenesis, liver X receptor

講演番号：3J15a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ J校舎15会場

化学成分によるシークワシャー果汁の識別

Authentic evaluation based on chemical components for *Citrus depressa* Hayata

○山本 健太、矢羽田 歩、佐々木 久美、吉田　淳子、坂本 宏司[1]、小川 一紀[2]、太田 英明（中村学園大、[1]広島総研・食品工技セ、[2]果樹研）

○Kenta Yamamoto, Ayumi Yahada, Kumi Sasaki, Atsuko Yoshida, Koji Sakamoto[1], Kazunori Ogawa[2], Hideaki Ohta (Nakamuragakuen Univ., [1]Hirosima Prefectural Technology Research Institute, [2]National Institute of Fruit Tree Science)

【目的】沖縄県北部で生産されているシークワシャー(*Citrus depressa* Hayata)は、発ガン抑制作用等が認められたポリメトキシフラボン類であるノビレチンを高濃度含有する。国民の健康意識の高まりを背景に需要は急速に増加したが、台湾、フィリピンなどの外国産カラマンシー(*Citrus madurensis* Lour.)果汁を原料とする加工品が多数市販され、排除勧告が出されるなど、社会的に大きな問題となってきた。本研究では、シークワシャー果汁の真正性を確保するために、化学成分を指標としてシークワシャー果汁とカラマンシー果汁の真正評価方法を検討した。

【方法】試料：シークワシャー果実を沖縄県農業研究センター名護支所より、カラマンシー果実を台湾行政院農業委員会高雄區農業改良場より入手し、ハンドプレスジューサーを用いて、全果搾汁した果汁を試料とした。果汁試料として沖縄県名護市勝山地区より得たシークワシャー果汁と台湾台中市奎美食品公司より入手したカラマンシー果汁を使用した。また、一般に沖縄で市販されている果汁飲料として、A～Jの計10種類を試料に用いた。

化学成分の検出・測定：TLCを用いて、3’,5’-Di-C-β-glucopyranosylphloretin (フロレチン配糖体)を検出した。フロレチン配糖体、ポリメトキシフラボン類(ノビレチン、タンゲレチン、シネンセチン)含量は、HPLCにより求めた。

香気成分の測定：Headspace-solid phase microextractionを用いて、GCおよびGC/MS分析を行った。

【結果および考察】現在、シークワシャー果汁とカラマンシー果汁の識別に用いられているフロレチン配糖体は、シークワシャーには含まれず、カラマンシーに含まれることが報告されている※。このフロレチン配糖体を用いて、TLC分析を行ったところ、シークワシャーにはスポットが検出されず、カラマンシーにのみスポットが出現した。また、市販の果汁飲料からも、同様のスポットが検出され、カラマンシー果汁の混入が疑われた。フロレチン配糖体は、HPLC分析においてもTLC分析と同様の結果を示したため、TLC分析が簡便な分析手段になると考えられた。ポリメトキシフラボン類は、カラマンシー果汁よりもシークワシャー果汁に豊富に含まれていた。香気成分の分析を行ったところ、シークワシャーに比較的高い割合で存在したγ-terpineneが、カラマンシーでは微量であった。γ-terpineneが低い市販の果汁飲料からは、フロレチン配糖体が検出されたため、γ-terpineneが新しい識別指標になると考えられた。これらの化学成分を用いて、シークワシャー果汁とカラマンシー果汁を識別可能であることを示した。

参考文献　※Ogawa, K. *et al.* (2001). *Fortunella*, *Phytochemistry*, **57**, 737-742.

Citrus depressa Hayata, *Citrus madurensis* Lour., Authentic evaluation

講演番号：3J15p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ J校舎15会場

エクオールのエストロゲン受容体非依存的な作用を担う遺伝子の同定

Identification of a gene mediating estrogen receptor-independent effect of equol

○山下 修矢、蒲池 祥子、隅田 崇文、阿比留 晶子、山田 耕路、立花 宏文
(九大院農院・生機科)
○Shuya Yamashita, Shoko Kamachi, Takafumi Suda, Akiko Abiru, Koji Yamada, Hirofumi Tachibana
(Kyushu Univ.)

【目的】大豆イソフラボンはエストロゲン受容体 (ER) に対して親和性を有することから植物エストロゲンと呼ばれ、ER依存的な生理活性の発現機序が知られている。一方、ERを介さないイソフラボンの生理作用の存在も示唆されているが、その詳細なメカニズムは不明である。我々はこれまでに、イソフラボンの一種であるエクオールのER非依存的ながん細胞増殖抑制作用を担う遺伝子を探索し、その候補遺伝子としてpap associated domain containing 5 (PAPD5) を見出した。本研究では、エクオールの各種がん細胞株におけるPAPD5依存的な抗腫瘍作用の発現とER依存的な生理活性との関係についてマウス腫瘍モデルを用いて検討した。
【方法】マウスメラノーマ細胞株B16、ヒト乳がん細胞株MCF-7において、RNA干渉法により定常的にPAPD5をノックダウンした各細胞を調製した。各ノックダウン細胞をエクオール存在下で培養後、生細胞数を測定した。また、各ノックダウン細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の発現量を測定した。PAPD5の発現をノックダウンさせたB16細胞およびMCF-7細胞を、それぞれC57BL/6マウスあるいはathymic nudeマウスの背部皮下に移植し、エクオールを経口投与した。その後、それぞれ2日あるいは4日ごとに腫瘍の体積を測定した。
【結果】エクオールはB16細胞の細胞増殖を抑制し、その作用はERアンタゴニストICI182,780やERノックダウンの影響を全く受けなかったが、PAPD5の発現をノックダウンすると消失した。一方、PAPD5発現のノックダウンはエクオールにより誘導されるエストロゲン応答性遺伝子の発現量に影響を及ぼさなかった。エクオールを経口投与 (30 mg/Kg/day) したマウスにおいてB16細胞の腫瘍成長は阻害されたが、PAPD5の発現を抑制したB16細胞の腫瘍成長は阻害されなかった。ところが、エクオールを20 mg/Kg/dayで経口投与したマウスでは、PAPD5をノックダウンさせたB16細胞の腫瘍の成長が促進された。エクオールはMCF-7細胞の増殖を促進し、さらにその作用はPAPD5の発現を低下させたMCF-7細胞に対して一層顕著であったが、こうした増殖促進作用はERアンタゴニストにより完全に阻害された。また、PAPD5をノックダウンさせたMCF-7細胞を移植したマウスのエクオール投与群では非投与群に比べ顕著な腫瘍成長が観察された。
以上より、エクオールのがん細胞増殖促進作用はER依存的であるが、細胞増殖抑制作用はER非依存的であり、このER非依存的なエクオールの作用をPAPD5が担っていることが明らかになった。

Isoflavone, Equol, Papd5

講演番号：3J15p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ J校舎15会場

短期間吸水により機能性を高めた大豆のDNAマイクロアレイ解析

DNA microarray analysis of soybean with increased functionality after short term imbibition

○田村 倫子、金井 友子、遠藤 祥子、村 清司、荒井 綜一[1]
（東農大応生科・栄養、 [1]東農大 ・総研）
○Tomoko Tamura, Tomoko Kanai, Shoko Endo, Kiyoshi Mura, and Soichi Arai
(Nutri. Sci., Tounodai, [1]NRI, Tounodai)

【目的】大豆は、発芽により糖質・タンパク質・脂質等の代謝がドラスティックに変動する。その結果、食味の変化、呈味アミノ酸の増加、GABAや各種ビタミン、オリゴ糖などが増加し、食品機能性が向上する。これら代謝産物の変化は、吸水による遺伝子発現の変動に起因するが、短時間吸水の効果を網羅的に解析した例はない。今回は、吸水初期の大豆のトランスクリプトーム解析を行い、機能性の変化に関与する遺伝子発現プロファイリングを得ることを目的とした。
【方法】北海道産スズマル（道総研・中央農験より譲受）を25℃、恒暗条件下において、湿潤した脱脂綿上で吸水させた。吸水 0、8、16、24、32、40、48 h 後の種実をドライアイスとともに粉砕し、これを試料とした。GABA含有量は、各試料をダブシルクロライドでラベル化し、CrestPak C18Sカラムを用いたHPLCで測定した。ビタミンC含有量は、ヒドラジン比色法を用いて総ビタミンC量を測定した。全RNAはQIAGEN RNeasy Plant Mini Kitを用いて抽出した。DNAマイクロアレイ解析のため、吸水0、8、16 h後の全RNAを用いてCy3ラベル化cRNA を合成し、ダイズオリゴDNA 44 kチップ（Agilent）を用いて遺伝子発現プロファイルを得た。
【結果と考察】種実の重量は吸水後 8 h で1.7倍、吸水後16 h で2倍になり、その後変動はなかった。GABA量は、吸水前は16.3 mg/100 g (穀物)であったが、吸水16 hまでに2.2倍になり、その後急激に増加し吸水48 hで7倍になった。GABAの合成に関与するGABAデカルボキシラーゼのmRNAは吸水16 h で初めて検出され、その後徐々に増加した。一方GABA分解に関わる酵素のmRNAは吸水前から種実中に存在し、徐々に増加した。ビタミンCは吸水とともに徐々に増加し、48 h後に3.7倍の5.5 mg/100 g (穀物)になった。ビタミンC合成に関与するL-galactnolactone dehydrogenaseのmRNAも吸水とともに徐々に増加した。

GeneSpring GXを用いてマイクロアレイデータを解析すると、チップ上に存在する全遺伝子42780個のうち、乾燥種実では58%の遺伝子が発現しており、吸水後8 hで67%、16 hで69%の遺伝子が発現していた。吸水過程で発現が10倍以上変動した遺伝子は1431個であった。このうち、吸水0 hから8 hにおいてのみ発現上昇した遺伝子は283個、吸水後0 hから8 hにおいても8 hから16 hにおいても発現上昇した遺伝子は40個であり、ジベレリン応答遺伝子や細胞伸長に関わる遺伝子などであった。また、吸水後8hから16hのみで発現上昇した遺伝子は940個存在し、糖代謝、各種アミノ酸代謝、脂肪酸代謝など食品の機能性に関わる遺伝子が挙げられた。一方、発現が減少した遺伝子は、リポキシゲナーゼ、オレオシン、グルコシル基転移酵素などであった。

soybean, imbibition, DNA microarray

講演番号：3J15p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ J校舎15会場

クルクミンに交差性を有する抗体の作製と解析

Preparation of the antibody against Curcumin and its analysis

○柘植　雅大、大塚　麻美、徐　龍、日坂　真輔、大澤　俊彦[1]、能勢　充彦（名城大・薬、[1]愛知学院大・心身科学部）

○Masahiro Tsuge、Asami Otuka、Ryong Seou、Shinsuke Hisaka、Toshihiko Osawa[1]、Mitsuhiko Nose（Meijo university, [1]Aichigakuin university）

【目的】クルクミンは秋ウコンに多く含まれる黄色色素成分で、抗酸化作用、抗がん作用、抗動脈硬化作用等、様々な生理作用を持つことが報告されている。また、クルクミンの代謝物の一つであるテトラヒドロクルクミンも強い抗酸化作用をもつことが示唆されている。しかし、こうしたクルクミンの持つ生理作用の報告例はあるものの、生体中でのクルクミンの機能性発現機構について、十分には明らかにされていない。そこで本研究では、クルクミン、さらにはテトラヒドロクルクミンを含む代謝物の機能性発現機構の解明を目的としている。まず、クルクミン・テトラヒドロクルクミンの体内動態を明らかにするため、クルクミン及びその代謝物を認識する抗体を作製し、生体内からの検出法の構築を行った。

【方法】抗体の作製には、クルクミンと共通の構造を有するフェルラ酸を抗原として用いた。これをBALB/cマウスに腹腔内投与し、ELISAにて抗体価の上昇を確認した。また、競合ELISAにてクルクミン・テトラヒドロクルクミン・フェルラ酸を構造特異的に認識する抗体であるかを検討した。さらに、作製した抗体の有用性を検討するため、5週齢の雄性wistar ratに、6週間継続して0.5% クルクミン、テトラヒドロクルクミン含有食を与えた2群と通常食を与えたコントロール群の計3群から肝臓を摘出し、切片を作製後、免疫染色を行った。

【結果】競合ELISAにて、作製した抗体はクルクミン・テトラヒドロクルクミン・フェルラ酸に対してそれぞれ交差性を有する事が認められた。また、免疫染色を行った結果、クルクミン投与群及びテトラヒドロクルクミン投与群の特に血管周辺細胞に局在して染色像が観察された。これらの結果より、本抗体が生体内からのクルクミン・テトラヒドロクルクミンの検出に有用な抗体であることが示唆された。

講演番号：3J15p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ J校舎15会場

脱脂米ぬか由来ジペプチジルペプチダーゼ－IV阻害剤の作成

Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran

○畑中　唯史、井上　良計[1]、熊谷　祐也、臼木　博一[2]、川上　賀代子、木村　昌代、向原　隆文（岡山生物研、[1]㈱サタケ、[2]学振・特別研究員）

○Tadashi Hatanaka, Yoshikazu Inoue[1], Yuya Kumagai, Hirokazu Usuki[2], Kayoko Kawakami, Masayo Kimura, Takafumi Mukaihara (RIBS Okayama, [1]SATAKE-JAPAN, [2]JSPS PD)

【目的】ジペプチジルペプチダーゼ－IV（DPP-IV）は、インスリン分泌を促すペプチドホルモンであるインクレチンを血中で分解する酵素である。よって、DPP-IVを緩やかに阻害するペプチドは、Ⅱ型糖尿病予防に役立つ。本演題では、未利用バイオマスである米ぬかタンパクの有効利用を目的として、市販酵素を用いてペプチド化し、そのDPP-IV活性阻害効果を検討した。
【方法】米ぬかタンパクは、脱脂ぬかを材料に、アルカリ抽出および酸沈殿にて調整した。得られた米ぬかタンパクを、市販酵素であるウマミザイムGあるいはビオプラーゼSPによって消化し、凍結乾燥することによって、ペプチドを得た。また、DPP-IVは、ヒト腎由来cDNAをテンプレートに、PCRにて遺伝子を得、菌体外発現用ベクター（pPICZα）に組み込み、メタノール資化性酵母（*Pichia pastoris* KM71H）を宿主に発現を行い、その培養上清を透析して用いた。阻害試験は、AlaPro-*p*NAを基質として用いた。
【結果】ウマミザイムGおよびビオプラーゼSP消化ペプチドのDPP-IV活性に対するIC_{50}(mg/ml)は、各々2.3±0.1, 26.4±2.3となり、ウマミザイムG消化ペプチドが、ビオプラーゼSP消化ペプチドと比較して高い阻害活性を示した。次いで、ウマミザイムG消化ペプチドを、ゲルロカカラム（Superdex peptide）にて分析したところ、その最大分子量は、約250であった。ウマミザイムG消化ペプチドをゲルロカカラム（HiLoad 26/60 Superdex 30 prep grade）により分画し、最大阻害活性の画分について、HPLC逆相カラム（Inertsil ODS-3）によりさらに分画した。215nmに吸収を示す画分を、LC-MS（LCMS-2020）分析したところ、プロリン含有ジペプチドであるLeu-ProおよびIle-Pro（いずれも分子量228.3）が検出された。また、その存在比は、６：４であった。そこで市販のXaa-Proジペプチド１５種類について、DPP-IV阻害活性を検討した。その結果、１５種類の中で、最も強い阻害活性を示すものは、Ile-Proであり、そのIC_{50}(mM)は、0.41±0.07と見積もられた。この値は、既報の阻害ペプチドであるDiprotin A（Ile-Pro-Ile）の約2倍のIC_{50}(mM)であった。また、そのレトロペプチドであるPro-Ileは、DPP-IVに対して、まったく阻害活性を示さなかった。Ile-ProのDPP-IVに対する阻害様式は拮抗的であり、その*Ki*値は、0.11mMであった。

Dipeptidyl peptidase IV, Rice bran, Peptide

講演番号：3J15p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ J校舎15会場

ヘキサンを用いない製法による米油の機能性成分について

On the Functional ingredients in rice bran oil produced without using hexane

○井上良計、熊谷祐也[1]、徳井圭裕[2]、植向直哉[2]、福森　武[2]、畑中唯史[1]（リピッドラボ、[1]岡山生物研　[2](株)サタケ　）

○Yoshikazu Inoue, Yuya Kumagai[1], Yoshihiro Tokui[2], Naoya Uemuki[2], Takeshi Fukumori[2], Tadashi Hatanaka[1], (Lipid Labo, [1]RIBS Okayama, [2]Satake Co.,)

【目的】現在米油は大半がヘキサンを用いて米糠から抽出されている。ヘキサンを用いずに米糠から脱脂することと、得られた脱脂糠から食品用に用いられるタンパクやペプチドを製造、利用することを検討してきた。加圧搾油またはエタノールで抽出された米粗油及びこれを精製する過程で発生する留分等に含有されるトコフェロール類及びγ-オリザノールを定量し、これらの機能性成分が多く含まれる米油を得る条件を明らかにすることを目的として本検討を実施した。
【方法】圧搾法、エタノール抽出及びヘキサン抽出によって抽出物を得た。エタノールからの抽出分はエタノール留去して分析に用いた。得られた脂質及び白色結晶に含まれるトコフェロール類及びγ-オリザノールなどの機能性成分の分析はＨＰＬＣを用いて実施した。なお、エタノール留去後、白色結晶が発生した。この成分についてはHPLC/MS/MSや酵素法を用いて同定した。
【結果】エタノール抽出についてはエタノールの濃度・量について検討した。エタノール９９．５，９５，９０％の濃度で５倍量を用い６０℃で２回抽出した。エタノール９９．５％での抽出についてはヘキサン抽出とほぼ同じ重量が抽出された。抽出物はエタノール９５％までは脂質と白色結晶が分離し抽出重量はアルコール濃度とともに低下する傾向であった。エタノール９０％では白色結晶は分離せず均質な液状となり、抽出重量も減少した。ヘキサン抽出によって得られる脂質には白色結晶が生じなかった。白色結晶を分離する方法として９９．５％エタノールを用い油分を再抽出して測定したところ９０％エタノール抽出油で９．９３％のγオリザノールが含まれ、トコフェロール類も２．４１％と多く高濃度の機能性成分を含む米油が得られた。９９．５％エタノールで６．８２％、９５％エタノールでは７．４６％のγ-オリザノールが抽出油分に含まれ、ヘキサン抽出油４．９％と圧搾による油分は４．９２％～６．３８％のγ-オリザノールが含まれていた。ヘキサン抽出後の脱脂糠から９９．５～９０％のエタノールで抽出された白色結晶には０．３～０．５２％のγ-オリザノールが含まれているが、米糠からエタノール抽出後、析出した白色結晶にはほとんど含まれていなかった。
白色結晶の同定についてはフェノール・硫酸法（糖量を測定）・3,5-dinitro salicylic acid（DNS）（糖の還元末端数を測定）・グルコース量測定（CII test WAKO）・ゲルろ過（糖のサイズを分析）・スークロース分解酵素による分解等の実施結果からグルコースとフルクトースの二糖が主成分でありエタノール抽出によって米糠中のスークロースが抽出されることが示唆された。

Rice bran oil1, tocophrols2, ganma-oryzanol3

講演番号：3J15p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ J校舎15会場

高分解能LC-Orbitrap MSによるトウモロコシ中のかび毒配糖体（マスクドマイコトキシン）のノンターゲットスクリーニング

Non-targeted screening of mycotoxin glucosides (masked mycotoxins) in corn by high resolution LC-Orbitrap MS

○中川 博之、坂本 茂[1]、佐合 由紀、久城 真代、長嶋 等（(独)農研機構・食総研、[1](株)サーモフィッシャーサイエンティフィック）

○Hiroyuki Nakagawa, Shigeru Sakamoto[1], Yuki Sago, Masayo Kushiro, and Hitoshi Nagashima (NARO Food Research Institute, [1]Thermo Fisher Scientific)

【目的】LC-Orbitrap MSは、内部標準物質による補正をすることなく高度な分解能を維持可能な新規な液体クロマトグラフ-電場型フーリエ変換質量分析装置である。これにより、精密質量を指標とする「ノンターゲット分析」が可能になり、試薬標品が入手不可能な化合物も検出できるようになった。一方、かび毒（マイコトキシン）は一部の糸状菌が産生する二次代謝産物であるが、各種の農作物においてその汚染がしばしば問題になっている。近年、かび毒にグルコースが付加したかび毒配糖体（マスクドマイコトキシン）の存在が穀類等において報告されている [1)]。これらの配糖体は加水分解等によって元のかび毒を遊離する可能性があることから、新たなかび毒潜在リスクとして注目されている。演者らはこれまでに、かび毒汚染を受けた小麦中においてトリコテセン系かび毒（ニバレノール、フザレノン-X）由来の配糖体が存在することを報告している [2)]。今回、トウモロコシ試料を用いてノンターゲットスクリーニングを行ったところ、新規なマスクドマイコトキシンを検出したので報告する。

【方法】かび毒による汚染を受けたトウモロコシ粉末試料を入手し、アセトニトリル/水混合液で抽出後、遠心分離を行った。得られた上清の一部を採取し窒素ガス気流下で乾燥し、アセトニトリル/水/酢酸混合液に再溶解した試料についてLC-Orbitrap MSを用いて分析を行った。イオン源にはエレクトロスプレープローブを使用し、正および負イオン化条件による分析を行った。LCにおける分離は逆相カラムを用いた水/アセトニトリル直線濃度勾配により行った。

【結果】設定分解能10万のフルマススキャンモード（外部標準法）にてLCMS測定を行ったところ、新規マスクドマイコトキシン由来と思われるイオンが検出された。そこで、精密質量と各種フラグメントイオン等の情報に基いて構造解析を行った。同じ試料中に検出された糖が付加していないかび毒とのLCにおける保持時間の比較から、糖（グルコース）が付加することによって極性が増していることが示唆された。

1) Berthiller F et al., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 3421-3425 (2005)
2) Nakagawa H et al., Food Additives and Contaminants: Part A, 28, 1447-1456 (2011)

masked mycotoxin, LC-Orbitrap MS, corn

講演番号：3J15p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ J校舎15会場

マヌカ蜂蜜に由来する新規配糖体Leptosinのケミカルマーカーとしての有用性について

Identification of novel glycoside, Leptosin, as a chemical marker of manuka honey

○加藤　陽二、梅田　菜月、前田　明日菜、松本　大樹、北元　憲利、菊崎　泰枝[1]（兵庫県立大・環境人間、[1]奈良女子大・生活環境）

○Yoji Kato, Natsuki Umeda, Asuna Maeda, Daiki Matsumoto, Noritoshi Kitamoto, Hiroe Kikuzaki[1] (University of Hyogo, [1]Nara Women's University)

【目的】マヌカ（*Leptospermum scoparium*及び*Leptospermum polygalifolium*）に由来する蜂蜜（マヌカハニー）は抗菌性などの機能性に優れているとされるが、抗菌活性を含め、機能性発現の機序は充分に明らかになってない。マヌカハニーの抗炎症作用について調べるため、炎症性酵素の１つである好中球ミエロペルオキシダーゼ（MPO）阻害活性に着目し、阻害成分を探索したところ、既知化合物methyl syringate(MYSR)と新規配糖体Leptosinを見出したので、報告する。

【方法】マヌカハニーを水に溶かし、C18固相抽出カラムあるいはDiaion HP20カラムを用いて粗分画し、成分をHPLCにより更に分画した。各画分のMPO阻害活性測定は既報に従った（Kato et al. *BBB* 2003）。単離したMYSRは標品との比較、また、新規配糖体はNMR、FT-IR、質量分析等により構造を決定した。

【結果】いくつかの蜂蜜のMPO阻害活性を調べたところ、マヌカハニーに最も強い阻害活性が認められた。マヌカハニーを更に分画・精製したところ、２つの主要な成分がMPO阻害活性を有することが分かった。構造解析の結果、既知化合物であるMYSR、及び、MYSRをアグリコンとする新規配糖体methyl 4-O-［β-D-glucopyranosyl-(1 → 6) - β -D-glucopyranosyl］-3,5-dimethoxybenzoate (methyl syringate 4-ß-D-gentiobiose)を同定し、この新規配糖体をマヌカの学名にちなんでLeptosinと命名した。新規配糖体Leptosinはニュージーランド（NZ）原産のマヌカ（*L. scoparium*）及びオーストラリアの類縁種（*L. polygalifolium*）に由来するマヌカハニーに0.2-1.2 µmol/gの範囲で含まれていたが、オセアニア以外の地域で得られた蜂蜜からは全く検出できなかった。NZの蜂蜜にはLeptosinが含まれている例もあったが、ミツバチが近隣に咲いているマヌカの花蜜を採ったか、あるいは蜂蜜を加工する過程で混入したためと考えられる。イタリアのアスフォーデルハニーにはMYSRが高濃度に含まれているが（Tuberoso et al. *JAFC*, 2009）、Leptosinは検出できなかった。蜂蜜以外で、アニスシードにMYSRに単糖が結合した配糖体が存在すると報告されているが（Fujimatu et al. *Phytochemistry* 2003）、この場合もLeptosinは見いだせなかった。以上のことから、Leptosinはマヌカハニーの純度検定や産地偽造を防止するための優れたケミカルマーカーになることが期待できる。マヌカハニーの抗菌活性はunique manuka factor、UMFとして表示されている。このUMF値とLeptosin及びMYSR量の比較を行ったところ、UMFとLeptosinは正相関、UMFとMYSRは逆相関を示した。Leptosinには*Staphylococcus aureus*に対しては弱い抗菌活性しか認められなかったが、今後、他の菌種や別の抗菌物質に対する抗菌活性増強作用等を調べる必要が有る。

Manuka honey, Glycoside, Chemical marker

講演番号：3J15p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ J校舎15会場

南米産食用キノコの生理活性

Immunomodulating activity of a Grifola mushroom

山田由華、○湊健一郎[2]、横手将太、原田栄津子[1]、森園智浩[1]，小原章裕[2]（名城大・農、[1]岩出菌研，[2]名城大・院）

Yuka Yamada, ○Ken-ichiro Minato[2], Shota Yokote, Etsuko Harada[1], Toshihiro Morizono[1], Akihiro Ohara[2] (Meijo University, [1]Iwade Research Institute of Mycology Co.Ltd., [2]Graduate School of Meijo University)

【目的】

アンニンコウは南米のチリ，アルゼンチンに自生している大型で肉厚のキノコである。同属のマイタケには抗腫瘍活性や免疫賦活作用など様々な生理活性が報告されており，アンニンコウも同様に生理活性を有することが期待される。そこで本研究ではマウス由来マクロファージ細胞株を用いて，アンニンコウの免疫調節作用を調べた。またヒト子宮頚部ガン細胞株を用いて，それに対する細胞障害作用についても検討した。

【方法】

アンニンコウ子実体を熱水で抽出して得られた可溶性画分および不溶性画分をさらに分画して試料を調製した。すなわち，可溶性画分からは限外ろ過により，さらに分画して得られた高分子画分を試料とした。また不溶性画分においてはメタノール抽出により得た抽出画分に加えて，さらに水/酢酸エチル/ヘキサン＝1：1：1で抽出して，得られた水層画分と有機層画分をそれぞれ用いた。これら4画分を試験に供した。

免疫調節作用はマウス由来マクロファージ様細胞株RAW264を各試料で刺激して，24時間後の分泌サイトカイン類を調べた。またMTT法により，ヒト子宮頸がん細胞株HeLaに対する直接的細胞障害性を調べた。

【結果】

各試料のうちアンニンコウ熱水抽出高分子画分においてRAW264を刺激した結果，NO(Nitric oxide)など炎症性ケミカルメディエーターやサイトカインの産生が誘導されることが示された。従って，アンニンコウはマクロファージを活性化する免疫調節作用を有することが示唆された。しかしながら，本画分はHeLaに対して細胞傷害作用は示さなかった。

ところで，生理活性成分を抽出した後のキノコ子実体残渣は廃棄されることが多い。そこで本実験ではアンニンコウ熱水抽出残渣をさらにいくつかの画分に分けて，それらの有効再利用の可能性についても検討した。その結果，本残渣のメタノール抽出画分のうち有機層画分にHeLaに対する細胞障害作用が確認された。

macrophage, immunomodulating activity, cytotoxicity

講演番号：3J15p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ J校舎15会場

NMRによるコーヒーの非破壊分析：スペクトルの帰属、焙煎による成分変化の解明および品種・産地の鑑別への応用

Nondestructive Observation of Coffee by NMR Spectroscopy: Signal Assignments, Applications in Monitoring of Roasting Process and Distinguishing of Coffee Beans by Their Species and Origins.

○魏 菲菲、降旗 一夫、甲田 正則、胡 芳宇、宮川 拓也、田之倉 優（東大院・農生科・応生化）
○Wei Feifei, Kazuo Furihata, Masanori Koda, Fangyu Hu, Takuya Miyakawa and Masaru Tanokura (The University of Tokyo)

【目的】本研究では、NMRを用いてコーヒー豆抽出物を前処理せずにそのまま1次元・2次元NMRスペクトルを測定し、現れたシグナルを帰属することによりコーヒー豆の成分を定性・定量的に分析する。また、シグナルの緩和時間等を指標としてコーヒー成分の状態分析も行う。さらに、多変量解析法と併用することによりコーヒーの化学組成に基づく焙煎変化を解明し、コーヒー豆の品種・産地などの非破壊鑑別法を確立し、簡便且つ迅速な品質管理に応用する。
【方法】コーヒー豆を重水で抽出し、混合状態のままで1次元及び2次元NMRスペクトルを測定し、各スペクトルを解析した。
【結果】
1. NMRを用いたコーヒー生豆と焙煎豆の成分分析
　焙煎によるコーヒー成分の変化を明らかにするためには、生豆の成分組成を知る必要がある。そこで、アラビカ種生豆抽出物の1次元・2次元NMRスペクトルを測定した。シグナル帰属により16種類の生豆成分を定性・定量し、シグナル緩和時間の変化から有機酸類成分の存在状態を考察した。また、中煎り程度のコーヒー焙煎豆抽出物について1次元・2次元NMRスペクトルを測定し、焙煎豆成分の定性・定量及び状態分析を行った。その結果、クロロゲン酸の熱分解産物であるキナ酸類や焙煎により溶出された多糖類物質などの24種類の成分を帰属することができた。
2. NMRを用いたコーヒー豆焙煎過程のモニタリング
　コーヒー生豆から焙煎度が異なるコーヒー豆の1次元NMRスペクトルを測定し、各成分のシグナルの変化を追跡した。シグナル積分値の変化を計算し、得られた焙煎経時変化曲線と主成分分析法（PCA）による解析から、焙煎変化によって生じる化学組成の変化を解明し、帰属情報を活用することで各焙煎段階を特定できるマーカー成分を同定できた。
3. NMR及び主成分分析法を用いたコーヒー生豆の品種・産地の識別
　コーヒー豆のNMRスペクトルには成分の種類・含量・存在状態に関する非常に多くの情報が同時に含まれていることから、NMRスペクトルとPCA解析により、2種類6産地の生豆を品種・産地ごとに区別することに成功した。また、スペクトルの帰属情報より、各品種や産地の特徴成分も特定することに成功した。この成果は、コーヒー豆の品種、原産地、偽和の有無の識別に有効な分析手法と考えられる。

Coffee, NMR, Principal Components Analysis

講演番号：3J15p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ J校舎15会場

桂ウリ果実の成分と熟度の関係とその特徴を活かした利用方法の検討

Relationships between Ingredients and Ripening Stage in Katsura-uri, and its Characteristic Utilization

○佐々木 梓沙、中村 考志、朴 恩榮、佐藤 健司、城田 浩治[1]、末留 昇[1]、重田 友明[2]、岡本 繁久[2]、松尾 友明[2]（京府大・生環、[1]京府農林セ、[2]鹿大・農）

○Azusa Sasaki, Yasushi Nakamura, Eun Young Park, Kenji Sato, Koji Shirota[1], Noboru Suetome[1], Tomoaki Shigeta[2], Shigehisa Okamoto[2], Tomoaki Matsuo[2] (Kyofudai, [1]Kyofunorinse, [2]Kadai)

【目的】桂ウリは京都の伝統野菜の一つで，その未熟果実はこれまで漬物の材料として用いられてきた．桂ウリ果実は，未熟期は香気を発しないが，完熟期にはメロン様の香気を発するようになる．演者は桂ウリ果実の成熟ステージ間の成分含有量の差異をとらえることで，各ステージの果実特性を明らかにし，その特性を活かした新たな利用方法の検討を試みた．桂ウリ果実を1（未熟期）から5（完熟期）の5段階の成熟ステージに分類し，果実成分量（香気成分，糖，水分，タンパク質，脂質，炭水化物，灰分，食物繊維）の成熟に伴う変化を調べた．また，香気を発するが炭水化物の含有量は少なかったステージ5の果実にゼロカロリー非糖質甘味料で甘味を付加し，摂取後も血糖値上昇が少ないデザートを考案した．

【方法】桂ウリ果実を大きさと果皮の色を指標として5段階の成熟ステージに分類した．各ステージの桂ウリ果実について果皮のL*a*b*表色系による色差分析と果肉の破断強度の測定をおこなった．果肉は凍結乾燥粉末とし，各ステージの桂ウリ果実についてGC-MSによる香気成分分析，一般成分（水分，エネルギー，タンパク質，脂質，炭水化物，灰分，食物繊維）分析，HPLCによる糖（グルコース，フルクトース，スクロース，マルトース）分析をおこなった．健常者10人（男性6人，女性4人）がグルコース25 g ，糖質25 g相当のらいでんレッドメロン240 g，ゼロカロリー非糖質甘味料で甘味を付加したステージ5の桂ウリ240 gをそれぞれ摂取したときの血糖値を摂取後120分まで測定した．

【結果】果皮色は，L* 値はステージ1から3にかけて増加，その後減少し，a*値はステージ1から4にかけて増加，ステージ5では変化せず，b*値はステージ1から4にかけて減少，ステージ5では増加した．果肉の破断強度はステージが進むにつれ減少した．香気成分はステージ5ではステージ1で少量含まれていた3-メチルチオプロピオン酸エチル（メロン様香気），酢酸ベンジル（ジャスミンの香気），オイゲノール（クローブの香気）の含有量が増加し，ステージ1では検出されなかったメチルチオ酢酸エチル（アンズ様香気），2-メチルチオエチル酢酸（花様香気），3-メチルチオプロピル酢酸（果物様香気）も検出され，これらが複合して桂ウリの特有の香気を示すと考えられた．一般成分と4種類の糖の総含有量は成熟ステージが進行しても変化せず，糖の総含有量はステージ5でメロンのそれの25%であった．桂ウリジュース摂取後の血糖値の最高血糖値と空腹時血糖値の差は，メロン摂取後の38%，その曲線下面積は37%であった．桂ウリ果実は，熟度の進行に伴いメロン様の香気を発するが，糖の含有量は増加しない特徴をもち，この特徴は摂取後も血糖値上昇が少ないデザートとしての桂ウリ果実の新たな利用に活かせるかもしれない．

odor, sugar, blood

講演番号：3J15p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ J校舎15会場

庄内メロンのメタボローム解析

Metabolomic analysis of local melon 'Shonai-melon'

○及川　彰[1,2]，阿部　香織[2]，渡辺　絵理子[3,4]，星　宏良[3]，冨田　勝[2]，曽我　朋義[2]（[1]理研PSC(鶴岡)，[2]慶應大IAB、[3]機能性ペプチド研究所、[4]山形大・農）

○Akira Oikawa[1,2], Kaori Abe[2], Eriko Watanabe[3,4], Hiroyoshi Hoshi[3], Masaru Tomita[2], Tomoyoshi Soga[2] ([1]RIKEN Plant Science Center (Tsuruoka), [2]Institute for Advanced Biosciences, Keio University, [3]Research Institute for the Functional Peptide, [4]Faculty of Agriculture, Yamagata University)

【目的】メタボローム解析は生体内の代謝物を網羅的に分析する手法であり，医療から農業まで幅広い分野で応用されている．一方，地域農産物（特産品，在来作物）は，地場の農業や食品加工業などにおいて有効なブランドとなる．本研究では，山形県庄内地方の地域農産物の一つである‘庄内メロン’をメタボローム解析に供した．これにより，他のメロンとの違いや‘庄内メロン’に含まれる機能性成分を明らかにし，‘庄内メロン’の高付加価値化を目的とした．

【方法】メロンは可食部に加え，摘果，成熟果の皮と種子，葉，蔓，茎に分け，それぞれに含まれる代謝物をメタボローム解析によって網羅的に調べた．アミノ酸や有機酸などのイオン性化合物はキャピラリー電気泳動質量分析装置（CE-MS）を用い，フラボノイドや糖類などの中性化合物は液体クロマトグラフィー質量分析装置（LC-MS）を用いて分析した．用いたメロンの品種は，よく流通している‘アンデス’に加え，庄内メロンの‘鶴姫’および‘鶴姫レッド’を用いた．またメロンの機能性を明らかにするために血管や皮膚の細胞を用いて，それらの増殖活性を指標としたアッセイも行った．

【結果】CE-MSとLC-MSを用いたメタボローム解析の結果，メロンの各部位から計186の代謝物が検出された．代謝物の種類によって，部位特異性および品種特異性が認められた．品種間では‘鶴姫’において他より糖類やアミノ酸の量が多いことが確認された．また部位間では，ショ糖は果肉に特に多いがブドウ糖や果糖は果肉だけでなく皮にも多く存在していることや，種子にはコーヒー酸などが多く含まれていることも明らかになった．さらに，ギャバやシトルリン，トリゴネリンなどの機能性成分に加え，多数のフラボノイド類もメロンの様々な部位から検出された．加えて，メロンの葉抽出液をヒト皮膚表皮細胞に処理した結果，細胞の増殖が促進されることも明らかになった．これは可食部以外の，通常は廃棄している部分が有効に利用できる可能性を示唆している．現在，メタボローム解析の結果と細胞を用いたアッセイの結果から，メロンに含まれる機能性について検討している．

なお，本研究は地域イノベーションクラスタープログラムの支援を受け実施された．本プログラムでは主に庄内地域の農産物に含まれる機能性を評価することによって，既存農産物や加工品の高付加価値化，さらには新規品種または加工品の開発を促進することを目的としている．

metabolomics, melon, functional components

講演番号：3J15p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ J校舎15会場

静岡県産クラウンメロンにおけるアミノ酸の分布および抗酸化活性

Distribution of amino acids and antioxidant activities in the several tissues of musk melon produced in Shizuoka prefecture

○吉川　尚子（静岡理工科大・理工）
○Naoko Yoshikawa (Shizuoka Inst. of Sci. and Tech.)

【目的】静岡県袋井市一帯が産地であるクラウンメロンは、アールスフェボリット種の特に優れた品種を用いて栽培されている最高品質のマスクメロンである。これまで、クラウンメロンに含まれる成分についての詳細な知見は得られていないが、マスクメロンでは、γ-アミノ酪酸(GABA)含量が高いことが知られており、また、様々な種類のメロンにおいて、抗酸化活性が報告されている。そこで、本研究では、クラウンメロンのアミノ酸含量と抗酸化活性に着目し、クラウンメロンにおける遊離アミノ酸含量を測定するとともに、抗酸化活性の測定を行った。さらに、クラウンメロンの果肉以外の非可食部とされる部位についても測定を行い、機能性食品素材としての利用性について検討を行うこととした。
【方法】クラウンメロンを果肉、維管束、種および皮に分けて分析に供した。また、成熟個体を栽培する過程で間引かれた小メロンも試料として用いた。クラウンメロンの各組織を用いて5% TCAによりアミノ酸の抽出を行い、アミノ酸自動分析計で遊離アミノ酸の分離定量を行った。抗酸化活性の測定は、クラウンメロン各組織をPBSおよび80%エタノールでそれぞれ抽出し、Folin-Ciocalteu法による総ポリフェノール含量の測定、DPPHラジカル消去活性の測定、およびSOD Assay kitを用いてSOD様活性の測定を行った。
【結果】クラウンメロンの各組織における主要な遊離アミノ酸は、アスパラギン酸（Asp)、グルタミン（Gln)、アラニン（Ala)、およびGABAであった。特に維管束では、遊離アミノ酸が豊富に含まれていることが明らかとなった。GABAは全ての組織に存在していたが、維管束で最も高い値を示した。皮と小メロンにおけるアミノ酸含量は、他の組織に比べて低い値を示したが、皮で最も豊富に含まれていたアミノ酸はGABAであり、小メロンでは、Glnが最も豊富に含まれていた。また、シトルリン（Cit）も全ての組織に存在しており、特に維管束と果肉で高い値を示した。総ポリフェノール含量と、DPPHラジカル消去活性、およびSOD様活性については、全ての組織において検出されたが、特に維管束のPBS抽出液で高い値を示した。したがって、クラウンメロンの全ての組織において、機能性が期待されるアミノ酸が存在し、抗酸化活性が検出されたため、非可食部とされている部位も機能性食品素材として利用できるものと考えられたが、特に維管束は、機能性食品素材として利用価値が高いものであることが示唆された。

musk melon, amino acids, antioxidant activity

講演番号：3J15p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ J校舎15会場

鮮度低下に伴う組織変化が冷凍魚肉の氷結晶形態に与える影響

The Change of the Microscopic Structure Caused by Declining Freshness Affects the Ice Crystal Morphology in Frozen Fish Muscle.

○小南 友里、渡辺 学、鈴木 徹（海洋大・食品）
○Yuri Kominami, Manabu Watanabe, Toru Suzuki (Kaiyodai)

【目的】魚肉は鮮度低下に伴い顕著に組織が軟化する．原因として組織を構成するタンパク質の分解や、それに伴う細胞膜破壊が挙げられる．これらの現象が凍結時の氷結晶形態に影響を及ぼす可能性は非常に高い．しかし、魚肉の凍結前鮮度と氷結晶形態の関連についてほとんど知見が無い．そこで本研究では、鮮度低下に伴うタンパク質の変化とそれらが氷結晶形態に及ぼす影響について組織化学的手法を用いて調べた．
【方法】新鮮肉と鮮度低下肉を凍結試験に供した．活マアジを即殺し三枚に卸したものから背肉のみを取り出し、採肉直後のものを新鮮肉、採肉後5℃で4日間放置したものを鮮度低下肉とした．鮮度指標にはATP残量を用い、凍結前の両試料から核酸関連物質を抽出し、HPLCによって両サンプルから得た抽出液を分析してATP量を求めた． 凍結試験では1cm角に切り出した新鮮肉および鮮度低下肉を－20℃のフリーザーで約24時間凍結させた．両凍結肉から凍結切片を得てHE染色ならびに免疫染色に供した．免疫染色では、ラミニンをターゲットとし、蛍光色素で標識した．ラミニンは骨格筋の細胞外マトリクスに多く存在するタンパク質の1つである
【結果】ATP残量を比較したところ、即殺後では高かったATP残量が放置後に著しく低下しており鮮度低下が定量的に確認された．HE染色の結果、新鮮凍結肉に比べて鮮度低下凍結肉のほうが氷結晶サイズが明らかに大きい様子が観察された． さらに、新鮮凍結肉では隣り合う筋線維が連なって観察されたのに対し、鮮度低下凍結肉では筋線維が分断されているように見受けられた．また、新鮮凍結肉では免疫染色によって膜の形状が分かるほどラミニンが多く検出されたのに対し、鮮度低下凍結肉ではラミニンがほとんど検出されず細胞間の境界が分からなくなっていた．劣化凍結肉では蛍光顕微鏡観察においても、HE染色結果同様に分断された筋線維と粗大な氷結晶が観察された．

fish, freezing, freshness

講演番号:3J15p15
講演日時、会場:3月24日16:43～ J校舎15会場

タイトル　リグナンは植物エストロゲンか？

Title　Is lignan phytoestrogen?

○岸田 太郎、本永 芳恵、梶原 秀平、山内 佳也、村上 聖、
海老原　清、山内　聡（愛媛大・農・生資）

○Taro Kishida, Yoshie Motonaga, Shuhei Kajiwara, Yoshiya Yamauchi, Satoru Murakami, Satoshi Yamauchi, Kisyoshi Ebihara (Faculty of agriculture,Ehime university)

【目的】これまでに我々は大豆イソフラボン・ダイゼインの腸内細菌代謝物エコールがメスラットの飼料摂取量を低下させることを見出し、この効果とエコールのエストロゲン性の関係を検討してきたが、今のところin vivoにおいて、エコールには実質的なエストロゲン性は認められていない。リグナンは大豆イソフラボンと並び食品成分中の植物エストロゲンとして注目されており、腸内細菌代謝物であるエンテロラクトン（ENL)、エンテロジオール（END）が活性成分と考えられている。本研究では食品中に比較的多量に存在しているリグナンについて、卵巣摘出(OVX)ラットの子宮重量に与える影響を指標にエストロゲン性を検証するとともに、リグナン及びその代謝物の血中濃度、飼料摂取量への影響も調べた。

【方法】OVXまたはsham(偽手術)を行った6週齢メスSD系ラットに、0.02%～0.1%のセコイソラリシレジノール(SECO)、マタイレジノール(MAT)、ラリシレジノール(LARI)、ピノレジノール(PINO)を添加したAIN-93G基本飼料を与え、３週間飼育し、成長を観察した。試験期間終了後、血中リグナンおよび代謝物濃度、子宮重量、各組織重量を測定した。

【結果】どのリグナンを食餌させても血中にENL、ENDが高濃度で存在したが、食餌させたリグナン自体の濃度はこれらに比べて低い濃度であった。子宮重量はOVXにより著しく低下したが、どのリグナンを摂取させても低下が抑制されることは無かった。飼料摂取量および体重増加量はOVXにより増加したが、どのリグナンを食事させても変化は見られなかった。

lignan, phytoestrogen, rat

講演番号：3J15p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ J校舎15会場

カンボジアの伝統的水産発酵食品の一般成分分析および微生物解析

Microbiological and proximate analysis of Cambodian traditional fermented fish products

○Chuon Mony Roth、Koyanagi Takashi、Shiomoto Mimoe、Sasaki Tetsuya[1]、Michihata Toshihide[1]、Nakamura Shizuo[1]、Enomoto Toshiki
石川県大・食品、[1]石川県・工試
○Chuon Mony Roth, Takashi Koyanagi, Mimoe Shiomoto, Tetsuya Sasaki[1], Toshihide Michihata[1], Shizuo Nakamura[1], Toshiki Enomoto
Dept. Food Sci., Ishikawa Pref. Univ., [1]Indus. Res. Inst. Ishikawa

【BACKGROUND】 Prahok and kapi are fermented fish paste made from tiny fresh water fish and small shrimp, respectively. Toeuk Trey is a fish sauce produced with small fresh water or marine tiny fish. These traditional fermented fish products were used widely as seasonings in Cambodia. However, microorganism and proximate composition in these Cambodian fermented products has not been elucidated. The present study aims to investigate microbiological and proximate analysis in Cambodian traditional fermented fish products.

【METHOD】 Prahok, Kapi and Toeuk Trey were collected from factories in Cambodia. The proximate composition of these fermented samples was determined by using official analytical method in Japan. Isolation of microorganisms from the samples was done by standard method using MRS, GAM, TSA and PDA broth. Physiological and morphological characteristics were conducted following the standard determinative bacteriology procedure. The isolated microorganism was phylogenetically identified by the sequence of ribosomal RNA (rRNA) gene using the primers (7F, 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') and (1510R, 5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') for amplification.

【RESULT】 Proximate composition of Canbodian traditional fermented fish products was similar to that of fermented fish products reported such as Ishiru (fish sauce) or Nukazuke (fermented fish with rice bran) in Japan. Wide variety of microbial species were identified from those products, and microbiota of most samples are dominated by *Tetragenococcus* and *Staphylococcus.* Other minor bacterial genera such as *Clostridium, Bacillus, Psychrobacter*, *Virgibacillus, Lysinibacillus, Kocuria, Micrococcus, Lentibacillus,* and *Jeotgalicoccus* were detected, and low numbers of yeasts *Rhodotorula* and *Candida* were also seen. Overall, many halotolerant bacteria were isolated, reflecting the production process of these foods including the addition of large amount of salt.

fermented food, proximate analysis, microbiological analysis

講演番号：3J15p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ J校舎15会場

アルコール処理酵母を用いた“生臭み”低減ワインの開発-(1)

Development of the Method to Reduce Fishy Aftertaste in Wine Using Alcohol-Treated Yeast Cells

○金井 圭子、辻 俊一、横山 亜紀、田村 隆幸[1]、花牟礼 研一[1]、佐々木 佳菜子[1]、高田 良二[1]、吉田 聡（キリンホールディングス・フロンティア技術研、[1]メルシャン・商品開発研）

○Keiko KANAI, Toshikazu TSUJI, Aki YOKOYAMA, Takayuki TAMURA[1], Kenichi HANAMURE[1], Kanako SASAKI[1], Ryoji TAKATA[1], Satoshi YOSHIDA (Centl. Lab. Front. Technol., KIRIN HD, [1]Mercian Corporation)

【背景・目的】

我々は、魚介類とワインを食べ合わせた時に感じる“生臭み”が、ワインに含まれる数mg/L以上の鉄イオンが原因であることを報告している。しかしながら、既存の鉄低減法は、コストが高いカラム処理や、他成分への影響の大きいキレート剤の添加が一般的であるため、微量の鉄を除去できる実用的な手法が求められている。このような背景から、ワイン中の鉄をより効果的かつ特異的に除去する技術を開発することを目的として以下の実験を行った。

【方法・結果】

まず、ワイン発酵中の鉄の挙動を調査する目的で、糖の完全消費を発酵終了の目安とする通常の発酵試験（約10日間）を行ったところ、酵母は鉄をほとんど吸収しないことが明らかとなった。一方、ワインの伝統的製法の１つで、数ヶ月以上タンク内に酵母を残す方法であるシュール・リー法で製造されたワインは、“生臭み”が少ないことが知られている。そこで、１ヶ月の長期間にわたって発酵試験を実施したところ、糖が完全に消費された直後（100時間後）に、酵母は急速に死滅し、これと同時にワイン中の鉄が減少し始め、発酵開始前の6mg/Lから１ヶ月後には1mg/Lまで鉄濃度が減少することを見出した。この結果より、死滅している酵母が鉄を吸着するのではないかという仮説を立てた。そこで、65℃の熱処理を行った死滅酵母と70%エタノール処理を行った死滅酵母を、それぞれブドウ果汁に添加して比較したところ、エタノール処理酵母のみが、“生臭み”をほとんど感じないレベルの濃度（～1mg/L）にまで鉄を低減できることが明らかとなった。さらに、酵母はエタノール処理後に乾燥しても鉄吸着能が維持され、１ヶ月保存後も鉄除去効率は変化しないことが確認された。また、エタノール以外の低級アルコールで処理しても同様の鉄除去効率を達成できた。以上の結果から、アルコール処理によって酵母に高い鉄吸着能を付与することが可能で、アルコール処理酵母はワインの鉄低減に有効であることが示唆された。

iron, alcohol-treated yeast, wine

講演番号：3J15p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ J校舎15会場

アルコール処理酵母を用いた“生臭み”低減ワインの開発-(2)

Development of the Method to Reduce Fishy Aftertaste in Wine Using Alcohol-Treated Yeast Cells

○辻 俊一、金井 圭子、横山 亜紀、田村 隆幸[1]、花牟礼 研一[1]、佐々木 佳菜子[1]、高田 良二[1]、吉田 聡（キリンホールディングス・フロンティア技術研、[1]メルシャン・商品開発研）

○Toshikazu TSUJI, Keiko KANAI, Aki YOKOYAMA, Takayuki TAMURA[1], Kenichi HANAMURE[1], Kanako SASAKI[1], Ryoji TAKATA[1], Satoshi YOSHIDA (Centl. Lab. Front. Technol., KIRIN HD, [1]Mercian Corporation)

【目的】

ワイン醸造に用いられる既存の鉄低減法であるフィチン酸添加法は、一部の果汁やワインで鉄低減効果が小さいという大きな課題があった。そこで、前演題により明らかとなった新規の鉄吸着剤であるアルコール処理酵母とフィチン酸との鉄低減効果の比較を行った。さらに、アルコール処理酵母を用いた“生臭み”低減ワインの製造を検証するために、以下の研究を行った。

【方法・結果】

フィチン酸の添加では全鉄の2%しか除去できなかったワインについて、アルコール処理酵母を適用したところ、23%の鉄を除去できることが確認された。さらに、同様のワインで、この比較実験と同量のフィチン酸とアルコール処理酵母を同時に添加すると、鉄低減効果は相乗的に増強され、50%の鉄を除去できることが明らかになった。この結果により、フィチン酸とアルコール処理酵母を併用することで、より効率的に鉄を除去できる可能性が示唆された。そこで、アルコール処理酵母とフィチン酸の両方を用いてワインを製造し、官能評価（n=11）を行った。その結果、鉄に由来する強烈な“生臭み”をほとんど感じないワインができることが確かめられた。また、オフフレーバーの増加は感じられず、ワイン本来の香味を損なっていないことも確認できた。さらに、このワインの成分分析を行ったところ、エステル等の香味成分や鉄以外の金属成分はほとんど変動していないことが分かった。なお、このようなフィチン酸とアルコール処理酵母の併用効果は、白ワイン、赤ワインのいずれでも適用することが可能であった。

アルコール処理酵母による鉄の吸着は、添加直後から速やかに起こり、かつ鉄を吸着した酵母は、遠心や濾過などの簡便な操作で除去できるという利便性を有している。また、酵母は古くからワイン製造で使用されてきたもので安全も高い。以上のことから、今後、幅広いワインで鉄の低減に適用されることが期待される。

iron, alcohol-treated yeast, fishy aftertaste

講演番号：3J15p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ J校舎15会場

タイトル 亜硫酸塩添加がワイン発酵過程における微生物叢変化に与える影響

Title Influence of sulfite on succession of microbiota during wine fermentation

○高橋　正之、大田　民、正木　和夫、水野　昭博、後藤　奈美（酒類研）

○Masayuki Takahashi, Tami Ohta, Kazuo Masaki, Akihiro Mizuno, Nami Goto(NRIB)

【目的】ワイン醸造において、古くから野生微生物の抑制や酸化防止のために亜硫酸塩が用いられているが、近年、亜硫酸塩を使用しないいわゆる無添加ワインも多く市販されるようになっている。本研究では、亜硫酸塩添加区／無添加区の２系列のワインを試験醸造し、経時的に微生物叢を比較することにより、亜硫酸塩を使用しないことで、ワイン発酵過程の微生物叢にどのような影響が表れるか網羅的に解析を行った。

【方法と結果】発酵中マストの沈殿画分から経時的にDNAを抽出し、PCR-DGGE法及び培養法により解析した。PCR-DGGE法では、SSU-rDNAもしくはLSU-rDNAの部分配列を利用した微生物叢の解析を行った。また、培養法においては、希釈した発酵中マストを各種培地に塗抹し、コロニー形成した微生物について、SSU-rDNAの部分配列の決定による微生物種の推定を行った。PCR-DGGE法による解析の結果、亜硫酸塩の添加により生育が抑制される微生物として、野生酵母の*Schizosaccharomyces sp.*, *Candida sp.*や、乳酸菌の*Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus sp.*、グラム陰性細菌の*Pantoea terrea*等の存在が示唆され、*P. terrea*については培養法でも同様の結果が得られた。そのほか、培養法においても亜硫酸塩の添加により生育が抑制される微生物が検出されたが、PCR-DGGE法と培養法では検出される微生物は完全には一致せず、複数の手法を組み合わせて解析を行うことが、微生物叢の網羅的解析には有効であることが裏付けられた。

wine, sulfite, PCR-DGGE

講演番号：3J15p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ J校舎15会場

ワラ納豆のおいしさの化学的解明を目的としたポリスチレンパック納豆との比較分析

Chemical approaches for differentiation between natto products prepared within a traditional rice straw bract and a common polystyrene pack

○稲垣　穣[1]、小杉　悟[2]、三島　隆[3]，小嶋 大介[1]（[1]三重大院生資、[2]株式会社小杉食品、[3]三重大院地域イノベーション）

○Minoru Inagaki[1], Satoshi Kosugi[2], Takashi Mishima[3], Daisuke Kojima[1] ([1]Faculty of Bioresources, Mie University, [2]Kosugi Foods Co. Ltd., [3]Graduate School of Regional Innovation Studies, Mie University)

【目的】 納豆は，昔は煮た大豆を藁苞に入れて発酵させて作られたが，近年は蒸煮大豆に納豆菌を噴霧し，その後にポリスチレンパック容器(PSP)に移して発酵させる方法で作られる。しかし，藁苞で作った納豆（ワラ納豆）の方が美味しく，日持ちが良い。そこで，本研究では，そうしたワラ納豆の美味しさや日持ちの良さを化学的に解明することを目的として，食べた際の納豆の旨味に関与すると考えられる遊離アミノ酸の組成と含量，その生成に関与するプロテアーゼ活性，pH変化，水分含量などに注目して，ワラ納豆とPSP納豆の違いについて化学的に比較分析した。
【方法】同じバッチ（釜）の蒸煮大豆に同じ納豆種菌を接種した豆を使って，ワラ納豆と通常のPSP納豆を作成した。それらの納豆をできたて(0週間)，および，2週間，4週間冷蔵（4－10℃）保存後に取り出して，試食するとともに化学的な比較分析を行った。
【結果】PSP納豆は，2週間程度で豆が柔らかくなってアンモニア臭が生じ，明らかに食味が低下したのに対し，ワラ納豆は，2週間冷蔵した頃がむしろ美味しく，4週間後もまだ十分美味しく食べることができた。冷蔵保存した納豆の40 gに75%になるようにエタノールを加えてミキサーで破砕し，遊離アミノ酸を抽出した。また，10 gの納豆に20 gの純水を加えて氷上で混ぜ，表面の粘液を抽出した。その抽出液に同様にエタノールを加えて処理し，遊離アミノ酸を抽出した。抽出したアミノ酸をフェニルイソチオシアナートによる誘導体化の後，HPLCで分離定量した。その結果，納豆は冷蔵保存中に，遊離アミノ酸含量が増加し，4週間後には約1.5～2倍に増加した。これは，冷蔵中においても，納豆菌が徐々に大豆のタンパク質を分解するためと考えられた。また，100 g当たりの遊離アミノ酸量は，ワラ納豆の方がPSP納豆よりも少なく，約半分の量であり，4週間後に丁度できたて(0週間)のPSP納豆と同程度に達することが判った。食べた時に美味しく感じるワラ納豆の方がPSP納豆よりもむしろ遊離アミノ酸が少ないと言う，予想に反する結果であった。つぎに，アルカリ変性カゼインに納豆の粘液抽出物を加えて保温した後，トリクロロ酢酸で除タンパク質した上清について280 nmの吸光度を測定し，プロテアーゼ活性を評価した。その結果，保存日数に伴って，プロテアーゼ活性が低下する傾向が認められた。ワラ納豆の方が，PSP納豆よりもプロテアーゼ活性が低いことが判り，遊離アミノ酸が少ない結果と対応していた。これらの結果より，ワラ納豆が美味しく日持ちが良い理由は，納豆になった後にゆっくり熟成がすすみ，二次発酵が行き過ぎないため，品質低下が抑えられることにあると考えられた。

natto product, rice straw bract, free amino acid

講演番号：3J15p21
講演日時、会場：3月24日17:59～ J校舎15会場

発酵小豆味噌の抗酸化活性

Anti oxidative activity of a fermented azuki, *Vigna angularis*

山下紗季、湊健一郎[2]、井上五郎[1]、野田廣[1]、○小原章裕[2]（名城大・農、[1]㈱小出物産，[2]名城大院・農）

Saki Yamashita, Ken-ichiro Minato[2], Goro Inoue[1], Hiroshi Noda[1], ○Akihiro Ohara[2] (Meijo University, [1]Koide Bussan Co. Ltd., [2]Graduate School of Meijo University)

【目的】

「発酵食品」の機能性が注目されているが，なかでも味噌のがん予防，老化防止など生活習慣病予防に関するものは特に重要である。これらは発酵による食品の抗酸化作用の増強に起因していると考えられている。小豆にはプロアントシアニジンなどのポリフェノール化合物が含まれており，それ自体の抗酸化作用も期待できるが，本実験では発酵により小豆中に含まれる抗酸化成分の増強を目指し，「発酵小豆味噌」の有用性について検討した。

【方法】

発酵小豆味噌は，小豆（品種：キタロマン）を煮沸によって渋抜きした後，麹菌，塩，酵母を加えて発酵させて製造したものを使用した。発酵小豆味噌および発酵前の小豆を，アセトンにより17時間振とう抽出して，それぞれアセトン抽出物を得た。それらについて総ポリフェノール含量およびDPPHラジカル捕捉活性を測定した。また，各アセトン抽出物を乾固した後，メタノールに再溶解して発色液として硫酸/バニリン溶液を加えて500nmの吸光度を測定し，プロアントシアニジン量を調べた。

【結果】

発酵により小豆のDPPHラジカル捕捉能は44.6%となり，発酵していない小豆と比較すると有意に高かった。また呈色反応により測定したプロアントシアニジン量も，発酵小豆味噌の方が多かった。以上のことより，発酵処理により抗酸化作用を増強させた小豆食品の開発が可能であることが示唆された。

本実験では，セルロース二次元薄層クロマトグラフィーにより発酵小豆味噌中のプロアントシアニジンの分離も試みた。その結果，いくつかのプロアントシアニジンが分離された。

fermentation, *Vigna angularis*, antioxidative activity

講演番号：3J16a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ J校舎16会場

定速昇温法による麺の吸水挙動に基づく糊化温度の新規測定法

A novel method for estimating gelatinization temperature of noodles from water sorption kinetics under temperature-programmed heating conditions

○長谷川 絢子，小川 剛伸，小林 敬，安達 修二（京大院・農）
○Ayako Hasegawa, Takenobu Ogawa, Takashi Kobayashi, Shuji Adachi (Kyoto University)

【目的】デンプンの糊化は，麺の吸水特性を決める重要な因子である。糊化温度の測定には，主に偏光顕微鏡法，透明度法，示差熱分析法およびアミログラフ法が用いられており，これらの方法は，それぞれ複屈折の消失，半透明性の変化，吸熱量の変化および粘度の変化に基づいている。演者らは，昇温条件下で吸水すると吸水速度が急激に上昇する点が存在することを見出し，この吸水特性に基づいて，簡便に糊化温度を測定する方法を開発した。

【材料および方法】試料として，乾燥方法の異なる2種のパスタ（VHTとLTと表記），うどん，きしめん，そば，八割そば，十割そば，マロニー，葛きりを用いた。吸水試験は，30℃から100℃までの温度範囲を，1.38℃/minの一定速度で昇温させて行った。また，示差走査熱量計（DSC）を用いて，各試料の糊化開始温度T_o，糊化ピーク温度T_pおよび糊化終了温度T_cを測定した。DSCの測定は，30℃から100℃までの温度範囲を，昇温速度5℃/minで行った。

【結果】各試料の吸水量の経時変化を図1に示す。すべての試料で吸水量が急激に増加する点が見られ，この点の温度をT_{crt}とした（図1の挿入図）。T_{crt}とDSCで測定した糊化温度の関係を図2に示す。T_{crt}は，T_oとT_pのほぼ中間の温度であり，T_oとT_pの双方とよい正の相関を示した。以上のことより，本方法は，吸水量の変化に基づく糊化温度の簡便な測定法として有用であると考えられる。

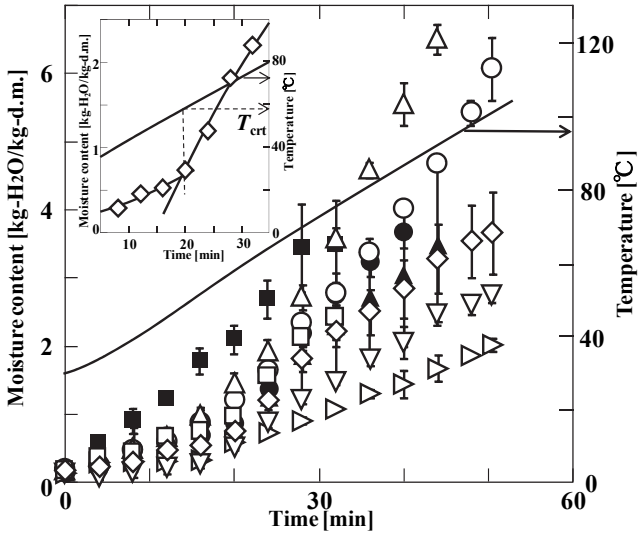


図１　各麺の吸水量
▷：VHT，▽：LT，◇：うどん，□：きしめん，▲：そば，●：八割そば，■：十割そば，○：マロニー，△：葛きり，
挿入図：T_{crt}の算出法

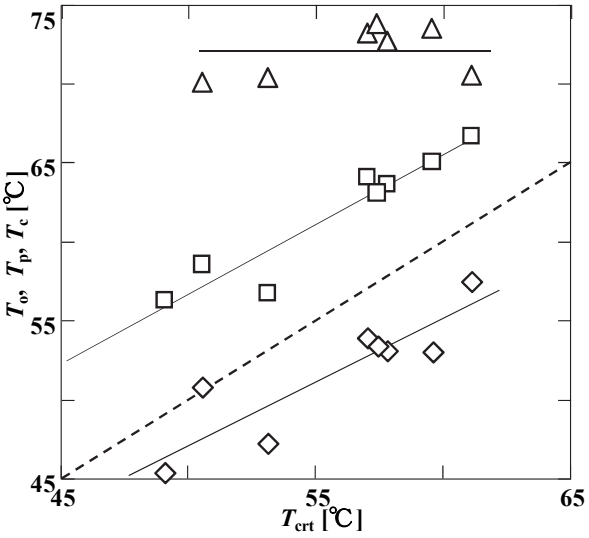


図２　DSC の糊化温度との比較
◇：T_o，□：T_p，△：T_c

謝辞 本研究は「京都大学・日清製粉グループ 穀物科学コンソーシアム」の一部として実施した。

gelatinization temperature, temperature-programmed heating conditions, water sorption

講演番号：3J16a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ J校舎16会場

ダイスの材質がパスタの表面形状および吸水挙動に及ぼす影響

Effects of die material on the surface profile and the water sorption kinetics of pasta

○吉野 将史、小川 剛伸[1]、小林 敬[1]、安達 修二[1]（京大・農、[1]京大院・農）
○Masashi Yoshino, Takenobu Ogawa, Takashi Kobayashi, Shuji Adachi (Kyoto University)

【目的】パスタは、主にテフロンまたはブロンズ製のダイスを用いた押出し成型により製造される。これらのダイスで成型したパスタの表面は見た目では大きく異なる。そこで本研究では、ダイスの材質がパスタの表面形状や吸水挙動に及ぼす影響について検討した。
【材料および方法】テフロン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、アルミニウム、ブロンズ製のダイスを用いてパスタ試料を調製した。表面形状は、デジタルマイクロスコープ（VHX-1000、キーエンス、大阪）を用いて、200倍および1000倍で観察した。100℃、0.5%（w/v）NaCl水溶液中での吸水過程を測定し、吸水初速度および平衡吸水量を算出した。また、示差走査熱量計（DSC-50、島津、京都）を用いて糊化温度を測定した。
【結果】デジタルマイクロスコープで観察した試料の表面形状は、テフロンで作成したパスタの表面が最も滑らかで、ポリプロピレン、ポリカーボネート、アルミニウム、ブロンズの順に粗かった（図1）。各試料の吸水初速度（v_0）、平衡吸水量（w_e）および糊化ピーク温度（T_{gel}）を表1に示す。吸水初速度は表面が粗い試料ほど速かった。平衡吸水量は表面が粗い試料ほど小さくなる傾向が見られたが、有意差はなかった。また、糊化温度はすべての試料でほぼ同じ値であった。以上のことより、ダイスの材質は、表面粗さなどの物理的な特性を変化させるが、デンプンの糊化などの化学的な特性には影響を及ぼさないことが示された。

表１　各試料の吸水初速度、平衡吸水量および糊化温度

	テフロン	ポリプロピレン	ポリカーボネート	アルミニウム	ブロンズ
v_0 [kg-H_2O/(m^2・s)]	5.15±0.49	4.55±0.13	5.01±0.74	6.04±0.76	6.31±0.18
w_e [kg-H_2O/kg-d.m.]	9.04±0.66	9.39±0.34	9.25±0.40	8.95±0.12	8.68±0.47
T_{gel} [℃]	58.1±0.3	57.9±0.7	58.0±0.4	58.0±0.4	58.0±0.8

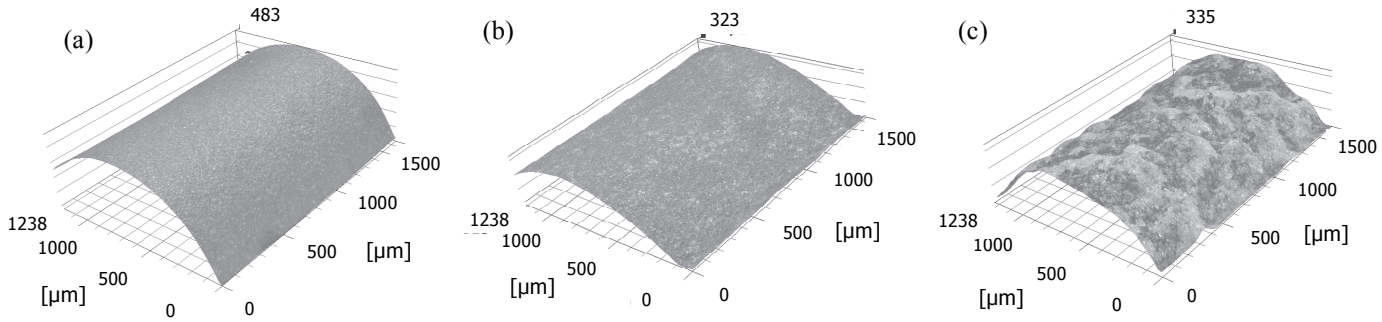


図1（a）テフロン製、(b）ポリカーボネート製および（c）ブロンズ製のダイスで作製した試料の表面

【謝辞】本研究は、「京都大学・日清製粉グループ　穀物科学コンソーシアム」の一部として実施した。

pasta, die material, water sorption kinetic

講演番号：3J16a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ J校舎16会場

パスタの吸水条件が水分分布および食感に及ぼす影響

The effect of the boiling conditions on the moisture profile and the texture of pasta

○小川 剛伸，小林 敬，安達 修二（京大院・農）
○Takenobu Ogawa, Takashi Kobayashi, Shuji Adachi (Kyoto University)

【目的】食感は，味とともに，食品にとって非常に重要である．乾燥パスタは，アルデンテと呼ばれる中心に髪の毛1本分の芯が残る状態に茹でた（吸水させた）ときの食感が最高とされている．吸水時の温度や塩濃度等の条件により食感が大きく異なることは経験的に知られているが，これらの吸水条件の違いにより食感が異なる理由については不明である．演者らは，食品内部の水分を，従来測定できなかった低含水率まで，高精度かつ高空間分解能で測定できる新たなDigital Imaging Profile（DIP）法を開発した[1)]．本研究では，吸水条件の違いにより内部の水分分布が異なり，それに対応した食感が生まれると考え，このDIP法を用いて，種々の条件で吸水したパスタの水分分布を測定した．さらに，食感を破断応力および破断歪率で定量化し，吸水条件と食感の関係を明らかにすることを目的とした．

【方法および結果】乾燥パスタの吸水時の温度と塩濃度を変えて，平均含水率が1.70 kg-H_2O/kg-d.m.になるまで吸水させた後，DIP法[1)]で水分分布（図1）を，またレオメータで破断応力と破断歪率（図2）を測定した．吸水温度が高いほど，試料中心部の含水率は低く，破断応力が増大した．高温での水分分布は，芯が残った状態であり，中心の低含水率の部分によりよい歯応えが得られることを明らかにした．また，NaCl濃度が増大しても，水分分布および破断応力に顕著な差は見られなかったが，破断歪率は小さくなった．これは，塩濃度の増大によりパスタの構造骨格を形成するタンパク質が収縮するためであり，0.1～0.2 mol/L付近で最適なモチモチ感が得られると考えられる．

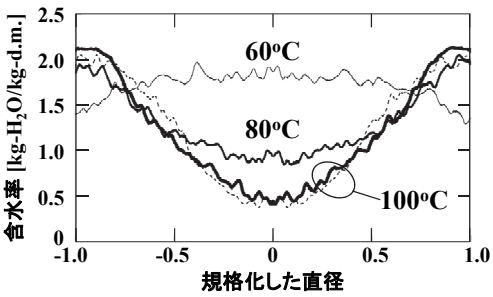


図 1　水分分布．破線のみ 2 M NaCl 水溶液で，他はイオン交換水で吸水．

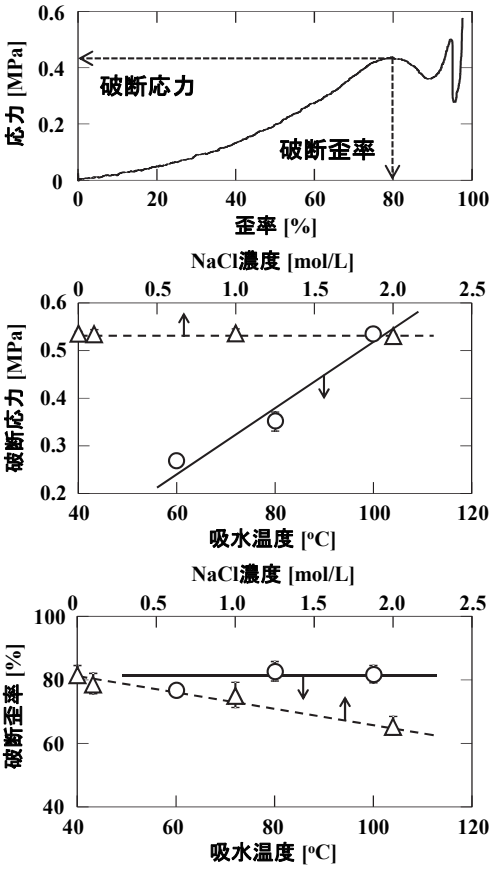


図 2　破断応力および破断歪率．上図：応力－歪曲線，中図：吸水温度および NaCl 濃度が破断応力に及ぼす影響，下図：吸水温度および NaCl 濃度が破断歪率に及ぼす影響．

1) 小川剛伸，小林敬，安達修二，日本食品科学工学会第58回大会講演集，P.68，2Ha4，2011.

【謝辞】本研究は，「京都大学・日清製粉グループ 穀物科学コンソーシアム」の一部として実施した．

boiling condition of pasta, moisture profile, texture

講演番号：3J16a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ J校舎16会場

エタノール脱水法を用いた含水結晶糖から無水結晶糖への結晶変換

Crystal transformation from hydrous sugars to anhydrous sugars with ethanol dehydration

○Nicolas Verhoeven, 吉井 英文（鳥取大・香川大）
○Nicolas Verhoeven, Hidefumi Yoshii（Tottori Univ. Kagawa Univ.）

【Introduction】 It has been well-known that hydrous form and anhydrous form are usually present as forms of crystalline saccharide, and the hydrous crystal can be converted into the anhydrous crystal and vice versa. Saccharides can be advantageously used in an industrial scale by using those characteristics of converting the forms between hydrous and anhydrous crystal. Saccharides can show poorly soluble behaviors in certain conditions. Poor solubility in water correlates with poor bioavailability. This is the reason why there is a great need to improve the solubility and the dissolution rates of sugar crystals. The increase of dissolution velocity can be achieved by surface area enlargement. Needle-like crystals lead to a significant increase in the specific surface area thus improving the dissolution behavior and chemical reactions. Such an increase can be achieved by suspending crystalline substances in a solvent that induces phase transformations. The aim of this study is to investigate crystal transformation characteristics from the hydrous sugar to their anhydrous via ethanol-mediated transformation, in order to produce new crystalline material with an improve specific surface area. In a second time, the anhydrous sugars obtained by this method would be used to form non-oil, creamy gel of sugars.

【Experimental method】 The high-pressure reactor (model MMJ-200, OM Labtech, Co., Ltd., Tochigi, Japan) and a glass reactor were used to perform the dehydration in ethanol of hydrous sugars (i.e. glucose monohydrate, maltose monohydrate, lactose monohydrate and trehalose dihydrate). Hydrous sugar crystals were placed in the reactor with dehydrated ethanol. The reactors were equipped with an agitation system, and heated quickly to a constant temperature (i.e. 50˚C for glucose, and 70˚C for maltose, lactose and trehalose).A solid-liquid separation of crystal slurries was performed using centrifuge method. DSC was performed with EXSTAR 6000 DSC (DSC 6220, SII Nano Technology Inc., Tokyo, Japan), and SEM (Model JSM 6060, JEOL Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used to investigate the microstructural properties of the sugar crystals.

【Results】 Anhydrates obtained with ethanol dehydration method presented a needle-shape structure and thus higher solubilization rate and specific surface area than the anhydrates obtained by vacuum drying method. Anhydrous sugars obtained with ethanol method were also less sensitive to rehydration in high relative humidity conditions. About 200 g of thin needle-shape sugar crystals were added to 100 ml of distilled water to form a creamy, non-oil gel. The viscosity of these gels were high, reaching 270 Pa.s for a trehalose gel, which is comparable to the viscosity of peanut butter. Maltose and glucose gels had a viscosity similar to shortening. Such kind of gels could not be obtained with the hydrates, which formed suspensions at the same concentrations.

Sugars; Dehydration; Ethanol; Specific surface area

講演番号：3J16a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ J校舎16会場

1-メチルシクロプロペン包接α-シクロデキストリン包括ポリスチレンエレクトロスピニングファイバーの湿度応答緩和現象

Humidity relaxation response of electrospinning of polystyrene fibers functionalized with inclusion complex of 1-methylcyclopropene and α-cyclodextrin

○吉井 英文，Tze Loon Neoh，薮野 あおい，Patricia Menénzed（香川大・農，Public Univ. of Navarre）
○H. Yoshii, T. L. Neoh, A. Yabuno, P. Menénzed (Kagawa Univ., Public Univ. of Navarre)

【目的】　果実の成熟は植物ホルモンの一つである植物成長調節剤エチレン促進されるが、過熟後は老化を促進し、品質低下を招くことになる。エチレン阻害効果をもつ1-メチルシクロプロペン（1-MCP）ガスは高いエチレン受容体結合阻害効果を持ち、果実の成熟遅延効果剤として注目されている。1-MCPは室温ガスとして存在し、低濃度で使用するためα-シクロデキストリン(CD)に包接させた粉末として利用されている。本研究では、1-MCP・α-CD包接複合体結晶粉末を包括したエレクトロスピニングファイバーからの1-MCP徐放挙動に及ぼす水蒸気濃度の影響について検討した。はじめに、1-MCP・α-CD包接複合体結晶粉末を包括したエレクトロンスピニングファイバーを作製した。包接複合体結晶粉末、エレクトロンスピニングファイバーに温度、湿度を調節した窒素と接触させ、1-MCP徐放速度に及ぼす湿度の影響について、自作した動的雰囲気制御装置を用いて検討した。1-MCP徐放の湿度応答挙動を、湿度と温度の関数として推算する手法を提案した。

【方法】　1-MCPは、21.4gのリチウムジイソプロピルアミドに等量24mL の3-クロロ-2-メチルプロペンを添加混合し、1-MCPリチウム塩を合成した。未反応の3-クロロ-2-メチルプロペンを真空乾燥により除去し、この溶液を水に溶解させ、発生したガスをα-CD飽和溶液に吸収させ1-MCP・α-CD包接複合体結晶粉末を得た。この結晶粉末を含んだポリスチレン溶液のスラリー溶液を、エレクトロスピニング法を用いて1-MCP・α-CD包接複合体結晶粉末包括ファイバーを作製した。1-MCP・α-CD包接複合体結晶粉末約30mgを厚さ1mm、直径16mmのサンプルホルダーに薄く広げ、内径15mm、高さ97mmのガラスホルダーにセットした。このガラス容器に、温度、湿度を所定に制御した窒素を100mL/minで流し、徐放した1-MCPをガスクロマトグラフィで分析した。1-MCP徐放後の結晶粉末の電子顕微鏡写真を測定した。

【結果】　1-MCP・α-CD包接複合体結晶粉末は、微細な針状結晶が得られた。この結晶粉末、及び1-MCP・α-CD包接複合体結晶粉末包括ファイバーからの1-MCP徐放挙動は、温度30、40、50°Cで相対湿度を10%から90%まで直線的に変化させる湿度ランピング法を用いて1-MCPの徐放速度を求めた。結晶粉末からの見掛け徐放フラックスF[1/Ms]は、湿度が30-40%以上で徐放を開始し、ある湿度で最大値を示した後急激に見掛け徐放フラックスが減少し、湿度80%付近で最低値の値となるコラップス現象が観察できた。ファイバーからの湿度応答に対する1-MCP徐放挙動は湿度上昇を伴うフラックス増加を示すが、粉末由来のコラップス挙動を示す。この見掛け徐放フラックスFを推算するための推算法を提案した。

1-methylcyclopropene, cyclodextrin, release, humidity responce

講演番号：3J16a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ J校舎16会場

ジュール加熱殺菌処理した液全卵の物性・構造解析

Analysis of physicochemical and structural properties of pasteurized liquid whole egg by Joule heating

○梅森　賢、中村　卓、星野　貴[1]、滝田　裕二[1]、山口　祐輝[1]、五十部　誠一郎[2]（明治大院農・農化、（株）フロンティアエンジニアリング[1]、（独）農研機構・食総研[2]）

○Ken Umemori, Takashi Nakamura, Takashi Hoshino[1], Yuuji Takita[1], Yuuki Yamaguchi[1], Seiichiro Isobe[2] (Meiji Grad School, Frontier Engineering. Co., Ltd[1], NFRI[2])

【目的】食品には安全が求められる。しかし、安全確保のため加熱殺菌処理することで、食品の持つ本来の性質が失われるという課題が存在する。液全卵はサルモネラ菌による食中毒リスクが存在し、加熱殺菌処理(60℃、3.5分)が行われる。しかし、従来の熱媒体を用いた間接加熱殺菌処理では緩慢でムラのある加熱のため液全卵に熱負荷がかかり、卵本来の品質と異なる問題がある。この問題を解決する方法として液全卵を通電させることで迅速で均一な加熱が可能であるジュール加熱殺菌処理が挙げられる。ラボスケールのバッチ方法で液全卵をジュール加熱殺菌処理した液全卵の調理特性が未処理と同等であることを明らかにした[1)]。工業的に利用するためスケールアップする必要がある。本研究では、パイロットスケールの連続方法でジュール加熱殺菌処理を行い、加熱殺菌処理による液全卵の調理特性への影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】試料として市販液全卵を使用した。これをジュール加熱(20kHz, 300-350V)にて60℃、3.5分間加熱殺菌処理を行った（Joule)。比較対象として、間接加熱処理された市販液全卵を用いた(Indirect)。各液全卵(Native、Joule、Indirect)の熱変化を示差走査熱量計(DSC)にて測定した。また、Rapid Visco Analyzer(RVA)にて粘度測定を行い、レオメーターにて動的粘弾性測定を行った。調理特性として、熱水(90℃)に液全卵を投入した様子を確認し、形成した構造物を走査型電子顕微鏡(SEM)にて微細構造観察を行った。
【結果】DSCの結果、NativeとJouleの吸熱ピークが60℃、67℃、78℃に現れたのに対し、Indirectは60℃に吸熱ピークが現れなかった。RVAの結果、25℃及び80℃での粘度はNative≒Joule>Indirectとなった。また、NativeとJouleにて62℃付近に粘度の増加が見られた。動的粘弾性試験(温度スイープ)の結果G’、G”値が80℃まではNative≒Joule>Indirectであったが、85℃以降ではNative≒Joule<Indirectとなった。これらの結果から、間接加熱処理液全卵では変性温度が低いタンパク質がすでに変性し、構造変化を起こしていることが示唆された。熱水(90℃)に液全卵を投入した結果、Native・Jouleサンプルは薄膜の衣状の構造物（かき卵）を形成したのに対し、Indirectは湯に分散した針状の凝塊が観察された。衣状物と針状物をSEMにて構造観察したところ、タンパク質ネットワークの凝集パターンに違いが見られた。この原因は、間接加熱処理におけるせん断・過加熱によりタンパク質が解離・変性したためと示唆された。

1）日本食品科学工学会2011年度大会講演要旨集、p.127

Joule heating, liquid whole egg, plumage

講演番号：3J16a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ J校舎16会場

直流通電処理による腸炎ビブリオ汚染水の殺菌効果

Performance of direct current treatment for inactivation of *Vibrio parahaemolyticus*

○崎山 高明、西村 政晃、須磨谷 淳、萩原 知明（海洋大・海洋科）
○Takaharu Sakiyama, Masaaki Nishimura, Atsushi Sumatani, Tomoaki Hagiwara (Kaiyodai)

【目的】腸炎ビブリオ*Vibrio parahaemolyticus*（Vp）は、沿岸部の海水および海底の泥に広く存在しており、汚染された魚介類の生食等によって人に感染し、食中毒を発症させる。魚介類以外が原因食材となった事例も知られており、調理器具等を介した二次汚染も少なくないことが指摘されている。魚介類自体の汚染や二次汚染を防止するためには、Vp で汚染された水の効果的で簡便な殺菌方法が望まれる。そこで本研究では、Vp で汚染された塩水に直流通電処理を施した場合の Vp 殺菌効果について検討した。特に、小規模な食品加工場でも簡便に実施できる方法の確立を目指し、低電圧での通電処理による殺菌が可能か否かについて検討した。
【方法】アサリより分離した Vp RP01 株をアルカリペプトン水で培養し、これを食塩水で希釈した。このように調製した Vp 懸濁食塩水を試料として、白金線または白金メッキしたチタン板を電極とし、安定化電源装置により電流を一定として通電した。適当な時間間隔で通電を止めてサンプリングした試料中の生菌数をコロニーカウント法により求めた。
【結果】Vp 培養液を 3% 食塩水で10倍希釈した試料（～10^8 CFU/ml） 50 mlに対し、白金線（0.3mm φ）を電極に用いて 8 mA の電流を通電した場合、10分間の通電で3桁程度の生菌数減少が見られ、20分後には生菌数が測定限界以下となった。この場合、印加電圧は約 4 V であり、通電前後の温度上昇は 2℃以下であった。初発汚染菌数を低下させた試料（10^3倍希釈 Vp 培養液）を同様の条件下で殺菌実験に供すると、5分以内に生菌数が測定限界以下となった。直流通電処理では、電気分解によって発生する有効塩素が殺菌効果の本体であると考えられる。希釈倍率を増加させることにより、培養液から持ち込まれる有機物量が減少し、有機物による有効塩素の消費が少なくなることも殺菌時間の減少に効果を持つものと考えられた。白金メッキしたチタン板を用いてスケールアップした実験の結果についても報告する。

Vibrio parahaemolyticus, inactivation, direct electric current

講演番号：3J16a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ J校舎16会場

短波帯交流瞬間加熱による豆乳中の枯草菌芽胞の失活

Inactivation of Bacillus subtilis spore in soybean milk by radio frequency flash heating

○植村 邦彦、高橋 千栄子、小林 功（食総研）
○Kunihiko Uemura, Chieko Takahashi, Isao Kobayashi (National Food Research Institute)

【目的】豆乳に添加した枯草菌芽胞に短波帯交流電界瞬間処理（RF-FH）を施し、効率的に失活する。同時に、大豆の不快臭発生の原因となる酵素（リポキシゲナーゼ）を速やかに失活する。
【方法】十勝産の乾燥大豆900gを洗浄し、蒸留水に浸漬（5℃, 12時間）後、ステンレスざるで水を切り、7.1kgの蒸留水とともに、家庭用ジューサー（National, MJ-M30）で搾汁し、生絞り豆乳を得た。2Lの豆乳に10mLの枯草菌芽胞懸濁液を添加した原料を、プランジャーポンプ(GLサイエンス, PU718)で600mL/minの流速で搬送し、長さ500mmのリング状通電加熱ユニットを通過する4s間で10℃から90℃まで昇温後、100μm厚のテフロンフィルムで覆った平衡平板電極（幅 6mm, 電極間距離 5mm, 電極張 100mm）に短波帯交流電界(ノダRF, NR5N27/40/54M-01, 27MHz, 2kW)を印加した電極間を0.3sで通過して100～120℃に昇温し、温度保持管でその温度を2秒間保持し、プレート式熱交換で40℃まで冷却し、圧力調整弁で系内の圧力を0.6MPaに維持しながら放出した。各電極出口温度のときに得られたサンプル①の枯草菌芽胞を測定し、初期値を基準とした残存率を求めた。次に、各サンプルを豆腐の製造工程で一般に用いられる80℃の温浴中に30分間浸する再加熱を行ったサンプル②を得た。また、未処理の生絞り豆乳およびRF-FH処理したサンプル①、ならびに再加熱処理したサンプル②のトリプシンインヒビターおよびリポキシゲナーゼの活性変化を測定した。
【結果】短波帯処理の出口温度が100℃以上で温度の上昇とともに枯草菌芽胞の失活が大きくなったが、115℃以上の出口温度で、その失活効果が低下し120℃の場合2.5対数失活した。一方、各サンプルを再加熱したものは、RF-FH処理で110℃以上の出口温度の場合も失活効果が低下することなく、120℃の出口温度のサンプルが5対数まで失活することが分かった。豆乳中のリポキシゲナーゼは出口温度が120℃で完全に失活した。トリプシンインヒビターは120℃のRF-FH処理後も93%の活性を維持し、再加熱後に漸く失活した。以上の結果より、RF-FH処理で芽胞に損傷を与え、その後の温度保持により失活すると考えられるが、温度保持時間が2sと短い場合は、十分に失活できなかったことがかんがえられる。しかしながら、さらに比較的低い80℃で再加熱することにより、一度、損傷した芽胞を失活したものと考えられた。また、RF-FH処理によるリポキシゲナーゼを短時間で失活できたことから、搾汁直後にRF-FH処理することにより、リポキシゲナーゼを失活させ、脂質の酸化を抑え、不快臭の発生を抑制することが可能となり、大豆加工食品の高品質化が期待される。

Radio frequency, Bacillus subtilis, inactivation

講演番号：3J16a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ J校舎16会場

急速加減圧式抽出技術による新規緑茶の開発

Development of new green tea by extraction technique with rapid pressure elevating and reducing method

○安田 みどり、中多 啓子、大城 あゆみ、石川 洋哉[1]、林 伊久[2]、相浦 正文[3]、塚本 敏朗[3]
西九大・健栄、[1]福女大・国際文理、[2]福岡工技セ・機電、[3]（株）ワコー
○Midori Yasuda, Keiko Nakata, Ayumi Ohshiro, Hiroya Ishikawa[1], Tadahisa Hayashi[2], Masafumi Aiura[3], Toshiro Tsukamoto[3]（Nishikyudai, [1]Fukujyodai, [2]Fukuokakougi, [3]Wako）

【目的】食品、医薬品、化粧品等の業界では、ヒトの健康や美容等の機能性ニーズに応えられる天然素材・成分の開発が活発に行われている。天然素材からの機能性成分の抽出には、主に熱水抽出法が用いられているが、この方法は熱に弱い成分には適用できず、不要な成分までも抽出されるという欠点がある。そこで、本研究では低温でしかも短時間での抽出が可能な装置を開発することを目的とした。また、本装置を緑茶の抽出に応用し、その緑茶の特徴を調べた。

【方法】抽出技術と濃縮技術を組み合わせた急速加減圧式抽出技術を考案した。本装置は、抽出物外部の圧力を急速に変化させると抽出物内外に一瞬圧力差が生じる現象を活用し、急速加圧で浸水させ、急送減圧で抽出するという原理になっている（図1）。この装置に、市販の番茶200 gおよび水14 Lを抽出容器に入れ、0.95 MPaの圧力にて抽出を行った。抽出温度は、0、10、20、50、70 ℃とし、抽出時間は5または20分とした。比較として、浸漬のみの抽出（浸漬法）も行った。緑茶中のカテキン、カフェイン、ストリクチニン、アミノ酸はHPLCにより分析を行った。また、香気成分はスニッフィング・GC/MS法によりそれぞれ分析を行った。

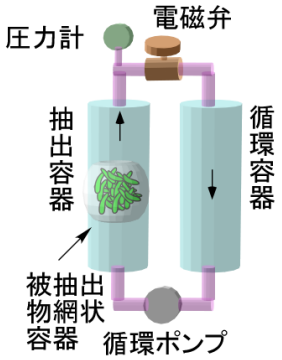


図1　抽出装置概要図

【結果】本装置は、循環水を電磁弁に衝突させて生じる水撃作用の衝突エネルギーを利用し、減圧容器内の圧力を制御したもので、これにより省エネルギーでの抽出が可能となった。本装置にて緑茶の抽出を行い、各成分の抽出効率（浸漬法の濃度に対する本抽出法の濃度の比）を調べた結果、アミノ酸はすべての温度において高い抽出効率を示した。ストリクチニンは、本装置による抽出効率があまり高くなく、0や70 ℃では、逆に抽出効率が悪くなった。カフェインやカテキンは、0および10 ℃での抽出効率が高くなった。香気成分については、低温ではフルーティ、甘い、緑茶様等の成分が検出されたが、高温になるほどこれらの成分は減少し、不快なにおい成分が増大した。通常、緑茶中の成分は低温において抽出されにくいが、本装置により短時間で味や香り豊かな緑茶が製造できた。今後、本装置を用いることによって、様々な素材に対するオーダーメイドの抽出が可能となる。

green tea, catechins, extraction

講演番号：3J16a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ J校舎16会場

高圧処理によるダイズGABA生成の反応工学的解析

Reaction Engineering Analysis of High-Pressure Induced GABA production in Soybeans

○上野 茂昭[1]、片山 拓巳[1]，重松 亨[2]，藤井 智幸[1,2]（[1]東北大院・農、[2]新潟薬大・応生科）
○Shigeaki Ueno, Takumi Katayama[1], Toru Shigematsu[2], Tomoyuki Fujii[1]([1]Tohoku Univ., [2]NUPALS)

【目的】高圧処理は細胞性生物素材の高付加価値化を可能とする非加熱食品加工プロセスである。また、ダイズは社会的な健康志向の高まりから高機能性食材として注目されている。我々はダイズ中へのγ-アミノ酪酸(GABA)の高蓄積を試みている。浸漬グルタミン酸（Glu）水溶液濃度に対するGABA生成速度は、未処理ダイズでは飽和型を示した一方、高圧処理ダイズでは極大値を持つベル型を示した[1-2]。本研究では、GluからGABAへの反応を触媒するグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）に着目し、高圧処理によるGAD活性およびGluの内部拡散に及ぼす影響を、反応工学的に解析することにより、高圧処理ダイズのGABA生成メカニズムを検討した。
【方法】新潟県産青ダイズをGlu水溶液(0-0.5 g/ml)と共に減圧シールし、25℃で22時間浸漬後、25℃で5分間の高圧処理（200 MPa）を施した。また水浸漬したダイズを粉砕後、硫安沈殿・透析を経てDEAEカラムを用いて分画することにより粗GADを抽出し、GAD活性試験に供した。GAD活性については、Glu水溶液と粗GADを40℃で120分間混和し、反応溶液中のGlu濃度の経時変化を用いて比活性を測定した。ダイズ内部におけるGlu拡散係数は、Glu浸漬ダイズを純水中で攪拌し、経時的にダイズ内Glu濃度を定量し推算した。GluおよびGABAの定量については、ホモジナイズした試料を12000 rpmで20分間遠心分離後、上清を限外濾過し得られた透過液をダブシル化後に、HPLCを用いて定量した。
【結果】高圧処理ダイズのGAD活性は、処理直後および処理後2日保存のいずれにおいても、粗抽出液中に活性が認められたが、高圧処理による顕著な活性の上昇は認められなかった。種皮と子葉とでは拡散・透過挙動が同じではないと考えられたので、子葉部分を用いて拡散実験を行ったところ、拡散モデルで記述することができ、Gluの拡散係数はおおむね10^{-10} m^2/s程度の値となった。ダイズ内部ではGABA生成反応と拡散が同時進行していると考えられたため、反応工学的パラメータであるThiele数および触媒有効係数、GABA変換率の推算を試みた。その結果、高圧処理ダイズではGADによるGABA生成反応が効率的であることが示唆された。また、初期Glu濃度が高いほどGluのGABAへの変換率が低くなったことから、GABA生成は拡散律速であることが示唆された。以上の結果より、高圧処理ダイズにおけるGABA生成では、酵素活性は低下するが細胞損傷によりGlu拡散が容易となるので、Gluがダイズ内部まで行き渡ることでGABA生成が促進したと考えられた。
【謝辞】本研究はJST-CREAT、科研費若手研究B、飯島記念食品科学振興財団、不二たん白質研究振興助成により実施した。
【文献】[1] Ueno *et al*, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 1208-13 (2010). [2] Ueno *et al*, *Proc. ICEF11*, NFP419 (2011).

High pressure, Soybean, GABA, Reaction engineering analysis

講演番号:3J16a11
講演日時、会場:3月24日11:10～ J校舎16会場

高圧熱水処理によるタンパク質の部分分解反応の速度論的解析

Kinetic Analysis of Partial Decomposition of Protein in Hot-Compressed Water

○一井　洋和、片山　拓己、上野　茂昭、藤井　智幸、岩元　靖[1](東北大院・農、[1]太子食品)
○Hirokazu Ichinoi, Takumi Katayama, Shigeaki Ueno, Tomoyuki Fujii, Yasushi Iwamoto[1]
(Tohoku Univ., [1]Taishi-Food Inc.)

【目的】近年、様々な廃棄物や環境汚染物質の分解に、超臨界水や高圧熱水が応用されている。しかし、生物素材を対象にした場合には、超臨界水を用いると炭化水素にまで分解され、ケミカルリサイクルが困難となる。230℃付近においてはアミノ酸分解がより進行することも報告されている。そこで、本研究では、バイオマスや未利用資源を、高圧熱水処理によってケミカルリサイクルに適した部分分解を確立することを目的とし、高圧熱水によるタンパク質の部分分解について実験的に検討した。

【方法】未利用のタンパク質のモデルとして、魚表皮由来のゼラチン(SIGMA)を選んだ。カラムオーブン(5890 CAP-GV01, 日本電子製)内に設置したステンレスパイプ(内径1.0 mm, 長さ20 m, 容積15.7 ml) を反応容器とし、これにHPLCポンプ(PU-980, 日本分光製)を用いて、1.0(w/v) %のゼラチン溶液を連続的に供給する流通装置とした。反応器内圧力は背圧調節弁(880-81, 日本分光製)を用いて、25～45 MPaに維持した。流出する反応液を採取し、得られた各反応液について、ニンヒドリン比色法によりタンパク質モル濃度を求めた。供給流量を変えて反応実験を行い、部分分解反応の滞留時間依存性のプロットから反応初速度r[mmol/L・s]を求めた。式(1)のようなn次反応の速度式を用いて、反応次数nと反応速度定数k[kg/mol・s]を求めた。

$$r=k\cdot C\cdot (Kw^{0.5})^{n} \qquad (1)$$

ここで、C[mmol/L]はゼラチンタンパク質の初濃度、Kw[mol^2/kg^2]は水のイオン積である。

【結果】ゼラチン試料の平均分子量をニンヒドリン比色法から推定されたモル濃度を用いて算出したところ、3.33×10^5 g/mol であった。25～45 MPa、180～240℃の各条件において、タンパク質モル濃度[mmol/L]を縦軸に、滞留時間[s]を横軸にとったグラフを作成したところ、処理温度、滞留時間が増加するにつれてタンパク質モル濃度が増加したが、顕著な圧力依存性は認められなかった。水のイオン積が圧力よりも温度に大きく依存することから、タンパク質の部分分解反応にイオン化した水分子の量が関与していることが示された。アミノ酸残基の平均分子量からペプチド結合の数を推定し、結合が全て加水分解されたときの濃度を 100%として分解率を推算したところ、45 MPa、240℃条件、滞留時間 2000 s において１%程度となった。反応初速度の結果から、各温度の反応次数を求めたところ、180～200℃において 0.4～0.5 程度の値となり、さらに温度が上昇するにつれ反応次数が大きくなる傾向を示した。この結果から、処理温度によって反応機構が異なる可能性が示唆された。高温になるにつれ、N 末端のアミノ酸の分解反応が起こり、みかけの濃度が低くなった可能性が考えられた。本研究は、JST 研究成果展開事業研究成果最適展開支援プログラムフィージビリティスタディステージ探索タイプの助成により実施された。

hot-compressed water, protein, partial decomposition

講演番号:3J16a12
講演日時、会場:3月24日11:21～ J校舎16会場

β-ラクトグロブリンの熱凝集体形成がステンレス鋼表面への付着挙動に及ぼす影響

Effect of thermal aggregation of β-lactoglobulin on its adhesion to stainless steel surface

○金子 英基、萩原 知明、崎山 高明（海洋大、海洋科）
○Eiki Kaneko,Tomoaki Hagiwara,Takaharu Sakiyama(Kaiyodai)

【目的】熱凝集性の高いホエイタンパク質は熱交換器内壁に付着しやすく、乳製品の連続加熱処理の際にその付着が問題となる。本研究では、ホエイタンパク質の半分を占めるβ-ラクトグロブリン(β-Lg)を対象とし、その熱凝集体のステンレス鋼表面への付着挙動について検討した。
【方法】β-Lg溶液(pH 6.85)を65～85℃で1時間予備加熱した。得られた溶液にステンレス鋼(SUS316L)粉体を懸濁して75℃で1時間振とうし、振とう前後のタンパク質濃度の減少から付着量を算出した。また、予備加熱されたβ-Lgについて、凝集の程度を非還元SDS-PAGEにより、遊離SH基の数をDTNB法により測定した。
【結果】各温度で予備加熱したβ-Lgのステンレス鋼粒子に対する付着量を比較した結果、75℃以上の予備加熱を行った場合に付着量が顕著に減少することが示された。また、非還元SDS-PAGEの結果より、75℃以上で予備加熱したβ-Lgでは単量体が顕著に減少し、二量体以上の凝集体が増加していた。充分量の界面活性剤共存下で測定した遊離SH基の数は、いずれの温度で予備加熱しても、未加熱β-Lgと比べてほとんど減少しなかった。なお、予備加熱したβ-Lgは、界面活性剤非共存下でも遊離SH基が多く測定され、この点が未加熱β-Lgと異なった。予備加熱に伴う変性と凝集によって多量体が形成されても、分子の構造が疎であるため、DTNBとの反応が可能になっているものと考えられる。以上の結果より、熱凝集により多量体の形成が進行しても、遊離SH基の数は減少しないことが明らかになった。したがって、ステンレス鋼に対する付着量が減少するのは、遊離SH基の数の減少によるものではなく、凝集体の立体構造が障害となって遊離SH基が反応しにくくなるためだと考えられる。

β-lactoglobulin,thermal aggregation,adhesion

講演番号:3J16a13
講演日時、会場:3月24日11:32～ J校舎16会場

果汁濃縮凝縮液からの果実フレーバー成分の高品質濃縮

High quality concentration of flavor components from the condensate in fruits juice concentration

○新村 希世美、辰野 倫子、ミヒリ グナティラカ、小林 康弘[1]、宮脇 長人、（石川県大院・生資環、[1](株)果香）

○Kiyomi Shinmura, Michiko Tatsuno, Mihiri Gnathilake, Yasuhiro Kobayashi[1], Osato Miyawaki(Ishikawa Pref. Univ., Kakoh Fruits and Flavors[1])

【目的】液状食品はその殆どが水分であるため、保存性の向上や運搬コストの削減のために濃縮操作が必要不可欠である。濃縮操作には大別して蒸発濃縮法、膜濃縮法、凍結濃縮法の3つが挙げられるが、それぞれ長所、短所があることから濃縮する目的成分に対して適した方法を選択することが重要である。今回試料として使用したリンゴ果汁及びイチゴ果汁凝縮液は、果汁の加熱濃縮の際出た蒸気を凝縮して得た副産物であり、その凝縮液には香気成分が多く含まれているものの、現在廃棄されている。この香気成分を有効利用するためには、成分保持率の高い濃縮法を適用することが重要である。そこで、凝縮液を減圧濃縮法、逆浸透法、界面前進凍結濃縮法の3つの方法により濃縮を行い、得られた濃縮液の品質の違いを比較検討した。
【方法】減圧濃縮法は、ロータリーエバポレーターを用い、50℃でアスピレーターを用いて減圧濃縮した。逆浸透法は、日東電工テストセル(C40-B)と逆浸透膜(NTR-70SWC)を用いて印加圧力3MPaで濃縮した。凍結濃縮法は、小型界面前進凍結濃縮装置を用いた。この装置は長円筒状の試料容器内に溶液を入れ、攪拌しながら一定速度で冷媒中に降下していくことで容器底面より氷結晶を成長させ、凍結濃縮を行う方法である。各方法で濃縮した後、得た試料をエーテル抽出し、GC/MS(Focus DSQⅡ,Thermo Fisher Scientific)により成分同定及び定量を行った。
【結果】リンゴ果汁凝縮液の主要な香気成分は、1-butanol、2-methyl-1-butanol、2-hexenal、1-hexanolなどであった。減圧濃縮においては、濃縮液側の成分回収率がほぼ0%であり、香気成分の殆どが凝縮液側へ移行した。逆浸透法では、成分が一部透過液へ移行してしまい、回収率70～80％(2-hexenalは40%)を示した。これに対し、界面前進凍結濃縮法においては、回収率ほぼ100%となり、氷相側に成分が取り込まれることが殆ど無く高品質な濃縮が行われることがわかった。一方、イチゴ果汁凝縮液の主要香気成分はacetone、acetic acid, methyl ester、ethyl acetate、ethanol 、butanoic acid, ethyl ester、1-butanol、3-methyl, 1-butanol、1-hexanol、2-hexen-1-ol、furfural、2-methyl butanoic acid、hexanoic acidなどであった。減圧濃縮において、これらの香気成分はリンゴ果汁凝縮液同様ほぼ全て凝縮液側への移行が見られた。また、hexanoic acidについては回収率が最も悪く、全体の20%程度であった。逆浸透法では各成分の約20%が透過した。一方、界面前進凍結濃縮法ではacetic acid, methyl esterについての回収率がやや低かったものの、全体的に60～80%の回収率で良好な濃縮を行うことができた。

freeze concentration, osmotic pressure, flavor component

講演番号：3J16p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ J校舎16会場

界面前進凍結濃縮におけるエタノール及びスクロース溶液の極限分配係数

Limiting partition coefficient in progressive freeze-concentration of ethanol and sucrose solutions

○Mihiri Gunathilake、新村 希世美、辰野 倫子、宮脇 長人（石川県大院・生資環）
○Mihiri Gunathilake, Kiyomi Simmura, Tatsuno Michiko, Osato Miyawaki (Ishikawa Pref. Univ.)

【Introduction】Among the methods of concentration of liquid food, freeze concentration is known to give the best quality. Freeze concentration is a method of concentration using freezing out effects. The low process temperature prevents undesirable chemical and biological changes and loss of flavors and aromas are also minimal in this process. In progressive freeze-concentration (PFC), only a single ice crystal is formed in the system so that the system will be expected to be much simpler as compared with the conventional suspension crystallization method to reduce the process cost substantially.

【Theory】The effective partition coefficient between ice and liquid phases can be defined as follows.

$$K = C_s / C_L \qquad (1)$$

where C_s and C_L are solute concentrations in ice and solution phases, respectively. According to the concentration polarization model, the following equation has been developed.

$$K = K_0 / [\, K_0 + (1 - K_0)\exp(-u/N^{0.2})] \qquad (2)$$

where u is the advance rate of ice front and N is the stirring rate at the ice liquid interface. Limiting partition coefficient, K_0, corresponds the infinitesimal ice growth rate and/or the infinite mass transfer rate at the ice-liquid interface.

【Materials and Methods】By using a small-scale vertical cylinder system, series of progressive freeze-concentration experiments were carried out for ethanol and sucrose solutions varying u and N. Solute concentration in the initially formed ice phase was measured to obtain the limiting partition coefficient.

【Results and Discussion】From the extrapolation of $u/N^{0.2}$ to zero, the limiting partition coefficient, K_0, was obtained experimentally. K_0 was dependent both on u and N. K_0 was also dependent on the solute concentration for both ethanol and sucrose. K_0 increased with an increase in solute concentration. This implies that PFC is effective for the diluted system with the higher yield, which will be reduced for the concentrated system because of the higher incorporation of solute into the ice phase through the higher K_0. In this case, however, the partial melting of ice[1] is useful to improve the yield in the process.

【Reference】 1) Miyawaki, O., et al., *J. Food Eng.*, **108**, 377-382 (2012)

freeze concentration, limiting partition coefficient, concentration polarization

講演番号：3J16p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ J校舎16会場

赤タマネギ添加による玄米の発芽促進効果

Acceleration of germination of brown rice by the red onion

○菅原雅通[1]、本間佑介[1]、中村澄子[1]、田村良浩[2]、石崎和彦[2]、松井崇晃[1,2]、大坪研一[1]（[1]新潟大院・自然、[2]新潟県農総研）

○Masamichi Sugawara, Yusuke Honma, Sumiko Nakamura, Yoshihiro Tamura[1], Kazuhiko Ishizaki[1], Takaaki Matsui[1,2], Ken’ichi Ohtsubo (Niigata University, [1]Niigata Agricultural Research Institute)

【目的】食料自給率の向上のため、米の消費拡大が求められている。発芽玄米は、その簡易炊飯性と高機能性のために消費が増加したが、製造時の長時間温水処理による微生物の繁殖や異臭の発生等が問題となる場合がある。本研究においては、発芽の迅速化と発芽率の向上を図るとともに、発芽玄米の衛生性を改善し、玉葱の機能性成分をも発芽玄米中に取り込ませることによって、発芽玄米の機能性をさらに強化することを目的として、玄米等の発芽処理における赤タマネギの添加効果について検討した。

【方法】試料米として、平成22年に新潟県農業総合研究所作物研究センターで栽培された、越車、夏雲、紫宝、紅香、紅更紗等の各種の新形質米およびコシヒカリ、夢十色（市販品）、ダイズ（市販品）、小豆（市販品）を使用した。各試料玄米の発芽においては、２種類の脱イオン水（pH5.9、pH6.9）および凍結乾燥した赤タマネギ（1%～3%）を加えた水溶液を使用した。水温は37℃を中心とし、発芽処理時間は8～72時間と変化させた。発芽玄米の評価指標として、発芽率、キシラナーゼ、セルラーゼ等の各種の酵素活性、γ-アミノ酪酸（GABA）含量、DPPHラジカル消去活性などを対象とした。また、各種試料米のタンパク質特性および発芽中の変化を調べるために、SDS-ゲル電気泳動などを行った。

【結果】発芽浸漬液に凍結乾燥した赤タマネギを2%添加することで、玄米の発芽が促進された。この赤タマネギによる発芽促進効果は、発芽率の低い試料米や小豆、大豆等でも認められた。赤タマネギの添加によって、発芽浸漬液における微生物の繁殖や発芽玄米の異臭発生も抑制されることが明らかになった。赤タマネギを発芽浸漬液に添加した発芽においては、キシラナーゼやセルラーゼ等の細胞壁分解酵素の活性が強くなり、その効果はジベレリン抑制剤であるユニコナゾールの添加によって消失した。発芽玄米のGABA増加は、赤タマネギを添加した発芽処理の場合、通常の発芽処理に比べても、さらに促進された。巨大胚芽米である越車の発芽処理に際して、発芽浸漬液に赤タマネギを添加して発芽させることにより、通常の発芽玄米に比べて、さらに高含量のGABAの生成されることが見いだされた。これらの各種の試料米の赤タマネギ添加発芽玄米は、タマネギの機能性成分として報告されているケルセチンも含んでいることが見いだされ、当該発芽玄米は、DPPHラジカル消去活性も示した。これらの結果、玄米を赤タマネギ存在下で発芽させることにより、発芽が促進され、発芽中の衛生性が向上し、機能性に優れた発芽玄米を製造できることが明らかになった。

Rice, Pre-germinated brown rice, Red onion

講演番号：3J16p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ J校舎16会場

タピオカ澱粉の糊化・老化に対するキサンタンガム添加の影響

Effect of xanthan on the gelatinization and retrogradation of tapioca pastes

Prawta Chantaro[1,2]、Rungnaphar Pongsawatmanit[2]、○西成 勝好[1]([1]阪市大院生科・食健康、[2]カセサート大農・農業生産)

Prawta Chantaro[1,2], Rungnaphar Pongsawatmanit[2], ○Katsuyoshi Nishinari[1]

([1]Food and Human Health Sciences, Osaka City University, Graduate School of Human Life Science, [2]Department of Product Development, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University)

緒言　タピオカ澱粉は安価で扱いやすいため食品加工製造調理において広く用いられている。非澱粉系多糖類を添加することにより澱粉の特性を制御できるため、多くの研究がなされている。本研究ではタピオカ澱粉TSとキサンタンガムXan混合系のレオロジー特性について調べた。

実験方法　TSとXanの総濃度5%w/w、混合比率TS/Xan=10/0, 9.5/0.5, 9/1および 8.5/1.5の混合系のRapid Visco Analyser, 動的粘弾性の周波数依存性、定常ずり粘度のずり速度依存性を各温度において測定した。

結果と考察　一定ずり速度における定常ずり粘度はXan含率の増加に伴い昇温および降温過程での温度依存性が顕著でなくなったが、これはXanの温度変化に対する安定性に起因する。混合系の糊はXan含率の増加に伴い損失剛性率に比して貯蔵剛性率がより大きくなり、固体的になったが、低温に保持すると固体的になる傾向が促進された。Xan添加によりTSの特性を制御できることが示された。

pasting properties, gelatinization, thermal stability

講演番号：3J16p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ J校舎16会場

餅の消化酵素に対する耐性機構の解明

Resistance to digestion of waxy rice cake (mochi) by digestive enzymes

○佐々木朋子、 鈴木保宏[1]、 岡本和之[2]、 神山かおる
（(独)農研機構・食総研、[1]（独）農研機構・作物研、[2] 茨城農総セ）
○Tomoko Sasaki, Yasuhiro Suzuki[1], Kazuyuki Okamoto[2], Kaoru Kohyama
(NARO Food Res. Inst., [1] NARO Inst. Crop Sci., [2] Ibaraki Agric. Center)

【目的】餅は製造工程で米粒の組織が物理的に破壊され、食べる前に再び加熱調理するために、消化しやすい澱粉系食品として考えられてきた。しかし一方では、餅の食塊が口腔・胃内の消化管を通り抜け、小腸内で硬化することによって腸内腔を閉塞する「食餌性腸閉塞」の事例が報告されている。そこで、本研究では餅の耐消化性に着目し、テクスチャーに特徴のある4品種の糯米から調製した餅を試料とし、消化酵素の浸透性を解析することによって、耐消化性の発生機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】4 品種の糯米（こがねもち、はくちょうもち、関東糯 172 号、BC3）から家庭用餅搗き機で調製した餅を冷凍保存し、室温解凍した餅を加熱前の試料、沸騰水中で 1 分半再加熱した餅を加熱後の試料とした。さらに、加熱後の試料を 37℃の人工消化液中で 2 時間浸漬、振とうした試料を酵素処理試料とした。3 種類の試料は凍結乾燥後、走査型電子顕微鏡(SEM)によって組織を観察した。一方、餅の加熱および消化過程におけるアミロペクチンの再結晶化の程度を示差走査熱量測定装置(DSC)で解析した。
【結果】凍結乾燥した餅組織をSEMで観察したところ、加熱前の試料では組織の中に多くの未糊化の澱粉粒が認められた。加熱直後の餅では糊化した澱粉による滑らかな表面が観察されたが、関東糯172号から調製した餅には、未糊化の澱粉粒が認められた。酵素処理試料については、部分的に消化酵素による分解が観察されたが、密な組織構造が保たれており、澱粉粒も多くみられた。以上の結果から、消化酵素は餅の内部までは十分に浸透せず、酵素によるアミロペクチンの分解が進行していないことが推察された。DSCによってアミロペクチンの結晶化の程度を解析したところ、加熱前の試料については、吸熱エンタルピーは0.9 - 6.1 J/gと広範囲の値を示し、糯米の品種間差が認められた。はくちょうもちが最も低く、BC3が最も高い値を示した。加熱直後の餅においてもアミロペクチン再結晶化に伴う吸熱ピークが認められた。特に、関東糯172号とBC3の吸熱エンタルピーは他の2品種に対して極めて高く、生澱粉の吸熱エンタルピーの品種間差異と同じ傾向を示した。酵素処理後の試料の吸熱エンタルピーは加熱後の試料の値とはほとんど差がなく、酵素処理によるエンタルピーの減少は認められなかった。

waxy rice cake, digestibility, amylopectin

講演番号：3J16p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ J校舎16会場

タイトル　米デンプン分解酵素の生米および炊飯中の分布解析

Title　Behavior of starch degrading enzymes during rice cooking

○大倉哲也、露久保美夏[1]、馬橋由佳[1]、香西みどり[1]（食総研、お茶大院・人間文化[1]）

○Tetsuya Ookura, Mika Tsuyukubo[1], Yuka Mabashi[1], Midori Kasai[1] (NFRI, [1]Ochanomizu Univ.)

【目的】炊飯中の還元糖の増加は米の食味に影響を与えるが、複数の還元糖生成酵素が米粒内のどの部位に存在するかについては不明な点が多い。本研究では還元糖生成に寄与する、α–グルコシダーゼ、プルラナーゼ、α–アミラーゼ、β–アミラーゼの生米粒及び炊飯中における分布を明らかにすることを目的とした。

【方法】平成20年度南魚沼産コシヒカリより，5画分（玄米全体(100%)、搗精部位層 100-90%、90-80%、80-70%、70-0%）の米粉を調製し、リン酸バッファーで懸濁後、TCAを用いてタンパク質を回収した。90%に搗精した米を20度浸漬1時間後と炊飯時の水温が40，60度に達した時点で、炊飯液と飯粒に分けて、上記同様にタンパク質を回収した。得られたタンパク質をSDS-PAGEで分離、ニトロセルロース膜に転写後、デンプン分解酵素に対する抗体を用いて解析した。

【結果】α–グルコシダーゼとプルラナーゼは内層部（70-0%画分）に多く存在し，外層部にいくほど少なく，糠層（100-90%画分）では明瞭な特異的バンドが検出されなかった。α–アミラーゼは外層部に多く存在し，特に，至適活性温度を 70℃付近に持つα–アミラーゼ Ⅰ は 100-80%画分，37℃付近に持つα–アミラーゼ Ⅱ は 90-80%画分に偏在していた。また，β–アミラーゼは米粒全体に分布していた。またプルラナーゼは、20℃浸漬中に炊飯液への酵素の溶出が検出できた。現在他の酵素についても検討を行っておりその結果も併せて報告する予定である。

Keyword1, Keyword2, Keyword3 rice, cooking, antibody

講演番号：3J16p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ J校舎16会場

新規アミロライスの胚乳および分離澱粉の構造解析と糊化特性

Study of structure and gelatinization properties of new amylorice starches

○阿久澤さゆり、佐藤かお理、花城　勲[1]、伊藤紀美子[2]
（東京農大・応用、[1]鹿児島大・農、[2]新潟大院・自然研）
○ Sayuri Akuzawa, Kaori Satoh, Isao Hanashiro[1], Kimiko Itoh[2]
(Tokyo-Nodai, [1]Kagoshimadai, [2]Niigatadai)

【目的】米は食品から工業原料にいたるまで多岐にわたる利用法がある。米の利用特性は、原料の形態が粒や粉にかかわらず、胚乳の約90％を占める澱粉の特性が炊飯米や米加工品の食味、機能性や物性に及ぼす影響は大きい。演者らは、様々な物性をもつ米の開発を目指して、澱粉の生合成に関与する酵素の発現を抑制した系統を作出し、米粒の特性、分離澱粉の構造解析と物性の検討を行っている。本研究では、イネの枝作り酵素のうちBEIIb機能破壊系統を作出し、胚乳の構造観察および分離した澱粉の構造解析と糊化特性を検討した結果を報告する。
【方法】粳種の日本晴、糯種のムサシモチ（*wx*）、BEⅡb機能破壊系統*WABEⅡb/wx* 、*Wx*^{a}型（インディカ型対立遺伝子）GBSSIをコードする*WAB*を導入した*WAB/wx*、*WABEⅡb/wx*および*WAB/wx*系統との交配系統である*WABEⅡb/WAB/wx*、インディカ型の品種IR36（*Wx*^{a}）の計6種の精白米および胚乳から分離した澱粉を試料として用いた。測定項目は、米粒の観察、X線回折、鎖長分布測定および多角度光散乱による平均分子量測定、RVAによるペースト特性、示差走査熱測定を行い、BEIIb機能破壊系統イネの胚乳構造の変化および分離澱粉の構造解析と糊化特性を検討した。
【結果】*WABEⅡb/wx*系統の米粒の形状は、長さは日本晴よりやや大きく、幅と厚さは小さかったが、胚乳内は日本晴と同程度の密な状態であった。しかし、胚乳の断面の観察では、BEIIb機能破壊により、アミロプラストの形成にも影響を及ぼしていることが示された。X線回折では、*WAB/wx*系統及び*WABEⅡb/wx*系統は穀類澱粉特有のA形に近い構造を示したが、*WABEⅡb/WAB/wx*はB形澱粉に近い結晶構造を示した。澱粉の鎖長分布測定では、*WAB/wx*および*WABEⅡb/WAB/wx*ともに、アミロースと超長鎖画分が検出された。また、アミロペクチンの鎖長分布から*WABEⅡb/WAB/wx*は真のアミロース含量が増大していることが分かった。*WABEⅡb/WAB/wx*はRVAによるペースト特性でも著しく低い粘度を示し、DSCによる糊化特性でも高温側にピークが移行していたことから、高アミロース澱粉であり、難糊化で分散しにくい澱粉ではないかと考えられた。

amylorice, starch structure, gelatinization property

講演番号：3J16p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ J校舎16会場

日本晴変異体米の分離澱粉の構造と粘弾性に関する研究

Study of structure and viscoelastic properties of starches divided from starch synthase-deficient rice mutants

○峰村貴央、池上　亨、藤田直子[1]、阿久澤さゆり（東京農大・応用、[1]秋田県大・生物資源）
○Takao Minemura, Akira Ikegami, Naoko Fujita[1], Sayuri Akuzawa (Tokyo-Nodai, [1]Akitakendai)

【目的】澱粉は食品・工業用などを含め調理・加工食品のテクスチャーの改良などに利用され、食材および原料としても有用な素材である。その利用特性に影響を及ぼす要因は、米粒の構造や胚乳内部の澱粉の構造に起因する粘弾性特性であると考えられる。そこで本研究では、澱粉の構造を変化させることにより、多様な粘弾性を有する米および米澱粉の創出とその利用を目的として、自然交配によって得られた日本晴変異体米の米粒及び分離澱粉の構造と糊液の粘弾性特性を検討した結果を報告する。
【方法】野生種（日本晴）およびその変異体米（イネスターチシンターゼ（SSI、SSⅢa)、デブランチングエンザイム（PUL)）の4種を試料米として用いた。測定項目は、米粒の性状観察とデジタルマイクロスコープによる炊飯米の表面観察を行った。また、分離澱粉について膨潤度・溶解度測定およびペースト特性（RVA)、糊液の水可溶性（低分子画分）および不溶性画分（高分子画分）の分子量分布、糊液中の水の挙動(NMR・DSC)、糊液の動的粘弾性の測定を行い、米粒、分離澱粉の構造解析および糊液の粘弾性特性を検討した。
【結果】すべての変異体米において、生米は米粒の形態および重量ともに日本晴と近似し、澱粉合成酵素の欠失による胚乳澱粉量に変化はなかった。炊飯米の表面観察では、日本晴は凹凸が観察され、SSⅢaは滑らかであり、表面の付着性も低かった。また、胚乳の断面の観察から、澱粉合成酵素の欠損によりアミロプラストの形成にも影響が現れていることが観察され、変異体米の胚乳構造の違いが示唆された。分離澱粉のペースト特性では、日本晴に比べてPULは最終粘度が高く、SSⅢaは著しく低い粘度を示した。SSⅢa 分離澱粉は、膨潤度が低く、糊液中に束縛された水の存在が多いことが示唆された。また、糊液を水可溶性区分（低分子画分）および不溶性区分（高分子画分）における分子量分布を測定した結果、糊液の貯蔵弾性率（G’）が高値であった糊液は不溶性画分（高分子画分）が多い傾向が示された。

starch synthase-deficient rice mutant, starch structure, dynamic viscoelasticity

講演番号：3J16p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ J校舎16会場

米粉パンにおける適正加水量について

Determination of Amount of Water for Making Rice Breads

○奥西 智哉、中村 健治[1]、宮本　守[2]、宮下 香苗（農研機構・食総研、[1]日清製粉つくば穀物研、[2]日の本穀粉）

○Tomoya Okunishi, Kenji Nakamura[1], Mamoru Miyamoto[2], Kanae Miyashita (NARO-NFRI, [1]Nisshin Flour Milling Inc., [2]Hinomoto Cereals Flour Milling Co. Ltd.)

【目的】製パンの原料配合において水は大きな割合を占めており、加水量は製パン性やその後のパン品質に大きく影響を与える。米粉の吸水の度合いは小麦粉と大きく異なっており、米粉相互においても用いる粉砕機の違いによる特性の違いが大きく吸水に影響を与えることが知られているが、吸水量を決める定まった方法はない。そこで、米粉パン製造現場において良質なパンを製造するための加水量を客観的に決定するための指標を提示するべく検討を行った。

【方法】１）30%米粉パン材料に対し、62、65、67、68、69、71および74%の各加水区でのミキシング後のドウ評価を行った。柔らかすぎる・柔らかい・適している・堅い・堅すぎるの5段階とし、それぞれ５・４・３・２・１点に換算し数値化した。２）粉材料1kgを用いてストレート法により製パンした。ただし、グルテン米粉パンの一次発酵工程はない。焼成後、室温で1時間放冷した後、重量計付きレーザー体積計で比容積を求めた。同一生地からの平均値を製パン１回に対する比容積とし、これを３回繰り返した。３）ファリノグラフ（8101型、Brabender製）を用い、小麦粉生地の物理性検定に準じて測定した。加水量を任意に変えて最高粘度を得た。４）ドライイーストを除く材料でドウを作成し、円形のアルミ皿に詰め、ポリエチレン袋内で25℃、30分静置した後、テンシプレッサー試験での圧縮率50％時の反発応力をドウ堅さとした。

【結果】１）30%米粉パン材料を用い、それぞれの加水量を持ったドウについて評価を行った。加水量が増大するとともにドウは柔らかく評価されたが、製パンに対する適正の観点では加水68%区（平均3.0）が適正であると評価された。２）30%米粉パン材料について、ドウ評価に用いたそれぞれの加水条件での製パン試験では加水とともに比容積は増大し、加水量71以上では比容積の変化は見られなくなった。同様の現象は、パン材料が小麦粉のみの場合においても観察された。ドウ評価において得られた適正加水量では、ファリノグラフの最高粘度はおよそ400BUを示した。３）米粉の種類および米粉パン材料の組成をかえて、試験を行った。異なる粉砕方法により得られた米粉を用いた30%調製米粉パン、グルテン米粉パンおよび50%米粉パン材料を用いた。いずれの米粉パンも、これまの製パン試験結果と同様に、ある加水量まではパンの比容積が加水量とともに増大し、それ以降は変化がほとんどなくなるという現象が見られ、いずれの組成の米粉パンにおいても、400BUのファリノグラフ最高粘度を与える加水量は、加水量-比容積曲線上において比容積の増大がみられなくなる直前の加水量と一致した。４）このことから、米粉パン製造においては、その加水量を混捏前にファリノグラフで示された指標に従って決定することで、好ましい比容積のパンが製造できることが期待される。

rice flour bread, farinograph, water absorption

講演番号：3J16p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ J校舎16会場

タイトル
Title
赤色パプリカ中、糖質(グルコース／フラクトース混合)区分の示す製パン性改良効果について
Effect of sugar (glucose/fructose) fraction in Red paprika on breadmaking properties
○ 瀬口　正晴、小澤　美貴[1]，中村智英子[1](神戸女子大・家、[1]神戸女子短大)
○ Masaharu Seguchi, Miki Ozawa, Chieko Nakamura (Kobe Women's Univ., [1]Kobe Women's Junior College)

【目的】これまでパプリカ属の野菜（パプリカ、唐辛子、ピーマン等）粉末が製パン性（パン高(mm), 比容積（㎤/g））に大きな改良効果のあることを報告した(1)。今回赤色パプリカに注目して研究をすすめ、パプリカ成分中のどのような成分が製パン性改良効果を示す原因なのかを検討した。
【方法】製パン試験方法はこれまでの方法(1)で行った。オートクレーブ処理は127℃、100分とした。水に対する透析後、透析チューブ内に残ったものをHMW区分、透析外液の濃縮物をLMW区分とした。LMW区分は厚手濾紙を用いたペーパークロマトグラフィー（ピリジン-ブタノール-水＝4：6：3）を行い、糖質区分、ペプチド区分をえた。さらに同一方法で糖質区分中のグルコース、フラクトース混合区分をえた。
【結果】赤色パプリカおよびそのオートクレーブ処理したものは何れも大きな製パン性改良効果を示した。水に対する透析後、得られたHMW、LMWをそれぞれ小麦粉に添加して製パンを行ったところ、LMW区分の方に製パン性改良効果があった。そのLMW区分中の糖質、ペプチド区分に分画し、それぞれを小麦粉に添加して製パン試験を行ったところ糖質区分の方に製パン性改良効効果があった。さらに糖質区分中グルコース、フラクトース混合区分を得て、その区分を小麦粉に添加して製パン試験をすすめたところ、大きな製パン性改良効果を示した。

(1) Cereal Chem 2009 (88) 633-636.

Red paprika, bread, sugars

講演番号：3J16p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ J校舎16会場

-

ミキシング中の小麦粉生地に発生するフリーラジカルのESR法による解析

Application of ESR technique to analysis of free radical generated by mixing of wheat flour dough

○加地俊紀，松宮健太郎，松宮知子，隈丸潤[1]，大村雅人[1]，松村康生（京大院農，[1]（株）日清製粉グループ本社）

○Toshiki Kaji, Kentaro Matsumiya, Tomoko Matsumiya, Jun Kumamaru[1], Masato Ohmura[1], Yasuki Matsumura (Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [1]Nisshin Seifun Group Inc.)

【目的】製パン過程において、ミキシングは小麦粉生地を最適な状態に捏ね上げる重要な工程であり、最終製品の品質に大きな影響を及ぼす。小麦粉は水と混ぜて捏ねることで、グルテンネットワークを形成し、他の穀物には見られない特異的な粘弾性を持った生地になる。このような生地形成には、グルテンの水和やSH-SS交換反応などが関係しているが、特にSH-SS交換反応については、ミキシングの物理的な力によって発生するフリーラジカルが重要な役割を果たしているという説も存在する。本研究では、ESR測定を用いてミキシング中の小麦粉生地に発生するフリーラジカルを解析することを目的とした。

【方法】小麦粉試料としてタンパク質量の高いパン用小麦粉Ａ（タンパク質量：12.6 %）、タンパク質含量が中庸のパン用小麦粉Ｂ（10.3 %）を用いた。小麦粉10 gに対して適切な量の水、食塩0.2 g、安定ラジカルであるTempol（4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-Oxyl：小麦粉1 gに対して88または880 nmol）を加え、ピンミキサー（National MFG. COP.）を用いて生地を調製した。ミキシング時間（0～13分）ごとに小麦粉生地をピンミキサーより取り出しキャピラリーに詰め、ESR測定を行い、得られたスペクトルからTempol量を計算した。一方、ミキシング初期の生地を取り出し、静置した場合のTempol量の時間変化も検討した。さらに、小麦粉生地から食塩水を用いて水溶性画分を抽出し、その画分のTempolに対する作用を検討した。また、生地に、Superoxide dismutase（SOD）、カタラーゼ、lipoxygenase（LOX）阻害剤を各々加えてミキシングし、Tempol量に対する影響を調べた。

【結果】88 nmolのTempolを添加した場合、ミキシングとともにTempol量が減少し、最終的に消失した。880 nmolのTempolを添加した場合は、スピン量の減少が見られたが、小麦粉Ａにおいて5分以降は一定の値となり減少が止まった。また、ミキシング初期の生地を静置した場合、スピン量の減少は観察されなかった。以上の結果より、ミキシングの物理的な力によって生じたフリーラジカルが、Tempolラジカルと反応し、その減少を引き起こしていること、また、発生するフリーラジカル量には限度があるものと考察した。小麦粉生地の水溶性画分は、Tempolラジカルに影響を与えなかった。また、SOD、カタラーゼ、LOX阻害剤を生地に添加しても、ミキシング中のTempol量の減少に影響は見られず、これらによって影響を受ける各種ラジカルはTempol消去に関与しないことが示された。以上の結果より、ミキシングによって発生するチニールラジカル（RS・）がTempolラジカルの消去に関係していることが示唆された。

Wheat flour dough, ESR, Tempol

講演番号：3J16p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ J校舎16会場

パスタの製造工程および乾燥条件の違いがデンプンに与える影響

Effects of processing and drying profiles on starch of pasta

○大村 雅人、松宮 健太郎[1]、林 由佳子[1]、松村 康生[1]（(株) 日清製粉グループ本社、[1]京大院農）

○Masato Ohmura, Kentaro Matsumiya[1] ,Yukako Hayashi,Yasuki Matsumura(Nisshin seifun group inc., [1]Grad.Sch.of Agric.,Kyoto Univ.)

【目的】パスタの品質において大きな影響を与える要因は、原料と製造工程であり、製造工程においては、乾燥条件が非常に重要であると言われている。パスタの乾燥温度は、主に低温乾燥（50℃付近)、高温乾燥（70℃付近)、超高温乾燥（80℃以上）に区分されており、近年では製造効率の観点からも乾燥時間が短い高温乾燥や超高温乾燥が主流になりつつある。

当研究室では、今まで製造工程中の乾燥条件の違いがパスタの品質に及ぼす影響について様々な観点より報告をしてきたが、本研究では、乾燥条件がパスタのデンプンに及ぼす影響について詳細に解析することを目的とした。デュラムセモリナ、生麺、普通乾燥パスタ（LT：50℃)、高温乾燥パスタ（HT：70℃)、超高温乾燥パスタ（VHT：90℃）の５種類のサンプルよりデンプンを抽出して解析し、製造工程中において、あるいは乾燥条件の違いによってデンプンの性質に変化が生じるかどうか検討を行った。

【方法】デュラムセモリナ、生麺および、ミルで粉砕したLT、HT、VHTよりデンプンを抽出し、室温にて乾燥後、乳鉢ですりつぶした。これらのサンプルを対象として、タンパク質、灰分の分析を行い、理化学的特性を解析するとともに粒度分布の測定を行った。また、DSC法などにおいて糊化特性を検討するとともに、デンプンゲルの物性を評価した。

【結果】各サンプルより共雑タンパク質が少ないデンプンを精製できた。また、デンプンの抽出効率はLTやHTよりもVHTでは顕著に低い傾向があった。また、粒度分布においては、LTより抽出したデンプンと比較して、VHTは小粒デンプンの割合が少ない傾向があった。また、糊化特性、およびデンプンゲルの物性には、製造工程、および乾燥条件によっても違いがみられた。これらのことから、パスタ中のデンプンは、製造工程中、および乾燥条件の違いにより、その性質に変化が生じることが明らかとなった。そのようなデンプン特性の違いがパスタの食感にも影響を与えていると考えられる。

Pasta, Starch, Drying profile

講演番号:3J16p13
講演日時、会場:3月24日16:21～ J校舎16会場

パスタの加工条件（ダイと乾燥温度）による構造と物性への影響

Effects of processing conditions (die and drying temperature) on structure and physical properties of cooked pasta

○佐藤 純、檜貝 雄哉[1]、中村 卓[1]（明治大院・農、[1]明治大・農）
○Jun Sato, Yuya Higai[1], Takashi Nakamura[1] (Meiji univ. graduate school, [1]Meiji univ.)

【目的】

パスタにおいて食感は、おいしさを決める重要な要因である。パスタはデュラムセモリナ粉に水を加えて混合・混練し、押出成型、乾燥工程を経て製造される。押出成型の際にパスタが押し出される先端部分をダイといい、その材質がテフロン・ブロンズの違いによってパスタのソースのりが異なるとされている。また、乾燥工程の条件（温度、湿度）はパスタの食感に大きな影響を与える。これまでの研究で、乾燥温度が高いほどグルテンタンパク質の重合度は高くなることが明らかにされた。また、テフロン、ブロンズダイ押出パスタの両方で高温乾燥パスタにおいて低温乾燥パスタよりも破断強度試験でのもろさ荷重が大きくなった[1)]。本研究では、表面構造による付着性とソースのりの違いと、乾燥温度によるパスタのもろさ荷重への影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

小型電動パスタマシン（マジカ）を用いて、デュラムセモリナを原料としたテフロンダイ(TD)/ブロンズダイ（BD）と乾燥温度85℃/55℃の組み合わせで4種類のパスタを作製した。茹でパスタの付着性とソースのりをクリープメーターにて、茹でパスタの表面構造を共焦点レーザー走査顕微鏡（CLSM)、内部構造を走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて観察した。また、水分勾配を均一にした茹でパスタの破断強度試験をクリープメーターにて行った。

【結果】

SEMを用いて茹でパスタの表面構造を観察したところ、TDでは滑らかな表面構造をしており、BDでは不均一な表面構造が観察された。CLSMでは、それぞれのダイの85℃乾燥パスタの方が55℃乾燥パスタよりタンパク質の密な構造が観察された。この表面構造と、付着性、ソースのりについて相関がみられた。また、SEMを用いて茹でパスタの横断面中心の内部構造を観察したところ、もろさ荷重が大きい85℃乾燥パスタにおいては澱粉とタンパク質の界面が滑らかであった。一方、もろさ荷重が小さい55℃乾燥パスタにおいては澱粉とタンパク質の界面が粗い構造をしていた。端の内部構造は、85℃乾燥パスタにおいてタンパク質と澱粉の界面が観察されたのに対し、55℃乾燥パスタにおいては明確な界面が確認されなかった。水分勾配を均一にした85℃乾燥パスタの破断強度試験を行ったところ、もろさ荷重は通常の茹でパスタと同じ大きさになった。以上の結果から、ダイの違いによる調理特性と、乾燥温度が及ぼす茹でパスタの構造と物性への影響について考察する。

1)日本食品科学工学会第58回大会講演集 p. 99

pasta, die, structure

講演番号：3J16p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ J校舎16会場

タンパク質重合と澱粉糊化特性の異なるパスタでの破壊過程の比較

Comparison of fracture process with different pasta in protein polymerization and starch pasting properties.

○川田可南子、中村卓（明治大院・農・農化）
○Kanako Kawata, Takashi Nakamura (Meiji Univ. Grad School)

【目的】パスタにおいて食感はおいしさを決める重要な要因である。その製造過程の中で特に乾燥条件の違いが大きく食感に影響し、これはパスタ中のタンパク質重合や澱粉の糊化が関係すると考えられている。そこでデュラムセモリナ（DS）をパスタの乾燥モデルとして温度（55～90℃）と湿度（70～90%）の組み合わせで熱処理し、乾燥温度や湿度の組み合わせによりタンパク質重合や澱粉の糊化特性がどのように変化するかを明らかにした[1)]。今回は、その中から特徴的な傾向が見られた乾燥条件でパスタを作製し、タンパク質重合と澱粉糊化特性の異なるパスタの構造と物性の違いによって破壊過程でどのような差が見られるか明らかにすることを目的とした。
【方法】DSでのRVA測定とタンパク質重合率の結果から、最も粘度が低く重合率が高い乾燥条件(A)と粘度は同じで重合率が違う乾燥条件（重合率高：B、低：C）の3つのパスタを作製し分析した。重量比（茹で後/茹で前）が、2.3のパスタについてクリープメーターにて破断試験を行った。パスタはプランジャーに対して垂直方向に置き破断した。更に共焦点レーザー走査顕微鏡（CLSM）によりパスタ縦断面の中心から表面までの構造を連続的に観察した。また破壊過程の観察として、小型クリープメーターによりパスタの段階的圧縮とパスタを切断した横断面の段階的圧縮をした。巨視的観察ではデジタルカメラを用い、微視的観察ではCLSMを用いた。
【結果】破断試験ではAは破断荷重も脆さ荷重も高かったが、B,Cは共に低かった。構造観察では、中心・中間・表面の各部分で澱粉粒の形に違いが観察された。中心部分の厚さはAでは厚く、B,Cは共に薄かった。更にAとCについて破壊過程の観察を行った。パスタの段階的圧縮の巨視的観察では中心部分と表面部分の直径方向への広がりはほぼ同じだったが、中間部分の直径方向への広がりはAは小さくCは大きかった。微視的観察ではAはタンパク質ネットワークが長さ方向に伸び、Cは直径方向に伸びる様子が観察された。パスタを切断した横断面の微視的観察では中心部分と中間部分の広がりはAは小さくCは大きかった。表面部分はAは大きくCは小さかった。以上より、重合率が高いパスタは表面部分は澱粉が大きく膨潤し、中心部分はあまり膨潤しない事が考えられた。それに対し、重合率が低いパスタは表面部分と中心部分の澱粉の膨潤程度の差が小さい事が考えられた。これらのことから、Aの破断荷重と脆さ荷重が高くなった理由として、中心付近の澱粉があまり膨潤しなかったため硬くなった事と、タンパク質ネットワークが長さ方向に伸びやすく力が抜けやすくなった事が考えられた。またCの破断荷重も脆さ荷重も低かった理由として、Aよりも中心付近の澱粉が膨潤したため軟らかくなった事と、タンパク質ネットワークが直径方向に伸びやすく力が抜けにくくなった事が考えられた。

1)日本食品科学工学会　第58回大会講演要旨集p. 99

Pasta, Fracture process, Protein polymerization

講演番号：3J16p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ J校舎16会場

地下澱粉の糊化特性への高湿加熱処理(パスタ乾燥条件)の影響

Effect of high-moisture heating treatment on pasting properties of root starch

○小林 佳祐、中村 卓（明治大院農・農化）
○Keisuke Kobayashi,Takashi Nakamura(Meiji Univ.Grad)

【目的】パスタにおいて食感は美味しさを決める重要な要因である。パスタはデュラムセモリナ（DS）に水を加え、混合・混練、押出し成型、乾燥過程を経て製造される。なかでも乾燥過程ではパスタのひび割れを防ぐために加熱温度・相対湿度をコントロールした乾燥が行われており、その乾燥条件の違いでパスタの食感は大きく異なると言われている。この乾燥過程では主成分である澱粉について高温・高湿で物理的な加工をしている場だと考えられるが、その変化についてはいまだ明らかとなっていない。各種小麦澱粉について高湿加熱処理(パスタ乾燥条件)すると糊化特性が変化することを明らかとした[1)]。しかしながら、糊化特性が変化する原因については明らかにすることが出来なかった。そこで本実験では地下澱粉に同様の高湿加熱処理をすることで地下澱粉の糊化特性が変化するか、また高湿加熱処理によりどのようなメカニズムで糊化特性が変化しているのかを明らかにすることとした。
【方法】デュラムセモリナ（DS）からマーチン法を用いて澱粉を単離した。単離したDS澱粉と馬鈴薯澱粉、タピオカ澱粉の水分含量を30%に調整し、加熱温度（80～90℃）と相対湿度（70～90%）の条件を組み合わせて恒温恒湿で加熱処理した。得られた処理澱粉について糊化特性をRapid Visco Analyzer(RVA)、示差走査熱量計（DSC）で測定し、結晶構造をX線回折装置で測定した。また、澱粉の表面微細構造について原子間力顕微鏡（AFM）を用いて観察した。
【結果】RVAで測定した最高粘度は全てのサンプルで未処理に比べ高湿加熱処理することで減少した。また、加熱温度・相対湿度が高いほど最高粘度が減少した。DSCで測定した糊化ピーク温度は全てのサンプルで未処理に比べ高湿加熱処理することで上昇した。また、加熱温度・相対湿度が高いほど糊化ピーク温度が上昇した。融解エンタルピー(⊿H)は全てのサンプルで未処理に比べ高湿加熱処理することで減少した。また、加熱温度・相対湿度が高いほど⊿Hが減少した。AFMでDS澱粉の表面微細構造を観察すると未処理サンプルでは5～10nm程度の凹凸が観察された。この凹凸はBlocklet構造だと考えられる。しかしながら、高湿加熱処理すると表面の凹凸が消失した。高湿加熱処理により⊿Hが減少したことから澱粉粒表面付近の結晶が融解したため、表面のBlocklet構造が消失したと考えられる。X線回折によって測定した結晶構造は馬鈴薯澱粉の未処理ではBタイプの結晶構造をとっていたのに対し、高湿加熱処理するとAタイプの結晶構造に近づいた。この変化は湿熱処理と同様の変化であった。以上の結果より地下澱粉を高湿加熱処理すると糊化特性が変化することが明らかとなった。また、高湿加熱処理することにより澱粉には湿熱処理と同様の変化とさらに部分糊化が起こっていると考えられる。これらの結果よりパスタ乾燥過程でもパスタ中の澱粉に湿熱処理と部分糊化の物理的加工がおこなわれていると考えられる。

1）第58回食品科学工学会大会要旨集p.64(2011)

starch　pasta　drying

講演番号：3J16p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ J校舎16会場

塩のにがり成分が調理特性へ与える影響について

Effect of bittern components of salt on cooking properties

○黒澤　隆紀、築舘　亜由美[1]、遠藤　由香、郡司　花梨、石川　匡子（秋田県立大・生物資源、[1]秋田県立大院・生物資源）

○Takanori Kurosawa, Ayumi Tsukidate[1], Yuka Endo, Karin Gunzi, Kyoko Ishikawa (Faculty of Bioresource Sciences Akita Prefectural University, [1]Graduate School of Bioresource SciencesAkita Prefectural University)

【目的】塩専売法廃止されて以降、にがりを含んだ塩が多数販売されるようになった。このにがりを含んだ塩を調理に使用した際、高純度塩（専売法時代から販売されている旧専売塩）と比較して味が異なると言われている。この理由として、塩の結晶粒径や水分量の違いはもちろん、塩に含まれるNaCl以外の成分が影響すると考えられている。にがり含有塩は、塩の表面に$MgCl_2$や$CaCl_2$などが付着しており、これらが食品表面上に接触することで溶解性や食品内部への浸透速度や食品成分との相互作用に影響を及ぼし、それが最終的に味の変化にも繋がっていると考えられる。そこで、高純度塩の表面に、にがりの主成分である$MgCl_2$をコーティングした塩を調製し、実際に食品に振り掛けることでどのような影響を与えるか検討した。

【方法】$MgCl_2$コーティング塩は市販高純度塩をエタノールで洗浄後ふるい分けし、得られた300-600 μmの塩に最終$MgCl_2$濃度が1.5%になるよう$MgCl_2$溶液を添加し、再度ふるい分け、乾燥することにより調製した。この塩を食品サンプルとして用いた大根表面に振りかけた後、0.5、1、3、6、24時間室温にて静置した。所定時間が経過したダイコンの離水率、成分（Mg^{2+}, Cl^-）、破断強度も測定した。対象として、NaClのみ、$MgCl_2$のみを添加し、比較検討を行った。

【結果】$MgCl_2$コーティング塩、NaCl、$MgCl_2$を大根サンプルに一定時間振りかけた後、各サンプルの成分分析を実施した。Cl^-濃度は、いずれの塩においても時間経過と共に増加し、サンプル間での優位な差は認められなかった。サンプル中のMg^{2+}濃度は、塩由来であるため、コーティング塩は高純度塩よりも高く、にがり含有塩に含まれる低濃度の$MgCl_2$であっても十分食品内部に浸透していることが判った。離水量を測定したところ、$MgCl_2$のみを添加した場合の離水率が最も高く、コーティング塩はNaClよりもわずかに高いという結果であった。これは、同一濃度では NaClより$MgCl_2$の方が浸透圧が高いため、塩溶解液の浸透圧が上昇し、離水量が増加したためと考えられる。硬度測定の結果、高純度塩よりも$MgCl_2$コーティング塩を振りかけた方が破断強度はわずかに増加することが分かった。Mgなど2価のイオンは、ダイコンの軟化を抑制するという報告があり、今回も同様に$MgCl_2$が影響を及ぼしたと考えられる。以上のことからにがり成分である$MgCl_2$は、味質ではなく、硬さにのみ影響を及ぼしていることが示唆された。

Bittern component, cooking properties, solubility

講演番号：3J16p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ J校舎16会場

塩の結晶粒径が調理特性に及ぼす影響

Effect of salt size on cooking properties

○築舘亜由美，鈴木晶[1]，菅原弘人[1]，秋山美展[1]，石川匡子[1]（秋田県立大院・生物資源，[1]秋田県立大・生物資源）

○Ayumi Tsukidate, Mihoshi Suzuki[1], Hiroto Sugawara[1], Yoshinobu Akiyama[1], Kyoko Ishikawa[1]（Graduate School of Bioresource Sciences Akita Prefectural University, [1]Faculty of Bioresource Sciences Akita Prefectural University）

【目的】塩専売法廃止以降、にがりを含んだ塩が多数販売されるようになった。このにがりを含んだ塩を焼き魚や漬物などの調理に使用した際、高純度塩（専売法時代から販売されている旧専売塩）とは味に及ぼす影響が異なると言われている。これは、成分の違いのみならず、にがりを含んだ塩が高純度塩よりも粒径が大きいため、食品表面上での溶解速度や食品内部への浸透挙動に違いが生じ、それが最終的に味や食感に影響を与えているためと考えられる。そこで、同一成分で粒径のみが異なる塩を調製し、食品の成分、物性に与える影響について検討した。

【方法】市販塩をエタノールで洗浄後、粒径ごとにふるい分けし、300～600 μm（高純度塩粒径相当、以下小粒塩）、1000～1180 μm（にがり成分含有塩粒径相当以下大粒塩）の2つの塩を調製した。対象とする食品には寒天ゲル並びに大根を用いた。寒天ゲルは25 mm × 25 mm × 12 mm のPP容器中で固めたテストピースを作成した。市販のダイコンは、維管束方向に向きを揃え、根に近い部分を底面に輪切りし、25 mm × 25 mm × 10 mmに裁断した。寒天ゲルとダイコンの表面上に小粒塩、大粒塩をそれぞれ1 gずつふりかけ、設定した時間（15, 30, 60, 90, 180分）に塩を取り除き、水抽出を行った。その後一晩溶液を静置し、塩化物イオン濃度を測定した。またダイコンについては物性測定も実施した。

【結果】大粒塩、小粒塩を振りかけた寒天ゲルの塩化物イオン濃度測定した結果、時間とともに塩化物イオン濃度が増加し、どの時間でも大粒塩よりも小粒塩の方が濃度は高かった。このことから小粒塩の溶解の方が速く、食品へ浸透しやすいことが確認できた。実際にダイコンを用いて、浸透挙動について検討した結果、寒天ゲル同様、時間経過と共に塩分濃度の増加、小粒塩の方が高いという傾向が認められ、ダイコンに対して飽和状態になる時間も小粒の方が速かった。また、物性測定による粒径が食感に与える影響について検討した。変形のしにくさを示す弾性率は、小粒塩・大粒塩どちらも60分後までは時間が経過するにつれて小さくなり、その後ほぼ平衡状態に到達した。この結果、ダイコンが時間経過とともに柔らかくなると考えられた。しかし、塩の粒径の差による弾性率の違いはほとんど見られず、粒径が物性値に及ぼす影響は小さいと思われる。以上のことから、塩の粒径の違いは、溶解速度や食品の浸透度合に影響を与え、食感よりはむしろ味に与える影響が大きいことが示唆された。

Permeation of salt, Particle size, Solubility

講演番号：3J16p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ J校舎16会場

GABAとACE阻害ペプチドを含む京漬物（糠漬け）

Kyoto-pickles containing GABA and ACE inhibitor peptide

○上野 義栄、森 義治[1]、山根 吉人[2]、今西 貴紀[2]、小田 耕平[3]（京都府中小企業技術セ、[1]㈱もり、[2]㈱本田味噌本店、[3]京工繊大）

○Yoshie Ueno, Yoshiharu Mori [1], Yoshito Yamane [2], Takanori Imanishi [2], Kohei Oda [3]（Kyotofuchusyokigyogijyutuse, [1] Mori, [2] Hondamisohonten, [3] KIT）

【目的】

伝統的な発酵法による漬物は、食塩を多く含むことから血圧上昇を心配し敬遠されている面が多々ある。これは漬物業界に深刻な問題であり、早期に解決すべき課題である。我々は、食塩摂取による血圧上昇を緩和する目的で、伝統的な発酵法を用い、血圧降下に有効な作用機構の異なるGABAとACE阻害ペプチドの２つの生理活性物質を含有する漬物の開発を試みた。

【方法】

糠漬けに着目し、材料としては、京野菜の青味大根及び京かんざし（人参）の他、キューリ、ナス、カボチャを使用した。酒造、焼酎、味噌及び醤油用6種類の麹菌を使用して作成した白味噌と米糠を混合し、更に55℃、20h加熱処理を行った発酵床を作成した。発酵床に野菜を10℃で1～4週間漬け込み、漬物を作成した。

GABA量とACE阻害活性の測定は、HPLC（陽イオン交換型カラムを用いた蛍光検出）及びACE阻害活性測定キット（同仁化学研究所）により行った。風味テストは、熟練したパネラーが行った。

【結果】

1）糠と白味噌で作成した発酵床を用いて漬物を作成した結果、色保持が良く、且つ風味の良い漬物が出来た。特に、キューリとナスは、色保持効果が顕著であった。

2）これらの漬物には、0.1%以上のGABAとACE阻害ペプチドが含まれていた。キューリ糠漬の場合、GABAは 0.11 %、ACE阻害活性（IC50）は 8.21 μg / mlであった。

3）漬物のGABA及びACE阻害ペプチドは発酵床に由来し、GABAは米糠由来、ACE阻害ペプチドは白味噌由来と予想された。

4）発酵床は、加熱処理することにより、ACE阻害活性（IC50）が1.66 μg / mlから、0.66 μg / mlに高くなった。

以上、漬物材料の自然色を保ち、且つ、風味が良く、GABAとACE阻害ペプチドの２種の生理活性物質を含有する京漬物を開発することが出来た。

本研究は、京都府中小企業技術開発促進事業＜企業連携型＞補助金により実施した。

pickles , GABA , ACE inhibitor peptide

講演番号：3J16p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ J校舎16会場

味覚センサー、官能検査、アミノ酸分析による新規魚醤群の呈味性評価

Taste evaluation of new types on fish sauces by using taste sensor, sensory assessment and amino acid analysis

○阿部 憲太郎、池崎 秀和、田中 淳也[1]、半明 桂子[1]、有富 和生[1]、和田 律子[2]、宮崎 泰幸[2]、原田 和樹[2]（インセント、[1]山口県産技セ、[2]水大校・院）

○Kentaro Abe, Hidekazu Ikezaki, Junya Tanaka[1], Keiko Hammyo[1], Kazuo Aritomi[1], Ritsuko Wada[2], Taiko Miyasaki[2], Kazuki Harada[2] (Intelligent Sensor Technology, Inc., [1]Yamaguchi Pref. Industrial Technol. Inst., [2]National Fisheries Univ.)

【目的】魚醤は魚介類を発酵させて得られる、豊富なアミノ酸や核酸を含む調味料で、特に東南アジアではその濃厚な旨味や香りが重宝されている。しかしながら日本においては、いくつかの地方でその土地独自の魚醤を活用する文化が残っているものの、大豆醤油と比べると大衆的に普及しているとは言い難い。本大会では、味覚センサーを用いて。大豆醤油と新たに開発された魚醤の呈味性を数値化し、官能評価、アミノ酸分析の結果との相関性を調べた。

【方法】魚醤は、(独）水産大学校が開発したフグの発酵調味料の「ふく魚醤」、クジラの赤肉を発酵させた「くじら醤油」、ウニの生殖巣を発酵させた「うに魚醤」の 3 種類を、対照サンプルとなる大豆醤油には、キッコーマン（株）の「こいくち醤油」を用いた。味の測定には、味覚センサーTS-5000Z（(株）インセント社製）を用い、得られたセンサー出力をウェーバーの法則により 20%濃度差に対応する数値に換算した。遊離アミノ酸の定量は、日本電子（株）製のアミノ酸分析装置 JLC-500V を用いた。官能評価はブラインド嗜好順位法を用い、センサー出力結果との関係性を調べた。

【結果】味覚センサーにより、各魚醤と大豆醤油の味の特徴がそれぞれ異なることが示唆された。特に、センサーによる酸味、苦味雑味、渋味刺激、旨味、塩味、苦味、渋味、旨味コクの応答結果の中でも、酸味と旨味での差は顕著で、各サンプルの呈味性の特徴に強く関係し、新規魚醤群が今の消費者に受け入れられやすいという点を、得られた味の数値は推定させた。現在、味覚センサーから得られた味の数値について、官能評価値や、試料群の遊離アミノ酸組成との間に、相関性があるかどうか解析を進めている。

taste sensor, fish sauce, amino acid analysis

講演番号：3J16p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ J校舎16会場

ジュール加熱によって調製した豆乳の性状

Characterization of soymilk prepared by joule heating

○下山田 真、板橋 由紀、都築 公子[1]、江草 信太郎[1]、本多 芳孝[1]（宮城大・食産、[1]マルサンアイ(株)研）

○Makoto Shimoyaamda, Yuki Itabashi, Kimiko Tsuzuki[1], Shintaro Egusa[1], Yoshitaka Honda[1] (Miyagi Univ., [1]Marusanai Co.)

【目的】現在、飲用豆乳の製造には蒸気などを用いた外部加熱方式が広く用いられている。そのため、ジュール加熱やマイクロ波加熱といった内部加熱方式で処理した豆乳についての報告はほとんどみられない。特にジュール加熱は電圧の制御によって昇温速度を制御しやすいという特徴を持っている。そこで本研究では、ジュール加熱を用いて豆乳を調製し、得られた豆乳の品質について昇温速度との関係から検討することとした。

【方法】ジュール加熱のための装置は、ポリプロピレン製角形容器に発泡スチロールの断熱材とシリコンゴム製のふたを組み合わせることで自作した。これに交流電源装置に接続したチタン製電極（接液部; 5 cm×5 cm）を2枚挿入し、30～100Vの電圧（50Hz）をかけることで加熱した。

生豆乳は浸漬大豆に8倍加水することで調製し、そのうち140mLを加熱容器に移した。コントロールとしてプラスチック容器に分注した豆乳(20mL)を沸騰湯浴中にて15分間加熱したものを用いた。熱電対を用いて豆乳の中心部の温度を測定した。豆乳は加熱終了後に氷水で冷却し、1,500×g、10分間遠心分離したものを試料豆乳とし、粘度、タンパク質表面疎水性度、粒度分布についてそれぞれ測定した。

【結果】チタン電極を用いて電圧をかけると、豆乳の昇温速度は電圧の上昇とともに速くなった。ジュール加熱によって得られた豆乳の粘度を測定したところ、電圧が低い方、すなわち温度上昇がゆっくりの方が大きな値を示した。一方、豆乳のタンパク質表面疎水性度は30V、50V、100Vいずれの電圧をかけて加熱した豆乳においても同程度の値を示し、沸騰湯浴で加熱した豆乳とほぼ同じ値であった。

豆乳の粒度分布測定では、いずれの試料においても0.4 μm付近のオイルボディー由来の油滴粒子がほとんどを占め、エマルション会合物はほとんど見られなかった。さらに0.08 μm付近にタンパク質凝集体（タンパク質粒子）由来と推測される成分が観察されたが、これは電圧の高い方が大きくなり、また95℃に達した後にその温度を維持することで小さくなった。

これらの結果より、タンパク質の変性状態やエマルションの分散状態は豆乳を加熱する際の昇温速度に依存して変化するものと推測された。

soymilk, joule heating, protein

講演番号:3J16p21
講演日時、会場:3月24日17:59～ J校舎16会場

抗酸化能を発揮するマルトース修飾鶏筋原線維タンパク質のゲル化およびそのゲル特性

Characterizations of glycosylated chicken myofibrillar protein gel with antioxidative ability

○礒野 舞，佐伯 宏樹[1]，西村 公雄（同志社女大・食栄，[1]北大院・水）
○Mai Isono, Hiroki Saeki[1], Kimio Nishimura (Doshishajodai, [1]Hokudaiin)

【目的】すでに我々は，鶏筋原線維（Mf）タンパク質にマルトースをメイラード反応により修飾させると，スーパーオキシドアニオンラジカル（O_2^-）に対する抗酸化能を獲得することを認めている[1)]。今回，ランダムセントロイド最適化（RCO）法を用いて，O_2^- に対する抗酸化能をできるだけ強く発揮するマルトース修飾鶏Mfタンパク質の調製条件を検討した。さらに，最適調製条件のマルトース修飾鶏Mfタンパク質のゲル化を試み，その形状をnative鶏Mfタンパク質ゲル、無糖鶏Mfタンパク質ゲルと比較検討した。
【方法】調製条件には温度（40-70℃），相対湿度（25-45%），反応時間（24-48h），マルトース/Mf重量比（2-8）を選んだ。評価は，0.1M NaCl溶液への溶解性を保持していることを第一義とし，電子スピン共鳴法を用いてO_2^- に対する消去能を測定することで行った。ゲル調製はマルトース修飾鶏Mfタンパク質（タンパク質濃度15mg/ml）およびnative鶏Mfタンパク質、無糖鶏Mfタンパク質をそれぞれ試験管（径16 mm）に1ml分注し，90℃で240分まで加熱することにより行った。各ゲル構造はクライオ走査電子顕微鏡（SEM）により観察した。
【結果】RCO法を用いることにより，最適調製条件（温度64.9℃，相対湿度40.7%，時間36.20h，マルトース/Mf重量比5.03）を得た。この時得られたマルトース修飾鶏Mfタンパク質のO_2^- 消去活性（SOSA）は，541±74units of SOD/g of protein（n＝3）であり，デラウエア抽出物のSOSA 700 units of SOD/g of proteinと同等の抗酸化能を示した。また，この時のタンパク質組成をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）法により調べたところ、多くのミオシンは不溶化しており、主たる可溶性タンパク質はアクチンであった。最適条件で調製したマルトース修飾鶏Mfタンパク質は，90℃の加熱によりゲルを形成し，加熱時間（～240分）に依存して固いゲルを形成した。また，同じ加熱時間のnative鶏Mfタンパク質ゲルよりも固いゲルであった。各加熱時間で調製したマルトース修飾鶏Mfタンパク質ゲルをSDS-PAGE法により分析したところ，加熱初期はSS結合による架橋が起こり，加熱後期ではSS結合以外の共有結合による架橋を形成していることがわかった。そして，90℃120分の加熱で調製したマルトース修飾鶏Mfタンパク質ゲルをクライオSEMにより観察すると，native鶏Mfタンパク質ゲル、無糖鶏Mfタンパク質ゲルに比べて構造体が太かった。そのため，よりリジッドなゲルを形成したと考えられる。さらに，マルトース修飾鶏Mfタンパク質がゲル状態下でも抗酸化能を保持し得るかについても検討を行いその性状を調べた。

1) Nishimura *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 247-254 (2011)

Maillard reaction, antioxidant, gelation

講演番号:3B18a01
講演日時、会場:3月24日09:00～ B校舎18会場

海洋微生物*Crypthecodinium* sp. D31株によるドコサヘキサエン酸を含有するリン脂質の生産

Production of phospholipids including docosahexaenoic acid by marine microorganism *Crypthecodinium* sp. D31

○奥田 知生、安藤 晃規[1]、櫻谷 英治、小川 順（京大院農・応用生命、[1]京大・生理化学）
○Tomoyo Okuda, Akinori Ando[1], Eiji Sakuradani, Jun Ogawa (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [1]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【目的】

ドコサヘキサエン酸（DHA）は高度不飽和脂肪酸（PUFA）のひとつであり、その生理活性から機能性食品や医薬分野への利用が期待されている。近年、魚油に代わるDHA供給源として、*Crypthecodinium*属などの微生物が注目を集めている。我々はこれまでに、沖縄本島汽水域から海洋性微生物*Crypthecodinium* sp. D31株を取得し、総脂肪酸の60%以上をDHAが占めることを明らかにしている。本研究では、（１）D31株によるDHA高生産を目的とした培養条件の検討、及び（２）生産される油脂の脂質クラス分析を行なった。

【方法と結果】

（１）炭素源2%、酵母エキス1%、ポリペプトン0.5%の液体培地（50%人工海水を含む）を用いて、各種炭素源が*Crypthecodinium* sp. D31株のDHA生産性に及ぼす影響について検討した。28℃、300 rpmで振とう培養後、菌体を回収し、ガスクロマトグラフィーにて脂肪酸組成を分析した。その結果、本菌は炭素源として糖類やアルコール類、特にグリセロールを用いた場合に高いDHA生産性を示すことがわかった。また、培地中の海水濃度50%、pH 5.5、培養日数10日間で最も高いDHA生産性を示すことを明らかにした。

（２）D31株の生産する油脂を薄層クロマトグラフィーを用いて分画し、それぞれの脂質クラスにおける脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで分析した。その結果、D31株の生産するDHAは約80%がリン脂質として存在しており、さらにそのうち約70%はホスファチジルコリンであることを明らかにした。既知のDHA高生産微生物ではDHAは主にトリアシルグリセロールの形で生産されており、D31株は希少なリン脂質DHAの生産源として期待できる。

docosahexaenoic acid, marine microorganism, phospholipids

講演番号：3B18a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ B校舎18会場

油糧微生物*Mortierella alpina* 1S-4の*ku80*遺伝子破壊株の作製

A *ku80* gene-disrupted strain from oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4

中谷 政人[1]、櫻谷 英治[1]、○菊川 寛史[1]、安藤 晃規[1,2]、清水 昌[3]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学ユニット、[3]京都学園大・バイオ環境）

Masato Nakatani[1], Eiji Sakuradani[1], ○Hiroshi Kikukawa[1], Akinori Ando[1,2], Sakayu Shimizu[3], Jun Ogawa[1] ([1]Division of Applied Life Sciences, Graduate school of agriculture, Kyoto University, [2]Research Unit for Physiological Chemistory, Kyoto University, [3]Faculty of Bioenvironmental Science, Kyoto Gakuen University)

【目的】近年、高度不飽和脂肪酸(PUFA)の持つ様々な生理機能が注目され、それらの安定供給が必要とされている。これまでに我々は、油糧微生物*Mortierella alpina* 1S-4によるPUFAの生産とPUFA生合成経路の解明を行ってきた。本菌での脂質代謝経路の解明及びより厳密な代謝制御によるPUFAの高生産を行うために、遺伝子ターゲッティング技術の開発が必要とされている。そこで、相同組換え頻度が向上した株を作製するために、本菌より非相同組換えに関わるKU80をコードする遺伝子をクローニングし、*ku80*遺伝子破壊株の作製を試みた。

【方法】まず、degenerate PCRにより、本菌の*ku80*遺伝子断片を取得し、inverse PCR法を用いて*ku80*遺伝子の全長配列を決定した。続いて、*ku80*遺伝子破壊用ベクターを構築し、パーティクルガン法により形質転換を行い、ウラシル栄養要求性を指標に形質転換株を取得した。得られた形質転換株をサザンブロット解析に供し、*ku80*遺伝子破壊株を選抜した。

【結果】*ku80*遺伝子の配列を決定した結果、本菌のKU80は837個のアミノ酸からなるタンパク質であると推定され、糸状菌*Aspergillus nidulans*, 酵母*Saccharomyces pombe*, *Homo sapiens* のKU80とそれぞれ30.1%, 27.3%, 25.1% の相同性を示した。続いて、パーティクルガン法により得られた形質転換株77株をサザンブロット解析に供したところ、1株において染色体上の*ku80*遺伝子座での相同的遺伝子破壊を確認した。

Mortierella alpina 1S-4, homologous recombination, *ku80* gene disruption

講演番号:3B18a03
講演日時、会場:3月24日09:22～ B校舎18会場

アミノグリコシド系抗生物質ミノサミノマイシン生合成遺伝子クラスターの解析

Genetic analysis of the biosynthetic cluster of minosaminomycin, an aminoglycoside antibiotic

○春日 和、辻本 敏博、桑原 直哉、小林 正之、上松 仁[1]、五十嵐 雅之[2]、小嶋 郁夫（秋田県大生資科・応生科、[1]秋田高専、[2]微化研）

○Kano Kasuga, Toshihiro Tsujimoto, Naoya Kuwahara, Masayuki Kobayashi, Hitoshi Agematsu[1], Masayuki Igarashi[2], Ikuo Kojima (Akita Pref. Univ., [1]Akita Natl. College Technol., [2]Inst. Microbiol. Chem.)

【目的】カスガマイシン(KSM)は放線菌 *Streptomyces kasugaensis* により生産されるアミノグリコシド(AG)系抗生物質で、稲のイモチ病用農薬として国内外で広く用いられている。我々は *S. kasugaensis* A1R6 より約 20kb の KSM 生合成遺伝子クラスターをクローン化し、異種放線菌 *Streptomyces lividans* での KSM 生産に成功している。一方、*Streptomyces* sp. MA514-A1 株が生産する AG 系抗生物質ミノサミノマイシン(MSM)は、AG 部分の化学構造が KSM に類似しており、抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* に抗菌活性を示す。我々は MSM と KSM の両生合成遺伝子群を組み合わせて両物質の構造を合わせもつ新規 AG 系物質を創生することを目的として、MSM 生合成遺伝子群のクローン化と遺伝子解析を行った。 【方法・結果】(i) MSM 生合成遺伝子クラスターのクローン化：MSM には KSM と共通のアミノ糖物質カスガミンに加え、アミノ酸側鎖部分に enduracididine (*Streptomyces fungicidicus* が生産するペプチド系抗生物質に含まれる特殊アミノ酸)が含まれている。そこで、カスガミンと enduracididine の生合成に関与する遺伝子群を増幅するための縮重プライマーを設計し、これを用いて MSM 生産菌のゲノム DNA から *kasR* および *endP* 相同遺伝子の一部を PCR 増幅した。MSM 生産菌ゲノム DNA のコスミドライブラリーを構築して *kasR* および *endP* 相同遺伝子を共に含む 6 クローンを単離した。その 2 クローンの約 31 および 38kb の DNA 断片(pMSM4 および pMSM5)を *S. lividans* に導入すると *M. smegmatis* に対する抗菌物質を生産したため、これらクローン化断片に MSM 生合成遺伝子群のクラスター全域が含まれていると考えられた。 (ii) MSM 生合成遺伝子クラスター解析：pMSM4 の 31kb DNA 断片の全塩基配列を決定し、FramePlot と BLASTP により遺伝子を検索した。その結果、本 DNA 断片(全長 32,773bp)から 23 遺伝子が見出された。この中には、1)KSM 生合成遺伝子群(*kasA*～*E1*, *kasJ*)の 6 相同遺伝子と *kasQ* 同様のエピメラーゼ推定遺伝子、2)*S. fungicidicus* の enduracididine 生合成遺伝子群(*endPQR*)の 3 相同遺伝子、3)非リボソーム性ペプチド合成酵素遺伝子群、4)KSM 耐性遺伝子 *kac* の相同遺伝子、および物質排出に関連する遺伝子、などが含まれていた。以上の遺伝子群の推定機能に基づき、MSM の生合成経路を推定した。 (iii) MSM 生合成遺伝子クラスターの導入による抗生物質の生産：*S. lividans* に MSM 生合成遺伝子クラスターを導入した株が生産する抗菌活性物質について LC-TOFMS により分析したところ、MSM とアセチル化 MSM が検出された。アセチル化 MSM はクラスター内の *kac* 相同遺伝子の発現により生じたと考えられる。

aminoglycoside, antibiotic, kasugamycin

講演番号：3B18a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ B校舎18会場

Streptomyces avermitilis SUKA株を宿主としたシキミ酸経路由来二次代謝産物の異種生産

Heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolite derived from shikimate pathway in engineered *Streptomyces avermitilis*

○小松　護、尾仲宏康[1]、 Mervyn J. Bibb[2]、池田治生（北里大・北里生命研、[1]富山県大、[2]John Innes Centre U.K.）

○Mamoru Komatsu, Hiroyasu Onaka[1] Mervyn J. Bibb[2] and Haruo Ikeda (Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, [1]Toyama Prefectural University and [2]John Innes Centre U.K.)

我々は、avermectin の工業生産菌である *S. avermitilis* の大規模染色体欠失変異体(SUKA)を宿主とした異種微生物由来の二次代謝産物生産について検討してきた。特に、*S. griseus* IFO13350 由来の streptomycin 生合成遺伝子クラスターならびに *S. clavuligerus* ATCC 27064 由来の cephamycin C 生合成遺伝子クラスターの異種発現を行った結果、SUKA は生合成遺伝子群の供給元の微生物を超える高い物質生産能力を保持することが示された(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:2646-2651, 2010)。SUKA は avermectin をはじめとする内在性の主生産物生合成遺伝子群を欠失しており、二次代謝産物の前駆体となる一次代謝産物や ATP や NAD(P)H などのエネルギーが導入した異種微生物由来の二次代謝産物生合成経路へ供給されるため、効果的な物質生産を行うことができると判断される。これまで、アミノグリコシド、非リボソーム依存性ペプチド、ポリケチド(I 型ならびに II 型 PKS) ならびにテルペン化合物において、SUKA を宿主とした異種発現について検討を行い、それぞれの化合物に対し充分な物質生産能力を有していることを示した。さらに我々は、シキミ酸経路に由来する二次代謝産物の生産について検討した。本発表では、SUKA17 株(*Δsav71-1287 Δolm-cluster Δpt1-cluster ΔgeoA Δsav7456-7491*)を宿主とした、rebeccamycin (*Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243)ならびに chloramphenicol (*S. venezuelae* ATCC 10712)の生産について報告する。

Streptomyces avermitilis, heterologous expression, shikimate pathway

講演番号：3B18a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ B校舎18会場

沖縄の自然界からの乳酸菌の単離および乳酸菌代謝産物の機能性の探索

Isolation of lactic acid bacteria from the nature of Okinawa and search of the functionality of their metabolites

○森田 この美、柳 久美子[1]、比嘉 瞳[2]、金本 昭彦[3]、要 匡[1]、池松 真也（沖縄高専・生物資、[1]琉球大・医、[2]第一三共、[3]オーピーバイオファクトリー）

○Konomi Morita, Kumiko Yanagi[1], Hitomi Higa[2], Akihiko Kanamoto[3], Tadashi Kaname[1], Shinya Ikematsu (Okinawakosen, [1]Ryukyudai, [2]Daiichi-Sankyo, [3]OPbio factory)

【目的】本研究では，多くの発酵食品等に利用されており，近年，プロバイオティクス作用が注目されている乳酸菌に着目し，沖縄県の植物，特に果実を中心に乳酸菌を単離して，その機能性を探索することを目的とした．乳酸菌を用いた発酵乳の機能性として，整腸作用や抗酸化作用，血圧降下作用などが報告されている．沖縄の強い日差しの中で生息している微生物や植物には，紫外線に対する強固な防御システムが備わっている可能性を考慮し，本研究では，乳酸菌の機能性として，チロシナーゼ活性阻害作用及び抗酸化作用に注目した．さらに，機能性を確認した乳酸菌を用いて乳発酵物を調製することにより，沖縄，南国のイメージを活かした，付加価値のある乳酸菌を提供し，沖縄の発酵食品産業や化粧品産業の発展に寄与することを目指した．
【方法】（乳酸菌の単離）：沖縄の環境中及び沖縄県で生育，収穫された果実から乳酸菌を単離するため，乳酸菌を単離したい沖縄県の果実等を自ら沖縄の自然界に仕掛け，回収した．滅菌水で段階希釈を行い，MRS(+$CaCO_3$)Agar培地で嫌気培養後，ハロー形成したコロニーのうちカタラーゼ陰性のものを乳酸菌として単離した．（代謝産物の機能性探索）：単離した乳酸菌のMRS broth培地中代謝産物及びパイナップル果汁発酵物について，①チロシナーゼ活性阻害作用，②抗酸化作用を評価した．（乳酸菌の分類）：16S rRNA領域のシークエンスを行った．（乳発酵物の調製）：単離乳酸菌及び*Lactobacillus brevis*を用いて乳発酵物を調製し，発酵特性を比較した．
【結果】本研究の成果として，パイナップルから単離した乳酸菌（IM-1株）の代謝産物に高いチロシナーゼ阻害作用を見出した．また，マンゴーから単離した乳酸菌（IM-2株）の代謝産物にも，チロシナーゼ阻害作用を確認した．高いチロシナーゼ阻害作用を示したIM-1株は，パイナップルから単離されたため，パイナップルの特定成分がIM-1株の代謝産物の性質に影響を与える可能性を考え，パイナップル果汁をIM-1株で乳酸発酵し，その発酵物について，さらに機能性を評価した．その結果，パイナップル果汁のIM-1株発酵物は，パイナップル果汁を含まない通常培地における代謝産物よりも高いチロシナーゼ阻害作用および抗酸化作用を示した．単離した乳酸菌を同定するため，16S rRNA領域のシークエンス配列解析および走査型電子顕微鏡を用いた形態観察を行った．その結果，パイナップルから単離したIM-1株は乳酸桿菌の*Lactobacillus paracasei*，マンゴーから単離したIM-2株は乳酸球菌の*Enterococcus faecium*と同定された．さらに，機能性が確認されたIM-1株を用いて乳発酵物を調製した結果，IM-1株は良好な発酵特性を示したことから，IM-1株が発酵乳製品に利用可能な乳酸菌であることを確認した．

lactic acid bacteria, tyrosinase inhibition, antioxidation

講演番号：3B18a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ B校舎18会場

γ-アミノ酪酸資化欠損パン酵母変異株を用いたパン生地発酵

Dough fermentation using a baker's yeast deficient for γ-aminobutyric acid assimilation

○安藤 聡、中村 敏英（農研機構・食総研）
○Akira Ando, Toshihide Nakamura (Natl. Food Res. Inst.)

【目的】γ-アミノ酪酸（GABA）は非タンパク性アミノ酸の一種であり、血圧上昇抑制作用を示すため食品機能性の観点から注目されている。清酒醸造分野では、もろみ中のGABAが酵母によって消費されてしまう問題が指摘されおり、GABA資化性変異株を利用した醸造によるGABA富化の報告がある。他の発酵食品おいても同様な問題が懸念されるが、特にパン生地のような多量の酵母を含む発酵食品では、酵母によるGABAの消費は更に顕著なものになると予想される。そこで、本研究ではパン類におけるGABA含量の維持・増強を目的として、2倍体パン酵母より取得したGABA資化欠損変異株（GABA資化欠損株）についての諸性質を調べると共に、パン生地発酵への適応可能性について検討した。
【方法】GABA資化欠損株の変異遺伝子座をPCR増幅し、塩基配列を決定した。また、変異遺伝子との機能的関連が予想された窒素代謝遺伝子の発現量をリアルタイムRT-PCRにより定量した。工業的パン酵母生産を模した廃糖蜜による流加培養でGABA資化欠損変異株を培養し、パン生地発酵への適応性を検討した。また、本株を用いて発酵したパン生地中における遊離アミノ酸をアミノ酸分析計を用いて定量した。
【結果】我々は、GABA資化欠損株が窒素代謝関連遺伝子の転写制御に関わる転写因子をコードする*DAL81*遺伝子に変異を有することを既に明らかにしている。GABA資化欠損株および野生株（パン酵母2倍体）の*DAL81*遺伝子領域の塩基配列を決定したところ、GABA資化欠損株は355番目のコドン がストップコドン（CTG→TAG）に変異していることが明らかとなった。また、細胞膜上のアンモニウムトランスポーターをコードする*MEP2*、同じく細胞膜上の尿素のトランスポーターをコードする*DUR3*、GABAトランスアミナーゼをコードする*UGA1*について発現量を定量したところ、GABA資化欠損株では*MEP2*で42%、*DUR3*で3%、*UGA1*で18%にまで発現量が低下していた。本欠損株は、アンモニア態窒素代謝と比べて尿素およびGABAの代謝に重篤な異常を有している可能性が考えられる。次に、流加培養した菌体を用いてパン生地発酵を行ったところ、野生株と比べてGABA資化欠損株は著しく低い発酵力を示した。その原因として、菌体培養あるいは生地発酵中におけるGABA資化欠損株が利用可能な窒素源の枯渇が考えられたため、流加糖蜜あるいは生地への硫酸アンモニウムの添加が生地発酵に及ぼす影響を検討した。その結果、本欠損株は流加糖蜜に硫酸アンモニウムを添加することによって野生株に匹敵する発酵力を示すことが明らかとなった。各株を用いて発酵したパン生地中の遊離アミノ酸を定量したところ、GABA資化欠損株を用いた場合のみGABAが検出された。以上の結果から、パン類のGABA富化に本欠損株を利用することが有効である可能性が示された。

GABA, baker's yeast, dough fermentation

講演番号:3B18a07
講演日時、会場:3月24日10:16～ B校舎18会場

Streptomyces blastmyceticus 由来(－)-indolactam V 生合成遺伝子の放線菌における発現
Expression of (－)-indolactam V biosynthetic genes from *Streptomyces blastmyceticus*

○奥田　治子、谷　修治、炭谷　順一、入江　一浩[1]、林　英雄、川口　剛司　(阪府大院・生環科、[1]京大院・農)
○Haruko Okuda, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Kazuhiro Irie[1], Hideo Hayashi, Takashi Kawaguchi　(Grad Sch Life & Env Sci, Osaka Pref Univ, [1] Grad Sch Agr, Kyoto Univ)

【目的】発ガンプロモーター teleocidin 類の基本骨格 (-)-indolactam V (IL-V) は、インドール環の 3 位から 4 位が閉環した 9 員環ラクタムという特異な構造を有している。最近の報告により IL-V は、ヒト ES 細胞や iPS 細胞をインスリン産生細胞へ分化誘導することが明らかとなった。そこで IL-V の効率的な大量合成が望まれるが、有機合成では、IL-V 合成の鍵となるインドール環 4 位における閉環反応の制御が困難なため、多数の合成ステップを要する。本研究室では、培養上清中に IL-V を産生する放線菌 *Streptomyces blastmyceticus* より teleocidin 生合成に関与すると推定される遺伝子群を取得した。そこで IL-V の大量調製を行うため、IL-V 生合成に関与すると考えられる遺伝子の発現を試みた。
【方法と結果】 安定同位体を用いた生合成中間体の構造解析や、取得した生合成に関与すると考えられる遺伝子群の配列解析から、IL-V 生合成経路は、IL-V 前駆体の合成反応と、その閉環反応の二段階から成ると推測されている。まず *tcnA* にコードされる nonribosomal pepetide synthetase によって、L-valine、L-tryptophan、*S*-adenosyl-L-methionine から、 IL-V 前駆体 *N*-methyl-L-valyl-L-tryptophanol (NMVT) が合成されると推測されている。続いて、*tcnB* にコードされる機能未同定のタンパク MbtH と、*tcnC* にコードされるシトクロム P450 モノオキシゲナーゼのいずれか、またはその両者が、NMVT のインドール環 3 位から 4 位への閉環反応に関与し、IL-V が合成されると予想されている。そこで閉環反応に関与する遺伝子を同定するために *tcnB*、*tcnC* を大腸菌で発現させ、*in vitro* で IL-V を合成することを試みた。しかしタンパクの生産は見られるものの、活性を有する P450 を取得することはできなかった。次に、放線菌 *Streptomyces lividans* に *tcnABC* を導入し、*in vivo* で IL-V を生産させることを試みた。*tcnABC* の三遺伝子を、放線菌発現プラスミド pTONA5 [1)]に挿入し、これを *S. lividans* にプロプラスト PEG 法で導入した。形質転換体の培養上清の酢酸エチル抽出物を、TLC で分析し結果、形質転換体で IL-V と考えられるスポットを検出したことから、導入した *tcnABC* 遺伝子が IL-V 生合成に関与していることが明らかとなった。IL-V 生合成に関わる各遺伝子の役割を明らかにしていく予定である。

1) T. Hatanaka, *et al., Protein Expr Purif.* **62**, 244-248 (2008)

indole alkaloid, indolactam V, expression

講演番号：3B18a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ B校舎18会場

Cyclo (Leu-Phe) oxidase変換反応を受ける糸状菌由来二次代謝産物の検出
Detection of fungal secondary metabolites which can be converted by cyclo(Leu-Phe) oxidase

○高橋 佳子、福田 優、仁戸田 照彦、神崎 浩（岡山大院・自然科学）
○Keiko Takahashi, Yu Fukuda, Teruhiko Nitoda, Hiroshi Kanzaki (Okayama Univ.,GSNST)

【目的】アミノ酸2分子から生成する環状ジペプチド類 (CDPs)は構成するアミノ酸の種類や種々の修飾により多様な活性を示すことが知られている。当研究室ではこれまでに放線菌 *Streptomyces albulus* KO23株からCDPsを脱水素体へ変換する反応を触媒するcyclo(Leu-Phe) oxidase (CFL oxidase)を見出した。本酵素のCDPsに対する幅広い基質特異性と，生成物の脱水素型CDPsが共役二重結合を有すことで基質のCDPsから特徴的なUV吸収の変化が見られることからCFL oxidaseによる変換反応とDAD-HPLCを組み合わせてCDPsの検出法を確立してきた[1)]。この方法を用いて乳酸菌および鰹節生産糸状菌の二次代謝産物中にcyclo(Phe-Pro)，cyclo(Pro-Tyr) や修飾型CDPであるneoechinulin Aを検出しており，本検出法の有効性が分かっている。また，neoechinulin Aと同様に修飾型CDPsであるphenylahistinの脱水素型は強力な細胞分裂阻害活性を示すことから修飾型CDPsの有用性が期待されている。CFL oxidaseによって反応が進行する化合物はCDPsや修飾型CDPsのような有用な化合物であると考えられるため，微生物培養抽出物からCFL oxidaseによって反応が進行する二次代謝産物の探索を行った。
【方法】糸状菌は多様な構造や生理活性を持つ二次代謝産物を生産することで知られ，phenylahistinやneoechinulin Aなどの修飾型CDPsを生産する。また，培地によって生産する二次代謝産物が異なることが予想されたため，糸状菌99菌株をPDB，KP，Abeの3種類の培地で振とう培養し，得られた培養物の酢酸エチル抽出物をCFL oxidaseを用いた変換反応に供した。変換反応には*Streptomyces albulus* KO23株をKP培地で培養後，菌体破砕によって得られた無細胞抽出液をPhenyl-Sepharoseカラムに供して得られた部分精製酵素を用いた。DAD-HPLC分析により酵素無添加区と酵素添加区を比較して，CFL oxidaseによって減少するピークあるいは新たに出現するピークの存在とそれらの化合物のUV吸収スペクトルを確認し，有用化合物の探索を行った。
【結果】HPLCクロマトグラムから*Aspergillus sojae* 2菌株と*Penicillium janthinellum* 1菌株と*Mucor petrinsularis* 1菌株の4菌株がCFL oxidase変換反応によってピークが増減する化合物を生産していることを見出した。これらの試料にはCFL oxidaseの反応基質となって減少する化合物を含むものや，生成物として新たに出現する化合物を含むものが存在した。それぞれの化合物のUV吸収スペクトルは全て異なっており，これまでに当研究室で確認しているCDPsと似た形状のUVスペクトルを示すものや全く異なる形状を示すものなど様々であった。上に述べた4菌株のうち1菌株の*Aspergillus sojae*はCFL oxidaseの反応基質となって減少する化合物を生産していた。この化合物については既に精製を行っており今後構造解析を行う予定である。その他の化合物についても新規CDPsである可能性が示唆されるため現在精製を試みている。

[1)]P.Arunrattiyakorn, T.Nitoda & H. Kanzaki, *Peptides*, **27**, 633 (2006)

cyclic dipeptides, diketopiperazines, bioconversion

講演番号：3B18a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ B校舎18会場

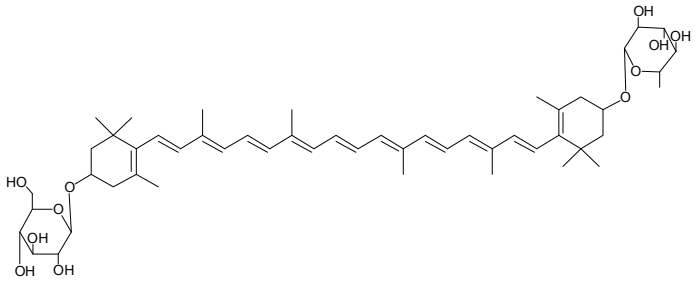
*Pantoea ananatis*由来の6個のカロテノイド生合成遺伝子を発現した大腸菌を用いた新規配糖体カロテノイドの創製

Production of a novel glycosyl carotenoid using *Escherichia coli* that expresses six carotenoid biosynthesis genes from *Pantoea ananatis*

○大澤 絢子、伊東 桂衣、内山 愛、鈴木 真衣、Seon-Kang Choi[1]、三沢 典彦[2]、新藤 一敏
（日女大家政・食物、[1]Gangneung BCIT、[2]石川県大・生資研）
○Ayako Osawa, Kei Ito, Ai Uchiyama, Mai Suzuki, Seon-Kang Choi[1], Norihiko Misawa[2], Kazutoshi Shindo (Nichijodai, [1]Gangneung BCIT, [2]Ishikawakendai)

【目的】カロテノイドは自然界に広く分布する脂溶性色素で、植物、藻類、細菌、海洋動物等から750種以上が報告され、抗酸化活性を始め優れた生理活性を持つものも数多く報告されている。現在我々は新しい構造を有するカロテノイドを効率的に創製するため、あるいは活性を検討するに十分な量の希少カロテノイドを調製するため、カロテノイド生合成遺伝子を組み込んだ大腸菌でのカロテノイド生産研究を実施している。有用な生理活性を有するカロテノイドは食品添加剤やサプリメント等への活用が大いに期待できるが、低極性であることから、水溶性の溶媒や化合物への添加等の際に溶解性の面で問題が生じることも多い。そこで本研究では、zeaxanthin diglucosideを産生する*Pantoea ananatis*由来のカロテノイド生合成遺伝子群（*crtE*、*crtB*、*crtI*、*crtY*、*crtZ*、*crtX*）を組み込んだ大腸菌を用いて、希少な高極性カロテノイドを効率的に創製する研究を実施した。既に本組み換え大腸菌がzeaxanthin、zeaxanthin monoglucosideおよびzeaxanthin diglucosideを生産することは報告済である*。今回、微量のためこれまで構造解析不能であったminor peakについて単離精製・構造決定を実施した結果、zeaxanthin両末端のβ-イオノン環水酸基に異なる2種の糖「glucose及びquinovose (6-deoxyglucose)」が導入された新規カロテノイド（下図）を同定したので報告する。

【方法と結果】組換え大腸菌を2×YT培地を用いて30℃, 150 rpmで24 h培養した（30 L）。菌体内で産生されたオレンジ色素を有機溶媒抽出し、各種クロマトグラフィーにより、最終的にODS HPLCカラム（Pegasil ODS, 99% MeOH）でdiglycosyl carotenoids領域に溶出されるminor peakを単離した。本物質及びそのアセチル化物を構造解析（HR-MS, NMR）した結果、新規カロテノイド3-glucosyl-3’-quinovosyl-zeaxanthin（1.0 mg）と同定した。



*Journal of Bacteriology, Vol. 172, No. 12, 1990, P.6704-6712, N. Misawa *et al.*

Erwinia uredovora, zeaxanthin (di)glycoside, 3-glucosyl-3’-quinovosyl-zeaxanthin

講演番号：3B18a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ B校舎18会場

希少放線菌*Actinoplanes missouriensis*が生産するカロテノイドの構造決定

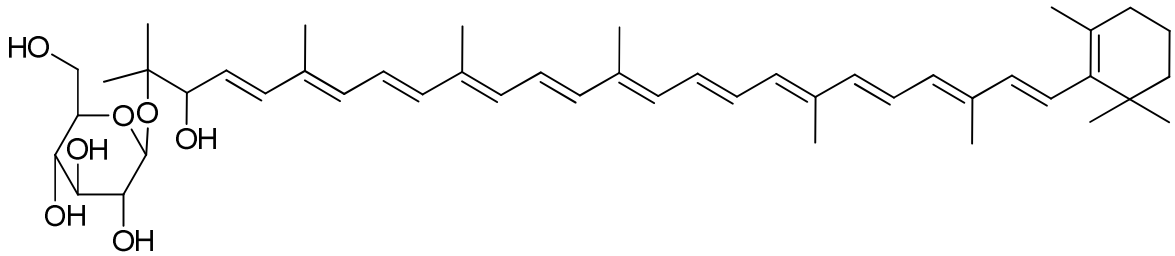
Structure elucidation of a carotenoid produced by *Actinoplanes missouriensis*

○野本　竜平[1,2]、大澤　絢子[3]、新藤　一敏[3]、松井　美里[1]、泉川　美穂[2]、金　昭ヨン[1]、高木　基樹[2]、新家　一男[4]、大西　康夫[1]（[1]東大院・農生科、[2]JBIC、[3]日女大家政・食物、[4]AIST）

○Ryohei Nomoto[1,2], Ayako Osawa[3], Kazutoshi Shindo[3], Misato Matsui[1], Miho Izumikawa[2], Soyoung Kim[1], Motoki Takagi[2], Kazuo Shin-ya[4], Yasuo Ohnishi[1] ([1]Tokyo Univ., [2]JBIC, [3]Japan Women's Univ., [4]AIST)

【目的】*Actinoplanes missouriensis*は液体培地、固体培地のいずれで培養した時にも菌糸がオレンジ色を呈するが、この特徴的な色がどのような化合物に由来するのかは長らく不明であった。我々の研究グループは昨年度の本大会において、この菌糸の色素成分がカロテノイドの一種であること及び、その生産が光照射によって誘導されることを発表した（2011年度　日本農芸化学会大会講演要旨集　p. 248）。今回、オレンジ色色素を大量に生産する自然変異株（OR株）から、本色素を単離精製し、その構造を決定することを目的に実験を行った。

【方法と結果】光照射条件で培養した*A. missouriensis*野生株とOR株の培養菌体抽出物をHPLCにより分析し、両者が主要に生産するカロテノイドが同一物質であることが確認できたため、目的物の単離精製はOR株を用いて実施することにした。OR株を10 LのBennett-Maltose培地を用いて30℃で3日間培養した。回収した菌糸よりオレンジ色色素を有機溶媒抽出し、各種カラムクロマトグラフィーによる精製を行った結果、6.0 mgの純品を得た。本化合物およびそのアセチル化物をHR-MS、NMRにより構造解析した結果、本化合物をγ-carotene様構造に1分子のグルコースと水酸基が付加したカロテノイドphleixanthophyll（下図）と同定した。phleixanthophyllは*Mycobacterium phlei*で生産されるカロテノイドとして報告されている。抗酸化能を試験するため一重項酸素消失活性を測定したところ、本カロテノイドは高い抗酸化能が報告されているastaxanthinと同程度の活性を有していることを明らかにした。



Keyword1　*Actinoplanes missouriensis*,　Keyword2　phleixanthophyll, Keyword3　carotenoid

講演番号：3B18a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ B校舎18会場

Analysis of gene cluster involved in production of the circular bacteriocin leucocylicin Q by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401

○Fuqin Mu[1] , Yoshimitsu Masuda[1], Hiroshi Ono[3], Hiroshi Kitagawa[3], Haruo Ito[3], Takeshi Zendo[1], Jiro Nakayama[1], Kenji Sonomoto[1,2] ([1]Fac. Agr., [2]Bio-Arch. , Kyushu Univ., [3]R & D Laboratories, Tokai Pickling Co. Ltd., Japan)

【Subject】

Leucocyclicin Q (LcyQ), a circular bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401 (lactic acid bacteria), is active against a unique range of Gram-positive bacteria, such as the genera *Lactococcus* and *Enterococcus.* Furthermore, LcyQ had stronger inhibitory activity against some strains than nisin A [(1)]. The cyclization of this bacteriocin involved a head-to-tail peptide bond formation between the third and last amino acids of the precursor peptide. Although circular bacteriocins constitute one of the most attractive groups of inhibitors described to date, their biosynthesis mechanism is still little known. Therefore, the aim of this study is to clarify LcyQ's biosynthesis mechanisms.

【Methods and results】

1. DNA sequencing and analysis of the region flanking the strucure gene of *lcyQ*.

To get the flanking region of the structural gene, inverse PCR was performed. A region of 3.7 kb surrounding *lcyQ* has been sequenced and shown to contain 5 *orf*s, including *lcyQ.* The identities of derived protein sequences were analyzed. The gene products, Orf3 and Orf4, both showed some degree of similarities to proteins involved in the production of bacteriocins.

2. Cloning of the LcyQ's determinant.

The plasmids which contain *orf*s were constructed seperately, and then introduced into the competent cell of *Lactococcus lactis* NZ9000. Colonies obtained after transformation were seeded onto MRS plates with serial diluted bacteriocin LcyQ to screen for its immunity. *Lac. lactis* NZ9000 expressing *orf3* showed higher resistance against LcyQ than the control strain with the empty vector. These results indicate that *orf3* is involved in immunity against LcyQ.

3. Gene mutation of *orf4* in *Leu. mesenteroides* TK41401.

Gene mutation of *orf4* was constructed in the original strain. This mutant showed no antibacterial activity outside of the cell, which means that *orf4* is related to the transporter of LcyQ.

Keywords: lactic acid bacteria, circular bacteriocin, biosynthesis mechanism.

Reference: (1) Y. Masuda, F. Mu, *et al*., AEM, 77:8164-8170, 2011.

講演番号:3B18a12
講演日時、会場:3月24日11:21～ B校舎18会場

Weissellicins YM の環境応答型生産制御機構の解明

Analysis on weissellicins Y and M production behavior corresponding to culture conditions

○益田時光[1]、善藤威史[1]、PEREZ Rodney[1]、園元謙二[1, 2]
([1]九大院・農、[2]九大バイオアーク)
○Yoshimitsu Masuda[1], Takeshi Zendo[1], Rodney Perez[1], Kenji Sonomoto[1, 2]
([1]Fac. Agric., [2]Bio-Arch., Kyushu Univ.)

【目的】バクテリオシン生産乳酸菌の中には、一菌株が複数のバクテリオシンを生産するマルチプルバクテリオシン生産菌がいくつか報告されており、これらの生産菌は巧みな制御機構によって複数のバクテリオシンの生産を環境の変化に対応してコントロールしていると考えられる。高菜漬けの漬物樽より単離された乳酸菌、*Weissella hellenica* QU 13 は、新奇リーダレスバクテリオシンである weissellicin Y と weissellicin M を生産する(1)。2 種類の培地、MRS 培地と APT 培地を用いて培養を行ったところ、weissellicin Y と M の生産挙動が異なっていた。本研究は、培地の違いによるこれらの生産挙動の違いをタンパク定量解析と転写解析の両面から解明することを目的とした。
【方法・結果】MRS に比べて APT 培地にはチアミンが多く含まれており、このチアミンは *Weissella* 属を含むヘテロ発酵型の乳酸菌の生育を促進することが知られている。事実、APT 培地での *W. hellenica* QU 13 の生育は MRS に比べて良好であった。次に、各培養液上清中の weissellicin Y と M を疎水性相互作用クロマトグラフィーによる前処理後、LC/MS によって定量した。その結果、weissellicin Y の MRS 培地における生産量は APT の場合よりも明らかに高かったのに対して、weissellicin M では逆であった。また、MRS 培地にチアミンを加えることで *W. hellenica* QU 13 の生育が向上した一方で、weissellicin Y の生産は抑制され、weissellicin M の生産に変化はなかった。この結果より、APT 培地ではチアミンが weissellicin Y の生産を抑制しているが、weissellicin M の生産の促進には関与していないことが示された。また、各構造遺伝子(*welY, welM*)の対数増殖期における転写挙動を real time RT-PCR によって解析したところ、*welY* の転写量は MRS 培地では対数増殖期初期をピークに徐々に減少していたが、APT では一定の低い転写量を維持していた。一方、welM は MRS 培地では同様に減少していたが、APT では逆に転写量が増加しており、それぞれの生産が個別に転写レベルで制御されていることが示唆された。

(1)Y. Masuda *et al.*, J. Appl. Microbiol., in press (2011)

lactic acid bacteria, multiple bacteriocin production, environmental response

講演番号:3B18a13
講演日時、会場:3月24日11:32～ B校舎18会場

多成分バクテリオシンenterocins NKR-5-3の菌体外分泌機構の解明

Elucidation of secretion mechanism of multiple bacteriocins, enterosins NKR-5-3

○石橋 直樹[1]、姫野 康平[1]、益田 時光[1]、PEREZ Rodney[1]、善藤 威史[1]、WILAIPUN Pongtep[2]、中山 二郎[1]、園元 謙二[1,3]（[1]九大院・農、[2]カセサート大、[3]九大・バイオアーク）

○Naoki Ishibashi[1], Kohei Himeno[1], Yoshimitsu Masuda[1], Rodney Perez[1], Takeshi Zendo[1], Pongtep Wilaipun[2], Jiro Nakayama[1], Kenji Sonomoto[1,3]（[1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Kasetsart Univ., [3]Bio-Arch, Kyushu Univ.）

【目的】バクテリオシンは、リボソーム上で合成される抗菌性ペプチドであり、その構造遺伝子及び生合成遺伝子群は一連のクラスターを形成している。タイの発酵魚から分離された*Enterococcus faecium* NKR-5-3 は，5 つのバクテリオシン様ペプチド（enterocins NKR-5-3A，B，C，D，Z）を生産しており，そのうち enterocin NKR5-3B 以外の各ペプチドの構造遺伝子は，近接した約 13 kb の遺伝子領域にコードされている。本研究では,多成分バクテリオシン enterocins NKR-5-3 の菌体外分泌機構の解明を目指し、菌体外分泌に関与する遺伝子の特定およびその機能解析を試みた。

【方法】バクテリオシンの菌体外分泌には、専用のトランスポーターが一般的に必要とされているが、多成分のバクテリオシンを生産する本菌株の遺伝子クラスター内には，トランスポーターと推定される遺伝子は唯一*orf6*のみであった。そこで、一般的な乳酸菌内で構成的に働くプロモーター（P_{32}）を有するプラスミドを用いて、*orf6*と各バクテリオシン構造遺伝子を共発現し、菌体外分泌能を評価した。また、*orf6*を含まないプラスミド、あるいは本菌の*orf6*破壊株を構築することで、多成分バクテリオシン分泌に関与する遺伝子を特定した。

【結果】P_{32}プロモーター制御下で*orf6*と各バクテリオシン構造遺伝子を共発現したところ、4種類のペプチド（enterocins NKR-5-3A，C，D，Z）が菌体外に分泌されることが明らかになった。一方、*orf6*を含まない場合には分泌が確認されなかった。また、*orf6*破壊株の培養液上清の抗菌活性は、野生株に比べて顕著に低いことから、enterocin NKR-5-3Bを除く、4つのペプチドの菌体外分泌にORF6が関与することが強く示唆された。よって、ORF6は構造の異なるバクテリオシンを同時に分泌する、非常にまれなトランスポーターであると考えられた。現在、*orf6*破壊株を用いた相補実験により菌体外分泌能が回復するのかを検討している。

Enterococcus faecium, multiple bacteriocins, transporter

講演番号:3B18p02
講演日時、会場:3月24日14:00～ B校舎18会場

新規タンパク質分泌系であるTatシステムを標的とした阻害剤の探索

Screening of an attenuator active against the novel Tat protein secretion system

○秋葉 敬斉、安藤 太助、中江 太治[1]、磯貝 恵美子、米山 裕(東北大院・農、[1]北里研・抗感染症)
○Keiji Akiba, Tasuke Ando, Taiji Nakae[1], Emiko Isogai, Hiroshi Yoneyama (Tohokudaiin, [1]Kitasatoken)

【目的】ペニシリンの発見以降多くの抗生物質が開発され、重篤な細菌感染症は制御しうる病となった。しかしながら過剰な抗生物質の使用により、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)、さらに緑膿菌やアシネトバクターなどの多剤耐性グラム陰性菌が近年出現し公衆衛生上の大きな問題となっている。これらの細菌感染症の脅威に対抗するためには新規抗菌剤の開発が必須である。新薬の開発にあたり、細菌の病原因子は基本的に生存に必須ではないことから、その機能を阻害する薬剤に対する耐性菌は出現し難いと考えられる。この観点から、我々はこれまで病原因子の分泌に関与する新規タンパク質分泌系である Tat (twin-arginine translocation)系に注目し、緑膿菌の Tat 系を標的とするリード化合物のスクリーニング系を構築してきた。この評価系は、Tat 分泌系の生物学的な機能であるタンパク質の分泌を本菌の多剤排出ポンプ MexAB-OprM の外膜コンポーネント OprM をレポーターとして捉えることが出来るシステムである。本研究ではこのシステムを用いて Tat 系阻害剤の探索を試みることにした。

【方法】緑膿菌のホスホリパーゼC (PlcH)は、Tat系を介して分泌されるために必要な特徴的なシグナル配列を有する。そこで、OprMのSec系依存性シグナル配列をPlcHのシグナル配列と交換したキメラOprM遺伝子を構築し、染色体上の*oprM* 遺伝子破壊株に導入した形質転換体を作製した。指標薬剤としてアズトレオナム(AZT)を用いたスクリーニング系の条件を設定するために、種々の濃度のAZTを含むミュラーヒントン寒天培地にキメラOprMを発現する指示菌を接種し37℃にて一夜培養して、その生育が認められるAZTの最大濃度を調べた。次に、この生育限界濃度のAZT(1μg/ml)存在下で指示菌を混合した平板を作製し、その寒天培地上に化合物ライブラリー(ChemBridge社)を2μlスポットし37℃で一夜培養した。もしTat系阻害活性を有する化合物が存在すれば、その化合物周辺の細胞はキメラOprMの発現が阻害され薬剤に対して高感受性となることから、生育阻止ゾーンが形成されることが期待できる。

【結果】本スクリーニング系はTat分泌系の機能をOprMのTat系を介するトランスロケーション、すなわち多剤排出ポンプMexAB-OprMの機能的発現をモニターするシステムである。本評価系においてキメラOprMがSec系ではなく、Tat系を介して機能的に発現することを検証するため、Tat系の機能に必須な*tatC* 遺伝子を破壊した二重破壊株(*tatC oprM*)を構築した。この二重変異株を用い解析を行った結果、キメラOprMはTat系依存的に機能発現することが明らかとなった。現在約9,000種類の化合物ライブラリー(ChemBridge社)を用いてスクリーニングを実施している。

Twin-arginine translocation system, Multidrug efflux pump, Antibiotics

講演番号：3B18p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ B校舎18会場

好アルカリ性細菌*Bacillus pseudofirmus* OF4株における細胞表層タンパク質の生理学的解析

Physiological analysis of surface layer proteins of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4.

○藤浪　俊、伊藤政博（東洋大　バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター）
○Shun Fujinami and Masahiro Ito (Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo Univ.)

【目的】好アルカリ性細菌とは、pH9以上の高アルカリpH環境下で良好に生育する細菌である。好アルカリ性細菌*Bacillus pseudofirmus* OF4株では、H^+ではなくNa^+サイクルを効率的に利用すること、Mrpと呼ばれるマルチサブユニット型Na^+/H^+アンチポーターが細胞内での中性化に重要な役割を果たしていること、細胞表層タンパク質SlpAもアルカリpH適応機構に寄与していることが報告されている。全ゲノム解析の結果、*B. pseudofirmus* OF4株にはSlpAを含むSLHモチーフと呼ばれる細胞壁結合モチーフをもつ細胞表層細胞表層タンパク質を多数持つことが示唆された。しかし、SlpA以外の細胞表層タンパク質についての報告はなく、細胞表層タンパク質の輸送や固定化の機構についての詳細は不明のままである。そこで、我々はSlpA以外の細胞表層タンパク質の同定とその生理的役割について検討を行った。
【方法】*Bacillus anthracis*では*csaB* 遺伝子がSLHモチーフを持つ細胞表層タンパク質の細胞表層での固定化に重要であることが報告されている。そこで、*B.pseudofirmus* OF4株において*csaB*遺伝子欠損株を作成した。*B.pseudofirmus* OF4株の細胞表層タンパク質がSLHモチーフを用いて細胞表層に固定されるのであれば、*csaB* 遺伝子欠損株ではすべての細胞表層タンパク質が固定されない場合の表現型が観察できると予想された。この*csaB* 遺伝子欠損株の表現型から、実際に*B. pseudofirmus* OF4株の細胞表層タンパク質がSLHモチーフにより表層に固定されるかどうか確認するとともに、どのような生理的役割をもつ細胞表層タンパク質が存在しているか推察した。
【結果】*B. pseudofirmus* OF4株において*csaB*遺伝子欠損株を作成し、その表現型を調べたところ、アルカリpH感受性になることがわかった。このことから、*B. pseudofirmus* OF4株の細胞表層タンパク質は、SLHモチーフにより表層に固定されること、*csaB* 遺伝子欠損株ではSlpAが細胞表層に固定されなくなり、アルカリpH感受性になることが推察された。
　また、アルカリpH感受性になる以外にも細胞形態に変化がおきることがわかった。*csaB* 遺伝子欠損株の細胞膜染色、核様体染色を行ったところ、細胞分裂後の細胞分離がうまく行っておらず、細胞が連鎖状になった。細胞分離に異常が起きたことから、細胞分離に関与する細胞表層タンパク質が存在することが示唆された。*B. pseudofirmus* OF4株のゲノムからはSLHモチーフをもつ推定上の細胞壁分解酵素が存在することから、これが細胞分離に関与していることが示唆された。

alkaliphile, surface layer protein, cell separation

講演番号：3B18p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ B校舎18会場

枯草菌における脂質代謝と細胞分裂間の新規ネットワーク解析

Involvement of PlsX, essential acyl-phoshatase, in cell division machinary

○高田啓[1]、盛田雅人[1]、田中（福島）早苗[1],志波優[2]、松本幸次[3]、吉川博文[1・2]
([1]東京農大・応生科・バイオ、[2]東京農大・ゲノム解析セ、[3]埼玉大・理・分子生物)
○Hiraku Takada[1], Masato Morita[1], Sanae Fukushima-Tanaka[1] , Yuh Shiwa[2], Kouji Matsumoto[3] and Hirofumi Yoshikawa[1] (Dept. Biosci, Tokyo Univ.Agric. [1], Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric.[2], Dept. Mol. Biol, Saitama Univ.[3])

【目的】細菌の細胞分裂には細胞質膜合成が伴い、脂質代謝は細胞分裂と密接に共役した現象であることが容易に想像できるが、その関連性については不明な点が多い(1)。我々は細胞質膜合成と細胞分裂(Z-ring)との間における協調的なネットワークの解明を目指し、網羅的な相互作用解析を行ってきたが、その結果、脂質合成における鍵酵素 PlsX がアクチン様タンパク質である FtsA 等の細胞分裂関連タンパク質と相互作用することを見出した(2)。そこで本研究では PlsX の細胞分裂への関与を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】まず、PlsXの細胞内局在を検証するためにGFPをPlsXのN末端に融合させた株を作製した。細胞増殖が盛んな対数増殖期におけるPlsXの局在を、蛍光顕微鏡を用いて解析したところ、GFP-PlsXは分裂予定域や隔壁に多く局在しているのが観察できた。またこれらの局在はFtsAと同様の局在パターンであった。次にPlsXの局在がFtsA に依存するか検証するために、*ftsA*破壊株を作製し、GFP-PlsXの局在を観察した。*ftsA*破壊株ではZ-ring形成が阻害されるため、細胞分裂異常を示すが、PlsXは野生株と同様での局在性を示した。また、FtsZを枯渇させた場合においても同様の結果が得られた。これら結果から、PlsXはZ-ring非依存的に分裂予定域に局在することが示された。そこで逆に細胞分裂に対するPlsXの関与について検証することにした。人為的変異導入法によって*plsX*温度感受性変異(*plsX103*)株を取得した。制限温度下において*plsX103*株は分裂異常を示した。またFtsA、FtsZにGFPを融合させ、*plsX*誘導株において経時的に観察したところ、*plsX*の発現を抑制した場合においてFtsA、FtsZの分裂予定域への局在が阻害された。以上の結果より、PlsXはFtsAを介して細胞分裂装置の形成に関与することが示唆された。また、次世代シーンサーを用いた*plsX103*株の抑圧変異解析の結果も合わせて報告する。

(1)Nishibori, A. *et al.* (2005) *J Bacteriol.* 187(6):2163-2174
(2)Fukushima, S. & Yoshikawa, H (2007) in Global Regulatory Networks in*Bacillus subtilis* Research Signpost, India: p229-249.

Bacillus subtilis, cell division, lipid synthesis

講演番号：3B18p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ B校舎18会場

枯草菌における*plsX*温度感受性変異の抑圧因子S21の機能解析

Functional analysis of S21 suppressor of *plsX* temperature-sensitive mutation in *Bacillus subtilis*.

○盛田雅人[1]、高田啓[1]、志波優[2]、松本幸次[3]、吉川博文[1・2]
（東京農大・応生科・バイオ[1]、東京農大・ゲノム解析セ[2]、埼玉大・分子生物[3]）
○Masato Morita[1], Hiraku Takada[1], Yuh Shiwa[2], Kouji Matsumoto[2], and Hirofumi Yoshikawa[1・2]
(Dept. Biosci, Tokyo Univ. Agric.[1], Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric.[2], Dept. Mol. Biol. Saitama Univ.[3])

【目的】隔壁形成は細胞分裂装置の形成、収縮と同時に細胞質膜と細胞壁合成が起きることで進行する。つまりこれらの現象は密接に共役していることは容易に想像できるが、その関係性は不明な点が多い。当研究室において、脂質合成酵素PlsXが正常な細胞分裂に必須であることを明らかにしてきた。人為的変異導入法により取得した*plsX*温度感受性株のうち、二量体形成ドメインに変異を同定した*plsX67*株に着目した。この変異株より温度感受性抑圧変異株を取得し、次世代シークエンサーを用いてマッピング解析を行った結果、抑圧変異の一つを*rpsU*のORFに同定した。*rpsU*は、30Sサブユニットに含まれるリボソームタンパク質S21をコードする。そこで脂質合成酵素PlsXとリボソームタンパク質S21の機能的な関係性を検証することを本研究の目的とした。
【方法・結果】S21はポストゲノム解析から必須であると予想されていた。しかし、今回同定した抑圧変異は*rpsU*の２つ目のコドンが終始コドンに置換されたものであった。そこで再度*rspU*の必須性を検証したところ、完全破壊株（Δ*rpsU*株）が取得できた。またΔ*rpsU*を*plsX67*株に導入したところ、温度感受性の抑圧が確認できた。さらに、Δ*rpsU*株の表現型を検証するため顕微鏡観察を行ったところ、フィラメント状の形態を示した。蛍光プローブFM4-64を用いた膜染色により観察したところ、隔壁の形成は正常であったが、細胞分離に異常がみられた。この表現型は細胞分離に関与する溶菌化酵素の多重破壊株と類似していた。そこでS21が溶菌化酵素遺伝子の、発現に関与している可能性を考え、β-ガラクトシダーゼを用いたレポーターアッセイにより、溶菌化酵素遺伝子*lytABC*オペロンのプロモーター活性を測定した。その結果、Δ*rpsU*株においてプロモーター活性の低下が見られた。このプロモーターは、主要な溶菌化酵素遺伝子を制御する鞭毛形成シグマ因子SigDによって制御されている。*sigD*破壊株の表現型である運動性の低下がΔ*rpsU*株でも同様に観察できた。これらの結果から、S21はSigDの活性化に関与していると考えられる。真核生物では翻訳関連因子が翻訳以外の生命現象に関与していることが複数報告されているが、原核生物においてはその知見はあまりない。これらの解析結果を踏まえ、PlsXの温度感受性抑圧因子としてのS21の機能に関して議論したい。

Bacillus subtilis, ribosome, lipid synthesis

講演番号:3B18p06
講演日時、会場:3月24日14:44～ B校舎18会場

枯草菌における緊縮応答と脂質合成の関連性解析

Analysis of relativity between stringent response and lipid synthesis in *Bacillus subtilis.*

○清水 翔[1]、高田 啓[1]、志波 優[2]、松本 幸次[3]、吉川 博文[1,2]（[1]東京農大・応生科・バイオ、[2]東京農大・ゲノム解析セ、[4]埼玉大・理学部・分子生物）

○Sho Shimizu[1], Hiraku Takada[1], Yuh Shiwa[2], Kouji Matsumoto[3], Hirofumi Yoshikawa[1,2]（[1]Dept. Biosci. Tokyo Univ. Agric., [2]Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Mol. Biol. Saitama Univ.）

【背景・目的】細胞分裂は細胞質膜の合成を伴うため、共役した現象であると想像される。当研究室において脂質合成酵素PlsXの細胞分裂への関連性が解析されてきた。*plsX*温度感受性変異(*plsX103*)株が制限温度下で細胞分裂異常を示したことからPlsXの細胞分裂への関与が示唆された。*plsX103*株から制限温度下で生育できる温度感受性抑圧変異株を取得し、次世代シークエンサーを用いてマッピング解析を行った。同定した抑圧変異候補のうち*relA*に注目した。枯草菌では、緊縮応答のトリガー分子である(p)ppGppの合成および分解の両方を行うRelAと、合成のみを行うYjbM, YwaCがある。緊縮応答では様々な代謝制御の変化が知られるが、枯草菌において脂質代謝との関連性はあまり知られていない。そこで、緊縮応答因子の変異が*plsX103*株の温度感受性を抑圧する意義を検証した。

【方法・結果】今回抑圧変異として取得した RelA G691V は酵素活性の調節を行う ACT ドメインと保存性の高い領域に変異が入ったものであった。*plsX103* 株に RelA G691V を導入すると、制限温度下において生育、細胞分裂異常の両方が抑圧されることを確認した。

一方で RelA G691V 株は、顕著な生育の遅延を示した。これは *relA* 破壊株で観察される表現型と類似していた。反面、この表現型は RelA の(p)ppGpp 合成能を欠損させた株では見られない。このことより、生育遅延の原因は RelA による(p)ppGpp 分解反応が起こらず、YjbM, YwaC による(p)ppGpp 合成反応が進行し、(p)ppGpp の過剰な蓄積が起きるためだと報告されている[1)]。この知見から RelA G691V 株では(p)ppGpp 分解能が低下し、(p)ppGpp の蓄積が起きていることが考えられる。なお、*relA* 遺伝子の破壊および発現の抑制によっても同様に *plsX103* 株の温度感受性抑圧が確認できた。つまり、*plsX103* 株の制限温度下における細胞分裂異常が(p)ppGppの蓄積により抑圧される。これらのことから、緊縮応答が脂質代謝と細胞分裂を共役させる機構であると考えられる。現在は PlsX による細胞分裂制御と緊縮応答との関連性について、更に詳細なメカニズムの解明を目指している。本大会ではこれらの結果を踏まえ、以上三者の関係性について議論したい。

[1)]Nanamiya, H. *et al.* (2008) *Mol Microbiol.* 67(2):291-304

Bacillus subtilis,stringent response,lipid synthesis

講演番号：3B18p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ B校舎18会場

Thermus thermophilus のAEC超感受性機構の解析

Mechanism for hyper-sensitivity to lysine analogue of *Thermus thermophilus*

○金丸由布子[1], 長谷部文人[1], 富田武郎[1], 葛山智久[1], 西山真[1]（[1]東京大学・生物工学セ）
○Yuko Kanemaru[1], Fumihito Hasebe[1], Takeo Tomita[1], Tomohisa Kuzuyama[1], Makoto Nishiyama[1]
（[1]Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo）

【目的】*Corynebacterium glutamicum* のリジン生合成の鍵酵素であるアスパラギン酸キナーゼ(AK)は、フィードバック阻害剤により活性阻害を受ける。同菌を用いたリジンの工業生産には、リジンアナログである2-aminoethyl cysteine (AEC)耐性を指標としたスクリーニングにより得られたフィードバック阻害が解除されたAKを有する株が用いられている。一方、*Thermus thermophilus*は、*C. glutamicum*とは異なる経路でリジンを生合成し、その生合成は初発酵素、ホモクエン酸合成酵素 (HCS)の活性調節により制御される。*T. thermophilus* は*C. glutamicum* 等に比べて特に高いAEC感受性を示す。興味深いことに、*T. thermophilus* はHCSに対するフィードバック阻害が解除された場合にも、依然として野生株と同程度のAEC超感受性を示す。このことから*T. thermophilus*では、AECに超感受性を示す他の要因があると考えられた。この機構解析のために、*T. thermophilus*のAEC耐性株を取得し、それらの株のAEC耐性機構の解析を行った。
【方法】NTG処理により、AEC耐性を有する変異株を7株取得した。最も強いAEC耐性を示した変異株10番のゲノムと、14番のゲノムからコスミドライブラリーを作製し、野生株にAEC耐性を付与するコスミドを取得した。コスミドのシークエンス解析と遺伝子破壊株の生育の解析から、AEC耐性の原因となっている遺伝子の同定および機能解析を試みた。
【結果】野生株にAEC耐性を付与する変異株10番由来のコスミドのシークエンス解析から、変異株10番のゲノムの一部が反転していることが明らかになった。反転により遺伝子が破壊された座位にはそれぞれアミノ酸トランスポーターを構成すると推測されるタンパク質の遺伝子*TTC0807*と*TTC0969*が存在していた。*TTC0807*, *TTC0969*の各遺伝子の破壊株と、両遺伝子破壊株を作製し、生育を測定したところ、Δ*TTC0807*, Δ*TTC0969*株では部分的なAEC耐性、Δ*TTC0807*/Δ*TTC0969*株では変異株10番と同程度のAEC耐性を獲得することが明らかとなった。変異株14番では、同様な解析から、アミノ酸トランスポーターをコードすると推測される*TTC0795*に変異が存在することが明らかになった。これらの結果から、TTC0807, TTC0969, TTC0795は、AECを菌体内に輸送しているトランスポーターであることが示唆された。本発表では、各トランスポーターのペリプラズムアミノ酸結合タンパク質であるTTC0807やTTC0966の結晶構造や、各トランスポーターの機能発現機構についても併せて報告する予定である。

Keyword1：Thermus, Keyword2：transporter, Keyword3：lysine

講演番号：3B18p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ B校舎18会場

ナトリウムイオン添加による低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 のエイコサペンタエン酸欠損株の生育回復

Effects ofsalinity onthe eicosapentaenoic acid-less mutant ofa psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10c10

○朴　貞河、川本　純、江崎　信芳、栗原　達夫（京大・化研）
○Jungha Park, Jun Kawamoto, Nobuyoshi Esaki, Tatsuo Kurihara (Ints. for Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は、長鎖多価不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸（EPA）を生産する。EPA 生合成遺伝子を破壊すると 4℃ での生育速度が著しく低下すること、また細胞分裂不全を引き起こし、本菌の形態を伸長させることから、EPA は本菌の低温適応に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、培地内に塩化ナトリウム（3%）を添加することで低温での EPA 欠損株の生育速度の低下が回復し、親株と同様の形態の細胞を形成することがわかった。本研究では、培地中の塩化ナトリウムの濃度を変化させ、低温での生育能が回復した EPA 欠損株を詳細に解析することで、EPA の欠損による低温での生育障害を抑制するタンパク質を探索した。

【方法・結果】1-6% の塩化ナトリウムを含む LB 培地を調製し、EPA 欠損株の 4°C での生育速度を解析した結果、2-5% の塩化ナトリウム（NaCl）の添加で本菌の EPA 欠損株の低温での生育速度が回復することがわかった。EPA の欠損による低温での生育能の低下は NaCl 添加で誘導発現する遺伝子・タンパク質の機能によって抑制される可能性が考えられた。EPA 欠損株において、NaCl を添加した培地で誘導生産されるタンパク質を網羅的に解析するために、LB 培地と 3% の NaCl を添加した LB 培地で生育した EPA 欠損株から膜タンパク質を抽出し、二次元電気泳動に供した。その結果、NaCl 添加培地で生育した EPA 欠損株で、FtsY の生産量が 3 倍に増加していたことがわかった。FtsY は細菌の Signal Recognition Particle（SRP）の受容体であり、内膜に存在する。種々の膜タンパク質の細胞膜輸送に重要なタンパク質である。NaCl を添加することで、 FtsY の生産量が増加していたことから、本菌の EPA 欠損による低温での生育能の低下には、FtsY が関与している可能性が示唆された。EPA 欠損株内に FtsY を高発現するベクターを導入し、EPA 欠損株の生育と細胞分裂能への影響を解析した結果、EPA の欠損による低温での生育速度の低下や細胞分裂不全が相補されたことから、FtsY の低温での適切な機能発現には EPA が関与していることが示唆された。

eicosapentaenoic acid, FtsY, psychrotroph

講演番号：3B18p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ B校舎18会場

低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の細胞分裂に関わる膜タンパク質の機能解析

Studies of membrane proteins involved in cell division of a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10

○永久 由利絵、青柳 美穂、川本 純、江崎 信芳、栗原 達夫 （京大化研）
○Yurie Eikyu, Miho Aoyagi, Jun Kawamoto, Nobuyoshi Esaki, Tatsuo Kurihara (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】 グラム陰性菌の細胞分裂は、少なくとも12種類の細胞分裂関連タンパク質群が分裂サイトに会合し、分裂装置を形成することから開始する。その装置は Fts (Filament-like Temperature Sensitive) と呼ばれるタンパク質群を中心に構成され、細胞分裂に関わる重要な機能を担っている。分裂装置を構成するタンパク質である FtsE、FtsX はFtsEX 複合体を形成することが予想されているが、細胞分裂における生理的役割や機能の詳細について報告された例はない。南極海水から単離されたグラム陰性桿菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10は低温でエイコサペンタエン酸 (EPA) を誘導生産する。EPA 生合成遺伝子を破壊した EPA 欠損株を低温で培養した時、野生株と比較して生育速度が低下し、伸長した多核の細胞を形成することがわかった。以上の結果から、EPA の欠損による細胞膜脂質の変化は、細胞分裂に関わるタンパク質の低温での機能発現に影響することが示唆された。特に、伸長した細胞内では、野生株には見られない多重膜構造が発達していたことから、細胞膜成分の輸送に関与するタンパク質と EPA の相互作用が示唆された。本研究では、*S. livingstonensis* Ac10 の機能未知タンパク質 FsE、FtsX と EPA との関わりを詳細に解析することを目的とした。

【方法・結果】 *S. livingstonensis* Ac10 のEPA 生合成遺伝子を破壊したEPA 欠損株 (ΔEPA) に、*ftsE*、*ftsX* をそれぞれ高発現するベクターを導入し、低温での生育と形態への影響を解析した。その結果、*ftsE*、*ftsX*の高発現は、ΔEPAの生育速度の低下と伸長した細胞の形成を抑制したことから、EPAの欠損は低温でのFtsE、FtsXの生産量や機能に影響していることが示唆された。抗 FtsE 抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、野生株のFtsE の多くは細胞膜画分から検出されたのに対して、EPA欠損株では可溶性画分に存在するFtsEの量が増加しており、本菌においてEPAの欠損はFtsEの細胞膜局在に影響することがわかった。EPA欠損株におけるFtsE、FtsXの細胞内局在性を明らかにするために、eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) を融合したFtsE、FtsXを発現するベクターを欠損株に導入した。その結果、EPA欠損株の FtsE、FtsX は細胞分裂サイトには存在しないことが示された。

psychrotroph, eicosapentaenoic acid, cell division

講演番号：3B18p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ B校舎18会場

低温誘導性外膜タンパク質 Omp74 の構造形成における EPA 含有リン脂質の生理機能解析

Physiological role of EPA-containing phospholipids in the structure formation of a cold-inducible outer membrane protein, Omp74

○水谷 彩乃、代 先祝、川本 純、佐藤 智[1]、江崎 信芳、栗原 達夫 （京大化研、[1]京大LTMセンター）

○Ayano Mizutani, Xian-Zhu Dai, Jun Kawamoto, Satoshi Sato[1], Nobuyoshi Esaki, Tatsuo Kurihara (Inst. Chem. Res.Kyoto Univ., [1]Res. Cent. Low Temp. Mat. Sci., Kyoto Univ.)

【目的】長鎖高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) はリン脂質のアシル鎖として動物や海洋性低温細菌の生体膜で機能しており、近年、機能性脂肪酸として健康食品への利用が注目されている。過去の研究より、南極海水由来の低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 では、 EPA の欠損により低温誘導性外膜ポーリン (Omp74) のコンフォメーションが変化することが分かった。この結果は、生体膜に含まれる EPA 含有リン脂質が、特定の膜タンパク質の低温での構造形成や機能発現において重要な役割を担っていることを示唆しているが、EPA 含有リン脂質と膜タンパク質の相互作用機構の詳細は不明な点が多い。本研究では、本菌の Omp74 を用い、人工膜存在下での Omp74 のフォールディングにおける EPA 含有リン脂質の影響について解析することで、膜タンパク質の機能発現における EPA の生理的役割を解明することを目的とした。

【方法・結果】アシル鎖にパルミトレイン酸を有するホスファチジルエタノールアミン (PE) とホスファチジルグリセロール (PG) で構成されるリポソームと、EPA 含有リン脂質を 5% 添加したリポソームに Omp74 を再構築することでプロテオリポソームを作製し、トリプシンを用いた限定分解によって生じたペプチド断片を MALDI-TOF で解析したところ、EPA 含有リン脂質を含むリポソームでは Omp74 の C 末端が切断されないことがわかった。Omp74 は EPA の存在に依存して、C 末端領域の構造を変化させている可能性が示唆された。Omp74 の C 末端領域にはペプチドグリカン結合ドメインと予想される配列が保存されており、C 末端領域を欠損させた変異型タンパク質は、野生型タンパク質に比べて菌体内での安定性が低下した。以上の結果から、Omp74 の C 末端領域は本タンパク質の安定性に関与し、EPA 含有リン脂質に依存して構造変化することがわかった。

Eicosapentaenoic acid, outer membrane porin, folding

講演番号：3B18p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ B校舎18会場

低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 のエイコサペンタエン酸含有リン脂質と外膜タンパク質の相互作用解析

Interaction between an outer membrane protein and EPA-containing phospholipids of a psychrotrophic bacterium *Shewanella livingstonensis* Ac10

○杉浦 美和、朴 貞河、代 先祝、川本 純、江崎 信芳、栗原 達夫（京大化研）
○Miwa Sugiura, Jungha Park, Xian-Zhu Dai, Jun Kawamoto, Nobuyoshi Esaki, Tatsuo Kurihara (Inst. for Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】低温域や深海など極限環境に生育するある種の海洋性細菌は、高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA）を生産することが知られている。南極海水より単離された低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10は、低温誘導的に EPA 含有リン脂質を生産することがわかっている。本菌の EPA 生合成遺伝子を破壊した EPA 欠損株は、低温での生育能力が低下した。さらに、EPA の欠損によって顕著に生産量が減少するタンパク質として、外膜タンパク質 (Omp417) が同定された。Omp417 は三量体を形成する18回膜貫通型のポーリンタンパク質と予測され、野生株において最も生産量が多い外膜タンパク質である。このことから EPA と Omp417 との相互作用の存在が示唆された。本研究では、外膜タンパク質 Omp417 の機能発現における EPA 含有リン脂質との相互作用機構の解明を目的とした。Omp417 にはトリプトファン (Trp) が 7 残基存在する。Trp は蛍光を発するアミノ酸である。Trp が親水的な環境から疎水的な環境に移行すると、その最大蛍光波長は長波長側から短波長側へブルーシフトする。また、その蛍光強度は Trp 残基周辺の pH によって影響される。本研究では、Omp417 のフォールディング過程における EPA含有リン脂質の影響を解析するために Trp 蛍光ダイナミクスを解析した。
【方法・結果】*S. livingstonensis* Ac10 における Omp417 の生理機能解析のために、遺伝子破壊用プラスミド pKNOCK-Km^r を用いた相同組み換えにより *omp417* 欠損株を作製した。野生株と *omp417* 欠損株の 4℃ での生育を比較した結果、両株間で生育の差は見られなかった。このことは、 Omp417 は *S. livingstonensis* Ac10 の低温適応に必須ではないことを示す。Omp417 のフォールディングにおける EPA 含有リン脂質の影響を解析するために、本タンパク質の *in vitro* 再構築系を構築した。 Omp417 の過剰発現用ベクターを構築し、Omp417 を封入体の形で発現させ、尿素を用いて可溶化した。4°C で培養した野生株と EPA 欠損株から抽出したリン脂質を用いてリポソームを作製した。リポソームと混合した Omp417 の Trp の蛍光を経時的に測定した。その結果、野生株由来のリン脂質で調製したリポソームを用いた場合と、EPA欠損株由来のリン脂質で調製したリポソームを用いた場合では、いずれの時間も Trp の最大蛍光波長と強度が異なっていた。この結果は、Omp417 のフォールディング過程における本タンパク質の Trp 残基がEPA含有リン脂質の有無によって極性や pH の異なる環境に存在することを示し、Omp417 が EPA 含有リン脂質に依存して構造を変化させるタンパク質である可能性が示唆された。

eicosapentaenoic acid, outer membrane protein, psychrotroph

講演番号：3B18p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ B校舎18会場

アミド型リン脂質を用いた EPA 含有リン脂質の生理機能解析

Studies on the physiological function of EPA-containing phospholipids by using amide phospholipids

○上野　源次郎、佐藤　翔、川本　純[1]、江崎　信芳[1]、栗原　達夫[1]（[1]京大化研）
○Genjiro Ueno, Sho Sato, Jun Kawamoto[1], Nobuyoshi Esaki[1], Tatsuo Kurihara[1] ([1]Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】　高度不飽和脂肪酸（PUFA）は原核生物から真核生物にわたる多岐の生物種に広く見いだされており、様々な生理現象に関与する多機能性脂質として近年注目を集めている。南極海水より単離された低温適応細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は PUFA の一種であるエイコサペンタエン酸（EPA）を *sn*-2 位にもつリン脂質を低温誘導的に生成する。EPA 生合成遺伝子を破壊して EPA を欠損させると低温で生育速度が著しく低下し、EPA 含有リン脂質を外部から添加することで、生育速度が回復したことから、本菌の低温での生育に EPA が重要な生理機能を担うことが示されているが、その詳細は明らかでない。*sn*-2 位にエーテル結合を介して EPA を持ち、極性頭部が蛍光標識された EPA 含有リン脂質を用い、局在性を解析した結果、細胞分裂サイトへの局在が見いだされた。しかし、エーテル型 EPA 含有リン脂質は EPA 欠損株の生育を相補できなかったことから、天然の EPA 含有リン脂質の生理機能を代替できないことが示された。エステル結合よりもエーテル結合の方が疎水性の高いことがその一因である可能性が考えられたことから、エーテル結合に比べて親水的で、かつ細胞内ホスホリパーゼによって加水分解されないアミド結合を介して *sn*-2 位に EPA を持つリン脂質を合成し、EPA 欠損株の生育におよぼす影響を解析した。

【方法・結果】　*sn*-1 位にエステル結合を介してオレイン酸を、 *sn*-2 位にアミド結合を介して EPA を持つリン脂質を合成した。これらを添加した液体培地を用いて、野生株及び EPA 欠損株を 4 ℃で培養し、生育速度と菌体の形態への影響を解析した。また、エステル結合を介して *sn*-1 位と *sn*-2 位にそれぞれオレイン酸と EPA を持つ天然型のホスファチジルエタノールアミン（OEPE）を EPA 欠損株に投与し、同様の実験を行った。その結果、アミド型リン脂質を投与した野生株と OEPE を投与した EPA 欠損株の生育と形態は正常であったが、アミド型リン脂質の添加は EPA 欠損株の生育と形態に影響しないことがわかった。ESI-MS によるリン脂質組成の解析により、時間の経過とともにアミド型リン脂質のシグナルが減少し、*sn*-1 位のエステル結合が切られたリン脂質のシグナルが増加することが見いだされた。一方、*sn*-2 位の EPA は切断されないことが示された。以上の結果より、菌体のホスホリパーゼ活性による、*sn*-2 位からの EPA の遊離が、本菌における EPA の機能発現に重要であることが示唆された。

eicosapentaenoic acid, phospholipids, psychrotroph

講演番号：3B18p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ B校舎18会場

高水圧下における好圧性細菌*Shewanella violacea* DSS12株の細胞膜の構造とその安定性におよぼすエイコサペンタエン酸の効果

The role of eicosapentaenoic acid on membrane stability in deep-sea piezophile *Shewanella violacea* DSS12 under high hydrostatic pressure

○臼井けい子[1]、開俊樹[1]、川本純[2]、栗原達夫[2]、能木裕一[1]、加藤千明[1]、阿部文快[1,2,3]（[1]海洋研究開発機構、[2]京都大学化学研究所、[3]青山学院大学・理工）

○ Keiko Usui[1], Toshiki Hiraki[1], Jun Kawamoto[2], Tatsuo Kurihara[2], Yuichi Nogi[1], Chiaki Kato[1], Fumiyoshi Abe[1,2,3] ([1]Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, [2]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [3]College of Science and Engineering, [3]Aoyama Gakuin University)

【目的】深海生物における高水圧・低温環境への適応には、生体膜の構造や機能の最適化が不可欠である。好圧性細菌の中には圧力応答して不飽和脂肪酸の割合を高めるものがおり、膜の流動性維持に寄与するものと解釈されている。しかし、実際に微生物の膜物性を高圧下で計測した例は非常に少ない。我々はこれまで出芽酵母を実験材料として、時間分解蛍光偏光解消法により膜の動的構造を解析してきた。本研究ではこれを高圧下で行うシステムを開発し、好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株の膜物性について調べた。さらに細胞膜中のエイコサペンタエン酸(EPA)の有無が、高圧下における膜物性にどのような影響をおよぼすかについても検討した。

【実験方法】 *S. violacea* DSS12 株、およびその EPA 合成酵素を欠損する Δ*pfaA* 株を Marine Broth 2216 中、0.1 MPa、10℃で 24 時間培養し、それらを 0.5 μM TMA-DPH でラベルした。蛍光寿命測定装置 FluoroCube に高圧セルを設置し、高圧下における時間分解蛍光偏光解消測定を行った。高圧負荷による石英窓の歪みについては、DPH を流動パラフィンに溶解した試料の異方性を計測し補正した。本計測の妥当性を検証するため、人工脂質である POPC 膜を TMA-DPH でラベルし 10℃、0.1～200 MPa のもとで偏光解消測定を行った。

【結果と考察】POPC膜では秩序パラメーターSが10℃, 75 MPaで急激に増大した。これはL_β/L_α転移（主転移）とよく一致しており、本システムの妥当性を支持している。*S. violacea* DSS12株の細胞膜について測定したところ、Sは大腸菌等に比べて高い値を示し、膜は非常に剛直であることがわかった。一方、Δ*pfaA*株におけるSは野生株より低く、回転拡散係数D_wは高い値を示した。すなわちEPAの欠損により膜の剛直性が低下し、脂質アシル鎖の回転ブラウン運動が増大したものと考えられる。高圧条件下で同様の測定を行ったところ、野生株のSやD_wは圧力の影響をあまり受けないのに対し、Δ*pfaA*株では加圧によりSが増大しD_wが低下することがわかった。EPAなど多価不飽和脂肪酸は一般に膜の流動性を高めると考えられているが、好圧性細菌*S. violacea* DSS12株では、むしろEPAが存在することで膜の剛直性が維持されることがわかった。

Shewanella violacea DSS12, EPA, membrane fluidity

講演番号：3B18p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ B校舎18会場

タイトル　ホスファチジルエタノールアミンの細胞内輸送に関する出芽酵母を用いた解析

Title Intracellular Transport of Phosphatidylethanolamine in *Saccharomyces cerevisiae*

○小林 新吾、福田 良一、太田 明徳（東大院・農生科・応生工）

○Shingo Kobayashi, Ryouichi Fukuda, Akinori Ohta (Univ. Tokyo)

生体膜の主要構成成分の一つであるホスファチジルエタノールアミン（PtdEtn）は、ミトコンドリアの機能に重要な役割を担っている。出芽酵母においてミトコンドリアのPtdEtnは、小胞体で作られたホスファチジルセリンをミトコンドリアへと運び込み、Psd1pによって脱炭酸することで合成される。Psd1pを欠失するとミトコンドリアのPtdEtn量が欠乏して呼吸機能欠損を生じるため、酵母はグリセロールや乳酸などの非醗酵性炭素源を資化できなくなる。この表現型は外からエタノールアミンを供給することにより抑圧される。これは、ケネディ経路を介して小胞体膜上に合成されたPtdEtnがミトコンドリアへと運び込まれて利用されたためと考えられる。このことから、出芽酵母には他のオルガネラで合成したPtdEtnをミトコンドリアへと搬入する機構が存在していると思われる。このようなオルガネラ間PtdEtn輸送は、酵母から動物に至るまで広く真核生物に共通する重要な現象であるが、それを担う細胞内機構についてはほとんど明らかになっていない。

そこで我々は*psd1*Δ株の乳酸資化能欠損に対するマルチコピーサプレッサーの探索を行った。この探索系ではミトコンドリアへのPtdEtnの搬入が亢進した株や、PtdEtn合成が亢進した株、PtdEtnの分解が抑制された株など、最終的にミトコンドリアのPtdEtn量が増加して呼吸機能が回復した株が取得されると期待された。得られたクローンから原因遺伝子を特定した結果、そのうち1つの遺伝子産物について細胞内PE輸送に関与する可能性が考えられたため報告する。

Keyword1, Keyword2, Keyword3 phosphatidylethanolamine, mitochondria, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：3B18p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ B校舎18会場

タイトル　酵母におけるホスファチジルエタノールアミンの動態へのGolgi-associated retrograde protein complexの関わり

Title　Involvement of Golgi-associated retrograde protein complex in the dynamics of phosphatidylethanolamine in *Saccharomyces cerevisiae*

○高城 景子、岩本 邦彦、小林 新吾、堀内 裕之、福田 良一、太田 明徳（東大院・農生科・応生工）

○Keiko Takagi, Kunihiko Iwamoto, Shingo Kobayashi, Hiroyuki Horiuchi, Ryouichi Fukuda, Akinori Ohta (Univ. Tokyo)

生体膜の主要な構成成分であるリン脂質は、生体膜の脂質二重層間で非対称的に分布していると考えられている。形質膜では、酵母から動物細胞に至るまで、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルイノシトールが内層に多く存在し、ホスファチジルコリンが外層に多く存在するというモデルが広く受け入れられており、この非対称的分布は、アポトーシスや血小板活性化などの局面での細胞認識や胆汁中のリン脂質組成の維持、細胞分裂におけるアクチンの制御などに関わることが示唆されている。しかし、非対称的分布の形成機構や生理的意義については未解明の部分が多く残されている。

そこで我々は、生体膜構成リン脂質のうちPEの非対称的分布の形成機構や生理的意義の解明を目的とし、PEに特異的に結合する抗生物質Ro09-0198および出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて解析を行った。

その結果、初期および後期エンドソームからトランスゴルジネットワークへの逆行輸送に関わるGolgi-associated retrograde protein (GARP)/Vps fifty-three (VFT) 複合体や、これと共に機能することが示唆されているRab/Yptファミリータンパク質であるYpt6pとその制御因子が、細胞膜におけるリン脂質の推定フリッパーゼであるDnf1p、Dnf2pの局在や機能に関わることが示唆された[1]。

(1) Takagi *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun.　in press.

Saccharomyces cerevisiae, phosphatidylethanolamine, flippase

講演番号：3B18p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ B校舎18会場

分裂酵母のゴルジ体膜で機能するロンボイドプロテアーゼの解析

Functional analysis of Rhomboid proteases localized at the Golgi membrane in *S. pombe*

東 玲那、渋谷大介、竹川 薫[1]、田淵光昭、○田中直孝（香川大・農・応用生物、[1]九大院・農・生物機能）

Reina Azuma, Daisuke Shibutani, Kaoru Takegawa[1], Mitsuaki Tabuchi, ○Naotaka Tanaka (Fac. Agr., Kagawa Univ., Japan [1] Fac. Agr., Kyushu Univ., Japan)

【目的】ロンボイドプロテアーゼ（ロンボイド）は、膜内プロテアーゼファミリーに属するセリンプロテアーゼである。複数回膜貫通領域を持ち、基質となる膜タンパク質の膜貫通領域を切断する。ロンボイドは原核微生物から脊椎動物に至るまで保存されているが、ゴルジ体で機能するロンボイドはショウジョウバエ増殖因子の切断による活性化の報告のみで、他の生物における役割は不明である。本研究は分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* に存在するゴルジ体局在性のロンボイドについて、遺伝子破壊株の表現型解析と基質の同定を目的とした。

【方法及び結果】分裂酵母にはロンボイドと相同性の高い遺伝子が４つ存在しており、そのうち２つがミトコンドリア局在、２つがゴルジ体局在（Rob1, Rob2 (Rhomboid)）であることが分かった。破壊株を単離し、種々の表現型を確認した結果、*rob1*Δ株は亜鉛やコバルトに感受性を示した。分泌輸送への影響を確認するために、液胞へ選別輸送されるカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) の漏出をコロニーブロットにより確認した結果、細胞外へ誤輸送されることが分かった。これらのことから、Rob1 は細胞内の亜鉛及びコバルトの恒常性や、ゴルジ体において液胞タンパク質の選別輸送に関与していることが示唆された。*rob2*Δ株は、トランスゴルジネットワーク領域の逆行輸送を阻害するモネンシンに対し感受性を示したが、CPY の輸送に障害は見られなかった。このことから Rob1, Rob2 はゴルジ体において異なる機能を有していることが示唆された。また、ロンボイドの基質認識モチーフを有するゴルジ体膜結合型転写因子の細胞内局在を確認した結果、*rob1*Δ株では核移行の遅延が観察されたことから、ゴルジ体膜からの遊離に Rob1 が関与していることが示唆された。

S. pombe, Rhomboid protease, Golgi

講演番号:3B18p17
講演日時、会場:3月24日17:15～ B校舎18会場

分裂酵母の胞子形成におけるエキソサイトーシス経路の機能解析

Role of the exocytotic pathway in fission yeast spore formation

○今田 一姫、寺口 絵理香、中村 太郎（阪市大院理・生物地球）
○Kazuki Imada, Erika Teraguchi, Taro Nakamura (Osaka City Univ.)

分裂酵母の胞子形成は、将来の胞子細胞膜である前胞子膜が母細胞中に新生され、減数分裂によって生じた核を包み込むという、非常に興味深い現象である。我々は胞子形成欠損株(*spo*変異株)のスクリーニングにより、これまでに23の新しい胞子形成関連遺伝子(*spo*遺伝子)を取得した。そのうちの1つは、Rabファミリーsmall GTPaseをコードする*ypt3*であった。分裂酵母Ypt3は栄養増殖時、エキソサイトーシス経路を制御していることが明らかになっている。取得した*spo26/ypt3*変異株における前胞子膜形成の観察から、Ypt3は前胞子膜形成の開始および前胞子膜の伸張に関わることが示唆されている。

出芽酵母との相同性から、エキソサイトーシス経路におけるRabカスケードには、Ypt3とその下流のRab GTPaseであるYpt2が存在すると考えられている。そこで、GFP-Ypt3およびGFP-Ypt2の細胞内局在観察を行った。野生型株およびさまざまな*spo*変異株における局在観察結果から、胞子形成時、Ypt3は核周辺に、Ypt2は前胞子膜形成の開始部位に前胞子膜非依存的に局在し、前胞子膜存在下ではいずれも前胞子膜に局在することが分かった。これらのことから、エキソサイトーシス経路におけるYpt3からYpt2へのRabカスケードが、前胞子膜形成の開始に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

exocytosis, Rab GTPase, sporulation

講演番号:3B18p18
講演日時、会場:3月24日17:26～ B校舎18会場

選択的オートファジーに関わる *Pichia pastoris* Atg11 の coiled coil ドメイン機能解析

Functional analysis of *Pichia pastoris* Atg11 coiled coil domain involved in selective autophagy

◯山口　聡大[1]、奥　公秀[1]、由里本　博也[1]、阪井　康能[1,2]([1]京都大・院農・応用生命、[2]JST・CREST)

◯Souta Yamaguchi[1], Masahide Oku[1], Hiroya Yurimoto[1], Yasuyoshi Sakai[1,2] ([1]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]JST・CREST)

【目的】オートファジー関連の液胞への細胞質輸送機構には、非特異的に細胞質成分を分解するバルクなオートファジーの他、ペルオキシソームを特異的に分解するペキソファジー、液胞内酵素 Aminopeptidase I (ApeI)輸送を担う Cytoplasm to vacuole targeting(Cvt)経路など、選択的な機構も存在する。Atg11 は選択的オートファジーで機能し、新生隔離膜形成の場である PAS(Preautophagosomal structure)の重要なコンポーネントとして知られている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Atg11(ScAtg11)は、分子内に 4 つの coiled coil(CC)ドメインを有し、新生隔離膜形成に必要な Atg タンパク質群と相互作用し、Atg11 複合体を形成する。メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* Atg11(PpAtg11)も同様に 4 つの CC ドメインを持ち、全ての CC ドメインがペキソファジーに必須であるが、PpAtg11CC ドメインによる選択的オートファジーの分子機構は明らかでなかった。そこで本研究は選択的オートファジーにおける PpAtg11CC ドメインの機能を解析することを目的としている。

【方法】PpAtg11 各 CC ドメイン欠損株を用いて、ペキソファジー条件下で新生隔離膜形成に必要な他の Atg タンパク質群(PpAtg1, PpAtg8, PpAtg17, PpAtg26)の動態観察を行った。また上記の株を用いて PpApeI 輸送についても顕微鏡観察と液胞内で受けるプロセシングの有無によって調べた。

【結果】ペキソファジーにおいては、PpAtg11CC1欠損株ではPpAtg11とともにPAS形成の核となるPpAtg17、また膜伸長に機能するPpAtg26をリクルートできないことが明らかになった。またPpAtg11CC4欠損株はペキソファジー不能であるのにも関わらず、上記のAtgタンパク質群との共局在パターンに異常がなかったことから本ドメインが上記タンパク質の複合体形成以降で機能することが示唆された。PpApeI輸送においては、ScAtg11には見られなかったCC1欠損による機能不全が見出されたこと、ScAtg11ではカーゴ認識を担うCC4がPpAtg11では不要なことから、*P. pastoris*にユニークなAtg11CCドメイン機能の存在が示された。本大会発表においては、今回の研究からペキソファジーにおけるPpAtg11CCドメイン機能のモデルを提唱する予定である。

Pexophagy, Atg11, *Pichia pastoris*

講演番号：3B18p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ B校舎18会場

PpAtg18 のリン酸化はペキソファジーにおける膜動態を制御する

Phosphorylation of PpAtg18 mediates membrane dynamics in pexophagy

○田村直輝[1]、奥　公秀[1]、阪井康能[1,2]（[1]京大院農・応用生命、[2]JST・CREST）
○Naoki Tamura[1], Masahide Oku[1], Yasuyoshi Sakai[1,2] ([1]Kyoto Univ. Agri. Appl. life Sci., [2]JST・CREST)

【目的】メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* において選択的ペルオキソーム分解経路であるペキソファジーは２種類の経路が存在し（ミクロペキソファジーとマクロペキソファジー)、これらの膜動態制御に Phosphoinositide (PI) 結合能をもつ PpAtg18 が関与することが分かっている。Atg18 はオートファジーに必要な分子で、PI(3)P との結合能を有し、Atg2 と複合体を形成することでオートファゴソーム形成に関与している。一方、Atg18 は液胞の出芽にも必要であり、この経路には $PI(3,5)P_2$ が必須のリン脂質である。、今回、PpAtg18 のリン酸化を見出し、PpAtg18 のリン酸化がペキソファジーの膜動態を制御していることを報告する。

【方法】オリジナルプロモーター支配下で *PpATG18-5×Flag* または *PpATG18-YFP* を発現させ、ウェスタンブロット法でリン酸化レベルを、蛍光顕微鏡で局在の解析を行った。また、PpAtg18 を *Pichia pastoris* から直接精製し *in vitro* で共鳴プラズモン法、 Dot blot 法、ならびに Liposme pull down 方を用いて脂質結合実験を行った。さらに、リン酸化部位を特定しリン酸化の変異体を取得してペキソファジーにおける膜動態を観察した。

【結果】PpAtg18 は液胞の出芽が誘導されるミクロペキソファジー条件下では脱リン酸化型が検出され、液胞の出芽を伴わないマクロペキソファジー条件下でリン酸化型が増えた。*In vitro* での脂質結合実験で PpAtg18 が $PI(3,5)P_2$ に結合し、脱リン酸化型はリン酸化型に比べて $PI(3,5)P_2$ に対する結合能が強いことが明らかとなった。また、リン酸化部位のアミノ酸変異体の局在解析から脱リン酸化が液胞膜への局在を促進していることが明らかとなった。以上のことから、PpAtg18 のリン酸化がペキソファジーにおける膜動態を制御していることが示された。

vacuole　autophagy　phosphorylation

講演番号：3B18p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ B校舎18会場

脂質滴動態における出芽酵母Atg8の新しい機能

A Novel function of Atg8 in dynamics of lipid droplets in *Saccaromyces cerevisiae*

○前田　佑一郎[1]、奥　公秀[1]、阪井　康能[1,2]（[1]京大院農・応用生命、[2]JST・CREST）
○ Yuichiro Maeda[1], Masahide Oku[1], Yasuyoshi Sakai[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agricul., Kyoto Univ.、[2]JST・CREST)

【目的】脂質滴は真核生物において、酵母からほ乳類において保存されているオルガネラである。中性脂質(トリアシルグリセロール(TAG)、ステロールエステル(SE))をコアとして、リン脂質一重膜で覆われた構造をしている。脂質滴は、エネルギー源の貯蔵場所として機能することが知られている。近年、真核生物を利用したバイオディーゼルの生産や脂質滴の様々な機能について研究されているが、脂質滴の動態の分子機構、生理的意義については不明な点も多い。
これまでに、ほ乳類細胞においては、脂質滴の合成・分解とオートファジーとの関連が報告されている。特に、オートファジーに必要なタンパク質であるAtg8の機能が脂質滴形成に関与している。本研究では、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いて、Atg8の脂質滴動態への関与とその作用機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】野生株と*ATG8*破壊株との間のTAG量の比較、蛍光顕微鏡下における脂質滴動態の観察を行った。また、Atg8の脂質化の影響をみるために、Atg8の脂質化に必要な遺伝子である、*ATG3*、*ATG4*、*ATG7*各遺伝子破壊株における脂質滴の様子を蛍光顕微鏡で観察した。Atg8の脂質滴への局在を調べるために、mCherry-Atg8を発現させ、蛍光顕微鏡下で脂質滴への局在を調べた。酵母では、Tgl3、Tgl4、Tgl5という３種類のリパーゼが脂質滴に局在しており、必要に応じて脂質滴のTAGを分解していることが知られている。そこで、その3種類のリパーゼ遺伝子を欠損させたリパーゼ欠損株におけるAtg8の影響を上記と同様に検討した。さらに、脂質滴に局在するタンパク質であるSrt1にAtg8を融合させることで、脂質滴にAtg8を効率的に局在させた株を用いて脂質滴の様子を観察した。
【結果】野生株と比較して、*ATG8*破壊株においては、脂質滴の数、TAG量が減少していた。さらに、*ATG3*、*ATG4*、*ATG7*各破壊株においても脂質滴の数の減少が確認された。また、一部のmCherry-Atg8と脂質滴は共局在が確認された。したがって、Atg8はC末端の脂質化を伴って、細胞内の脂質滴動態を制御しているということが明らかとなった。さらに、リパーゼ欠損株においては、*ATG8*を破壊してもその影響はみられなかった。Atg8をSrt1との融合タンパク質として発現させると、Atg8の脂質化の有無に関わらず、脂質滴の巨大化が観察されたことから、Atg8の脂質滴の融合に関わっていることが示唆された。

Lipid droplet, *Saccharomyces cerevisiae*, Atg8

講演番号：3B19a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ B校舎19会場

IncP-7群プラスミドの接合伝達宿主域を規定する因子の探索

Investigation of factors that define conjugal transfer host range of IncP-7 plasmids

○瀬谷 学人、井上 慧、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大・院生命科学）
○Manato Seya, Kei Inoue, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda(Touhokudai)

IncP-7 群プラスミドは多くの芳香族化合物分解に関与し、主に *Pseudomonas* 属細菌を宿主とする狭宿主域性プラスミドで、本群の分解プラスミドである pDK1 と pCAR1 は自己接合伝達性を有する。これまでの研究から pCAR1 は供与菌の違いにより接合伝達可能な宿主域が異なること、pDK 1 は *P. putida* KT2440 株や F1 株には接合伝達できないが pDK1 の複製機能のみを持たせた mini plasmid は形質転換で導入・複製が可能であるなど、接合可能域より複製可能域が広いことが示唆されている。

本研究では *P. putida* KT2440 株に pCAR1 は接合伝達可能だが、pDK1 は接合伝達できないという現象に注目し、接合伝達宿主域を規定するプラスミド、あるいは供与菌・受容菌の因子の同定とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。まず供与菌として *P. fluorescens* を使用し両プラスミドの KT2440 株への接合伝達を試みた。pCAR1 は接合伝達できたが、pDK1 は接合伝達は検出されなかった。このことから供与菌よりも受容菌あるいはプラスミドに宿主域を規定する因子が存在する可能性が高いと推定された。それを受け、受容菌因子の探索を目的とし pDK1 が接合伝達可能となる KT2440 株突然変異の取得を試みている。また pCAR1 と pDK1 の接合伝達を担う領域の遺伝子配列を比較しプラスミド由来因子の候補として、pDK1 に存在せず pCAR1 にのみ存在する遺伝子領域を 3 カ所見いだした。これらの領域内の遺伝子はほとんど機能未知タンパク質をコードしていたが、中には KorB ドメインや ParB ドメインといったドメインを有してプラスミドの維持に関与すると想定されるタンパク質も認められ。現在これらの遺伝子領域を pDK1 を持つ供与菌または KT2440 株で発現させる系を作製し、pDK1 の接合伝達を試みている。

講演番号：3B19a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ B校舎19会場

植物病原糸状菌 *Rosellinia necatrix* における自律複製型ベクターを用いた新規実験系の開発

Transient and multivariate system for transformation of a fungal plant pathogen, *Rosellinia necatrix,* using autonomously replicating vectors

○清水　健雄、伊藤　伝、兼松　聡子（果樹研・リンゴ）
○Takeo Shimizu, Tsutae Ito, Satoko Kanematsu（Apple Research Station, NIFTS, NARO）

【目的】植物病原糸状菌である *Rosellinia necatrix* は、白紋羽病の原因菌であり、世界中に広く分布している。白紋羽病は、広範囲の果樹や樹木に感染しその根を腐らせ枯死させるという特徴を持ち、商業的に重要な作物に大きな被害を与える難防除土壌病害である。その病原性発現機構の解明は白紋羽病の防除法開発に貢献できると期待されるが、現在のところ明らかとなっていない。一般的に、植物病原糸状菌における病原性発現機構は、複数の因子が関与していると考えられ、*R. necatrix* においても多様な解析系が必要になると考えられる。そこで、本研究では、*R. necatrix* において、効率の良い、多面的な解析にも応用できる実験系を構築し、病原性発現機構の解明および白紋羽病の防除法の開発に貢献することを目指した。
【方法】*Aspergillus nidulans* 由来のAMA1 配列とハイグロマイシン耐性遺伝子を含むベクターpAMA-H を構築した。プロトプラストPEG 法を用いて*R. necatrix* W97 株へ形質転換を行い、ハイグロマイシンによりスクリーニングされた形質転換体の表現型を解析した。さらに、ジェネティシン耐性遺伝子、eGFP 遺伝子、mOrange2 遺伝子をそれぞれpAMA-H へ導入し、3 種類のベクターを用いてco-transformation を行った。ハイグロマイシンとジェネティシンによりスクリーニングされた形質転換体の表現型を解析し、co-transformation の有用性を調べた。
【結果】*R. necatrix* W97 株において、これまでゲノム挿入型ベクターでは0.5 transformants/ µg DNA 以下であった形質転換効率が、pAMA-H では最大52.8 transformants/ µg DNA まで上昇した。得られた形質転換体では、サザンハイブリダイゼーションにより、導入されたpAMA-H がゲノムに組み込まれることなく、プラスミド状態で維持されていることが明らかとなった。これにより、*R. necatrix* W97 株のゲノム構成を変えることなくDNA 断片の導入を行うことが可能となった。また、co-transformation の結果、スクリーニングにより得られた形質転換体の約45 % が3 種類全ての導入遺伝子を発現していることが明らかとなった。さらに、pAMA-H は形質転換体コロニーの中心部に分布しているにもかかわらず、その遺伝子産物は菌糸先端まで輸送されていることが確認された。この現象は、糸状菌において遺伝子産物を含めた物質の菌糸内細胞間輸送を理解する上で、非常に興味深い知見である。以上の結果から、*R. necatrix* において、効率的で多面的な解析が可能な実験系を構築することに成功した。

Keywords: Fungal plant pathogen, *Rosellinia necatrix*, Autonomously replicating vector,

講演番号：3B19a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ B校舎19会場

新規大腸菌−ビフィズス菌シャトルベクターの構築

Development of a novel *Escherichia coli-Bifidobacterium* shuttle vector

○小野寺 愛、平山 洋佑、阪中 幹祥、吹谷 智、片山 高嶺[1]、加納 康正[2]、横田 篤
（北大院農・応生科、[1]石川県大・資源研、[2]京都薬大・遺伝子工）
○Ai Onodera, Yosuke Hirayama, Mikiyasu Sakanaka, Satoru Fukiya, Takane Katayama[1], Yasunobu Kano[2], Atsushi Yokota (Hokkaido Univ., [1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Pharm. Univ.)

【目的】大腸菌-ビフィズス菌シャトルベクターを用いた形質転換は、ビフィズス菌の分子遺伝学的な解析に必須の技術である。これまでに開発された大腸菌-ビフィズス菌シャトルベクターは、一般に大腸菌の高コピープラスミドの*ori*（高コピー*ori*）を用いて構築されている。しかし我々のこれまでの研究の中で、高コピー*ori*を持つシャトルベクターでは、37℃で培養した大腸菌内で保持した際の構造変化（多量体化）が観察されている。また、ビフィズス菌遺伝子のクローニングが困難であるという現象も観察されている。そこで本研究では、大腸菌中程度コピー数プラスミドの*ori*（中コピー*ori*）を有するシャトルベクターを構築することで、これらの問題の解決を試みた。

【方法】まず、新規ベクターの構築を行った。pUC18由来高コピー*ori*を有するシャトルベクターpBS423からビフィズス菌内在性プラスミドpTB4由来の領域およびスペクチノマイシン（Sp）耐性遺伝子を含むDNA断片を、中コピー*ori*大腸菌プラスミドpACYC184からp15A*ori*を含むDNA断片を、それぞれ取得した。両断片の連結により新規シャトルベクターpBFO2を構築した。

37℃および30℃で一晩振盪培養した大腸菌から常法によりpBFO2を抽出し、pBFO2の構造変化が起きていないかをアガロースゲル電気泳動により検証した。ビフィズス菌の継代培養を行った際のベクターの保持率は、pBFO2を*Bifidobacterium longum* 105-A株に導入した*B. longum* 105-A/pBFO2株を用いて解析した。*B. longum* 105-A/pBFO2株の継代培養は1/2 MRS培地を用いて、12時間ごとに植え継ぎながら84時間（36世代）まで行った。培養12時間ごとに培養液の一部をSp添加1/2 MRS寒天培地とSp無添加1/2 MRS寒天培地へ塗沫した。また、36時間目と84時間目に塗沫したSp無添加1/2 MRS寒天培地に形成されたコロニーを、Sp添加1/2 MRS寒天培地にレプリカした。これらの培養により得られたコロニーの数から、ベクターの保持率を算出した。

【結果】大腸菌から抽出したpBFO2の電気泳動の結果から、30℃と37℃のどちらにおいてもベクターの構造変化が起きていないことが観察された。この結果から、中コピー*ori*としてp15A*ori*を導入することにより、大腸菌内での構造変化が生じにくいシャトルベクターを構築できることが明らかになった。*B. longum* 105-A/pBFO2株を用いて、継代培養を行った際のベクターの保持率を観察したところ、36世代までで100%の保持率を有することが認められた。このことから、pBFO2は継代培養の少なくとも36世代までは105-A株内で安定に保持されることが明らかになった。今後、高コピー*ori*でクローニングできないビフィズス菌遺伝子のクローニングを行い、クローニングによってベクターの構造変化が起こるかどうかを検証する予定である。

Bifidobacterium, shuttle vector, plasmid stability

講演番号：3B19a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ B校舎19会場

Bifidobacterium longum 105-Aにおける*pyrE*遺伝子の選択マーカーとしての利用

The *pyrE* gene as a bidirectional selection marker for *Bifidobacterium longum* 105-A

○坂口　広大、鈴木　徹 (岐阜大院・連農)
○ Kouta Sakaguchi, Tohru Suzuki (Gifu University)

【目的】

ビフィズス菌が有する諸性質、機能、生命現象などを解明するためには、効率的な形質転換法や遺伝子破壊法などの逆遺伝学的アプローチが必要である。しかしながら、ビフィズス菌における効率的な遺伝子破壊法の構築は未だ発展途上にある。本研究では、*pyrE*遺伝子を選択マーカーとして用いた効率的な遺伝子破壊法の構築を試みた。また、ビフィズス菌の最少培地を作製し、*pyrE*遺伝子破壊株の表現型の確認に用いた。

【方法・結果】

*pyrE*遺伝子に隣接する上流および下流の1.0 kbの配列をPCRによって増幅した。これらをoverlap PCRを用いて連結後、PCR産物をビフィズス菌-大腸菌シャトルベクターであるpKKT427に挿入した。作製したプラスミド(pKKT427-*ΔpyrE*)を用いて*Bifidobacterium longum* 105-Aを形質転換した。形質転換体を5-fluoroorotic acid (5-FOA)を含むMRS寒天培地で培養し、5-FOAに耐性を示す*pyrE*遺伝子破壊株 (*B. longum* 105-A *ΔpyrE*)の選択を行った。結果、ダブルクロスオーバーの相同組換えが起きた遺伝子破壊株が4.7×10^{-5}の頻度で取得できた。

B. longum 105-A *ΔpyrE*が示すウラシル要求性をMRS寒天培地を用いて調べたが、要求性は確認できなかった。そこで、ビフィズス菌の最少培地 (*Bifidobacterium* Minimal Medium; BMM)を作製した。BMM寒天培地を用いて調べた結果、*B. longum* 105-A *ΔpyrE*はウラシル要求性を確認することができた。

また、*pyrE*遺伝子をポジティブ選択マーカーとして利用するために、*pyrE*遺伝子の相補を行った。*B. longum* 105-Aの*pyrE*遺伝子をPCRを用いて取得し、pKKT427-*pyrE*$^{+}$を作製した。このプラスミドを *B. longum* 105-A *ΔpyrE*に導入し、*B. longum* 105-A *ΔpyrE*/pKKT427-*pyrE*$^{+}$を作製した。BMM寒天培地で培養した結果、*pyrE*遺伝子を持つ形質転換体はBMM寒天培地で生育が確認できた。

得られた結果から、効率的な遺伝子破壊を行うために、*pyrE*遺伝子は選択マーカーとして利用可能であることが考えられた。

B. longum 105-A, selection marker, minimal medium

講演番号：3B19a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ B校舎19会場

タイトル　ビフィズス菌の薬剤耐性マーカーのためのクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の分子育種

Title　Molecular breeding of chroramfenicol acetyltransferase gene as a selection marker in *Bifidobacterium*

林 彦亮[1]、賀 建龍[2]、○鈴木 徹[2]（[1]岐阜大・院・応用生物、[2]岐阜大・院・連農）

Lin Yanliang, He Jianlong, ○Tohru Suzuki (Gifu Univ.)

【目的】ビフィズス菌の遺伝工学に対して、使える選択マーカーの多様性が遺伝子のknockoutsや相同組換等に必要がある。ビフィズス菌においてクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT) 遺伝子がマーカーとして使われている。しかし、その発現レベルが低いため、明確な実験結果が得にくい現状にある。ビフィズス菌において、CAT遺伝子を実用性の高いマーカー遺伝子とするために、遺伝子とプロモーターの選択を行い、発現レベルの向上を目指した。

【方法】ビフィズス菌のシャトルベクターpKKT427に*Escherichia coli*と*Staphylococcus aureus*のCAT遺伝子を導入した。その一方、二つCAT遺伝子の上流の遺伝子をビフィズス菌のヒストン様タンパク質 (HU) の遺伝子 *hup*のプロモーターに取り換え、四種類のCAT遺伝子を含むプラスミドを作った。これらのプラスミドを用いビフィズス菌を形質転換し、形質転換体のchloramphenicol(Cm)耐性と、CATの活性を調べる。耐性と酵素活性の解析より、ブフィズス菌において最も効率が高いCAT遺伝子コンストラクトを選別した。

【結果】 液体培養の場合、野生型の*B. longum* 105Aは、2 μg/ml以上のCmで生育阻害を示したが、固体培養の場合は、Cm１μg/ml以下生育が阻害された。

*S. aureus*と*E. coli*のCAT遺伝子CAT_{SA}、CAT_{EC}を本菌に導入したところ、２日間の固体培養において、CAT_{SA}では、8 *μg/ml* CAT_{EC}では1 μg/mlの濃度までコロニーを形成した。これらの遺伝子の上流を*hup*プロモーターに変更した$hpCAT_{SA}$と$hpCAT_{EC}$を作製したところ、$hpCAT_{SA}$では、12 μg/ml $hpCAT_{EC}$では、2 μg/mlまでコロニーを形成した。

これら株を固体培養後集菌し、細胞抽出液中のCAT活性を、測定したところ、CAT_{SA}、CAT_{EC}では、検出限界以下（<0.01 μkat/mg）であったが、$hpCAT_{SA}$ では、液体培養の場合が0.97 μkat/mg、固体培養の場合が2.59 μkat/mgであった。また、$hpCAT_{EC}$では、液体培養の場合が0.33 μkat/mg、固体培養の場合が1.22 μkat/mgであった。

以上の結果から、*B. longum* 105-A株においては、*S. aureus*由来のCAT遺伝子に*B. longum* の*hup*プロモーターを連結した、$hpCAT_{SA}$が、最も強く発現した。固体培養と液体培養において、その発現量は大きく異なった。また、Cmを用いた培養において、$hpCAT_{SA}$が選択マーカーとして使用可能であることが示された。

Keywords: *Bifidobacterium*, selection marker, chloramphenicol

講演番号：3B19a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ B校舎19会場

*Lactobacillus plantarum*における細胞壁テイコ酸糖修飾遺伝子の解析

Analysis of wall teichoic acid glycosyltransferase of *Lactobacillus plantarum*

○磯貝 夏海[1]、田中 尚人[2]、佐藤 英一[1]、岡田 早苗[1]　([1]東農大応生科・化学、[2]東農大・菌株)

○Natsumi Isogai[1], Naoto Tanaka[2], Eiichi Satoh[1], Sanae Okada[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr., [2]NRIC, Tokyo univ. Agr.)

【目的】細胞壁テイコ酸(以下テイコ酸)はグラム陽性細菌の主要な細胞壁多糖であり、ポリオールリン酸から成る主鎖への糖修飾の数・位置の違いにより、菌種や菌株間で多様な構造を示す事が知られている。乳酸菌*Lactobacillus plantarum*においても、テイコ酸の構造解析により、糖の修飾位置の差異から6つの構造タイプに分類される事が明らかとなった[1)]。

現在、テイコ酸糖修飾遺伝子として、*Bacillus subtilis*の*tagE*や*Staphylococcus aureus*の*tarM*等が確認されており、これらは主鎖の各ユニットの同一位置に対して糖を転移する反応を行う事が知られている。*L. plantarum*のテイコ酸糖修飾に関しても同様の機能を持つ遺伝子が存在すると考え、我々は既知のテイコ酸糖修飾遺伝子の知見をもとに、*L. plantarum*の糖修飾遺伝子のテイコ酸構造差への影響を調査した。

【方法と結果】*L.plantarum* WCFS1の公開ゲノム上から、既知のテイコ酸糖修飾遺伝子である*tagE*や*tarM*と相同性の高い遺伝子を探索した結果、*L.plantarum*には糖修飾遺伝子として、他菌種とに見られない多数のホモログ（*tagE1*～*tagE6*)が存在することが確認された。各遺伝子のアミノ酸配列より機能ドメインを予測したところ、6遺伝子全てに糖転移活性ドメインと機能未知のDFU1975ドメインの存在が認められた。この特徴は、*tagE*や*tarM*と非常に類似していることから、*tagE1*～*tagE6*はテイコ酸に対する糖修飾遺伝子である事が強く示唆された。そこで、*tagE1*～*tagE6*の発現量をqRT-PCRにより定量し、菌株間での比較を行った。その結果、全ての菌株で発現の低い遺伝子や、テイコ酸の構造タイプ間で発現量の大きく異なる遺伝子が複数確認された。このような発現量に差が認められた遺伝子がテイコ酸の糖修飾に違いをもたらしていると考え、発現ベクターへのクローニングの後、遺伝子の高発現系を構築した。取得した各遺伝子の高発現株よりテイコ酸を抽出・精製し、核磁気共鳴法(NMR法)を用いた構造解析を行ったところ、細胞壁テイコ酸の糖修飾の位置への変化は認められなかった。よって、*L.plantarum*におけるテイコ酸は、6つの糖修飾遺伝子の発現量の制御ではなく、他の因子の影響によりその構造が決定されていると考えられた。

1)冨田　理　日本乳酸菌学会誌　20巻2号73頁(2009)

wall teichoic acid, glycosyltransferase, *Lactobacillus plantarum*

講演番号:3B19a07
講演日時、会場:3月24日10:16～ B校舎19会場

水田土壌脱窒細菌*Azoarcus* sp. KH32C株のゲノム解析から見出されたポリケチド合成遺伝子の系統解析

Phylogenetic analysis of type I polyketide synthase gene found by the genome sequence analysis of a denitrifying soil bacterium *Azoarcus* sp. KH32C

○西澤 智康[1]、藤井 大地[1]、多胡 香奈子[1,2]、石井 聡[1,3]、大塚 重人[1]、大島健志朗[4]、服部正平[4]、妹尾 啓史[1]（[1]東大院・農生科、現 [2]農環研、現 [3]北大院工、[4]東大院・新領域）

○Tomoyasu Nishizawa[1], Daichi Fujii[1], Kanako Tago[1,2], Satoshi Ishii[1,3], Shigeto Otsuka[1], Kenshiro Oshima[2], Masahira Hattori[2], Keishi Senoo[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo, present [2]NIAES, present [3]Grad. Sch. of Engineer., Hokkaido Univ., [4]Grad. Sch. of Front. Sci.)

これまでに我々は日本各地の水田土壌からFunctional Single Cell 分離法を用いて多様な脱窒細菌を分離してきた。分離株の中から高いN_2O還元能を有し畑土壌からのN2O発生低減化への応用が有望な菌株として選抜した*Azoarcus*属KH32C株について、そのゲノム全塩基配列を決定し、ゲノム解読情報から土壌生態系における生理生態的特性について推測した。ゲノム情報から、脱窒に関与する遺伝子群以外に２つの窒素固定酵素(Nif)クラスターと窒素固定に関与する脱水素酵素（HupSL、HoxHYUF）が見出され、さらに細胞間コミュニケーションの役割を果たすと推定されるタイプ4線毛生合成遺伝子やdicarboxylate transport (Dct) system が同定され、KH32C株は植物共存細菌の性質を有する可能性が示された。ゲノム解読された窒素固定エンドファイト（イネ科植物根内部共生）*Azoarcus*属BH72株との比較ゲノム解析の結果、多数の相同する遺伝子が見つかったが、BH72株で見出された共生に必須なendoglucanase遺伝子はKH32C株では同定できなかった。一方、マメ科植物エンドファイト（根粒菌）の*Sinorhizobium*属で共生に関与することが示されている莢膜多糖（capsular polysaccharide, CPS）の合成遺伝子群がKH32C株に見出された。そこで、本研究ではCPS合成遺伝子の系統解析によりKH32C株の多糖合成系の特徴について検討した。

KH32C株のCPS合成遺伝子群（約37-kb）には、ポリケチド合成酵素（*rkpA*）遺伝子、5つの糖転移酵素およびCPS排出トランスポーター（*rkpRSTU*）が見つかった。これまでに見つかっている細菌のCPS合成遺伝子群とのアライメントの結果、遺伝子配置や構成はそれぞれ異なる場合が多かったが、CPS合成に必要と考えられる遺伝子は揃っていた。また、*rkpA*（約7.6-kb）のドメイン検索から、KS,AT,DH,ER,KR,ACPの各ドメインをもつタイプI型ポリケチドのモジュールであり、*Nitrosomonas europaea*のそれと66%の類似性が示された。しかし、これまでにそのCPS化合物は同定されていない。以上の結果から、ゲノム解読によりKH32C株は、ポリケチド鎖と複数の糖を有するCPSを合成している可能性が示唆され、BH72株とは異なる植物相互作用の特性をもつと考えられた。

本研究は生研センターイノベーション創出事業の支援を受けた。

Azoarcus, denitrifying bacateria, polyketide

講演番号：3B19a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ B校舎19会場

ポリリン酸蓄積を安定化する復帰変異株の解析

Analysis of the mutation that relieves instability of polyphosphate accumulation in bacteria

○廣田　隆一、中井　茂人、本村　圭、池田　丈、黒田　章夫（広島大院・先端研）
○Ryuichi HIROTA, Shigeto NAKAI, Kei MOTOMURA, Takeshi IKEDA and Akio KURODA
（Hiroshima Univ.）

【目的】無機リン酸のポリマーであるポリリン酸は、バクテリアから高等生物にまで存在し、その鎖長は最大で700 程度にのぼる。大腸菌をはじめとする多くのバクテリアでは、リン酸レギュロンの抑制因子である PhoU に変異が生じると恒常的に多量のポリリン酸が蓄積される。この *phoU* 変異株を利用して、近年枯渇することが懸念されているリンを環境中から回収することが期待されている。しかし、*phoU* 変異株は著しく安定性に乏しく、LB(Luria-Bertani)培地などの複合培地で継代培養を行うと、急速にポリリン酸を蓄積しない復帰変異株（リバータント）を生じる。そのため、このリバータントの発生を抑えた安定な *phoU* 変異株の取得が望まれる。本研究では、PhoU リバータントのターゲットとなるゲノム上の変異点を解析し、リバータント発生の原因を探ると共にポリリン酸蓄積を安定化する方法論の確立を試みた。

【方法・結果】これまでに、PhoU リバータントに生じる変異はリン酸輸送体 Pst とリン酸レギュロンの転写因子 PhoB がターゲットであることが確認された。このうち、PhoB をターゲットとしたリバータント（$phoU_{revB}$）の変異点解析を行い、$phoU_{revB}$ には変異のタイプが異なるバリアントが多数存在する事を明らかにした。さらに、非常に興味深いことに、これらのバリアントの中には、グルコースを炭素源とした完全合成培地（MOPS 培地）中で、著量のポリリン酸蓄積を示すものが存在した。この $phoU_{revB}$ は点変異による PhoB の部分的な構造変化によって、PhoR-B 二成分制御系シグナルの受容形式あるいは転写機構が変化していると推察された。さらに、この $phoU_{revB}$ は MOPS 培地中で継代を繰り返しても安定してポリリン酸の蓄積を示した。従って、$phoU_{revB}$ の変異型 PhoB の制御機構を解析することにより、ポリリン酸蓄積の安定化メカニズムが明らかになると考えられる。

polyphosphate, mutation, *phoU*

講演番号：3B19a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ B校舎19会場

オーラシンアルカロイドに抗菌活性を付与するシトクロムP450

A cytochrome P450 involved in the expression of an antibiotic activity of aurachin alkaloid

○安武 義晃[1]、北川 航[1]、西岡 大樹[2]、尾崎 太郎[3]、西山 真[3]、葛山 智久[3]、田村 具博[1,2]（産総研・生物プロセス、[1]北大・農、[2]東大・生物工学セ）

○Yoshiaki Yasutake[1], Wataru Kitagawa[1], Taiki Nishioka[2], Taro Ozaki[3], Makoto Nishiyama[3], Tomohisa Kuzuyama[3], Tomohiro Tamura[1,2] ([1]Bioproduction Res. Inst., AIST, [2]Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ., [3]Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo)

【目的】抗生物質の探索および開発は、多剤耐性菌や新たな病原菌への備えとして現在でも極めて重要である。近年、放線菌*Rhodococcus erythropolis* JCM6824株より新規抗菌物質が単離され、オーラシンREと命名された。本物質は主として広範囲のグラム陽性菌および一部のグラム陰性菌に強い抗菌活性を示す。オーラシン骨格は1980年代に既に発見されているが、今回のオーラシンRE単離までの間には一度も類縁体の報告例がなく、またその生合成過程も明らかではない。オーラシンはメナキノンと類似の骨格を持ち、バクテリアの呼吸鎖を阻害することで抗菌活性を発揮すると考えられている。本研究に先行して、*R. erythropolis*ゲノム上のオーラシンRE生合成遺伝子クラスターの同定に成功し、遺伝子破壊株を用いた実験が行われた。その結果、オーラシンREが抗菌活性を発揮するためには、あるシトクロムP450酵素が必須であることが明らかになった。本研究では、オーラシンREの抗菌活性発現に重要な部位を特定するため、このシトクロムP450の基質がどのような構造の物質であり、どのような反応を触媒するのか解析を行った。

【方法】P450遺伝子を破壊した*R. erythropolis* 株を大量培養し、培地中に蓄積した不活性なオーラシンRE前駆体を抽出精製した。この抽出物の構造をNMR法により解析した。また、大腸菌を用いて組替えP450を取得し、組換えP450およびオーラシンRE前駆体を用いた基質結合スペクトルアッセイ、適切な電子伝達系を用いた再構成系による酵素アッセイを行い、生成物の同定および酵素活性を測定した。

【結果】不活性オーラシンRE前駆体は、オーラシンREのキノリン環窒素に水酸基が存在しない物質であることが明らかになり、また酵素反応によってこの前駆体の窒素に水酸基が挿入され、オーラシンREに変換されることを確認した。このことから、オーラシン類が抗菌活性を示すには、キノリン環窒素の水酸化が極めて重要であることが示唆された。また、本P450は既に知られているP450ファミリーの中に高いアミノ酸配列の相同性を示すグループがなく、最も近縁と考えられるCYP164ファミリーに属するP450との間でも、配列相同性は32%程度である。現在、本P450の構造および基質認識機構を理解するため、結晶構造解析にも取り組んでいる。

cytochrome P450, aurachin alkaloid, antibiotics

講演番号：3B19a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ B校舎19会場

タイトル　*Ralstonia pickettii* DTP0602株の2,4,6-トリクロロフェノール分解酵素遺伝子群の転写制御機構の解明

Title The Regulation Mechanism of 2,4,6-Trichlorophenol Catabolic Operon Transcription in *Ralstonia pickettii* DTP0602

○鳥居　英人、矢部　博敬[1]、八田　貴[1]、原　啓文[1]、滝澤　昇（岡山理大院工・システム科学、[1]岡山理大工・生体医工）

○Hideto Torii, Hirotaka Yabe[1], Takashi Hatta[1], Hirofumi Hara[1], Noboru Takizawa (Dept. Sys. Sci., Okayama Univ. of Sci., [1]Dept. Biomedical. Eng., Okayama Univ. of Sci.)

【緒言】*Ralstonia pickettii* DTP0602 株は、2,4,6-トリクロロフェノール（2,4,6-TCP）を唯一の炭素源として代謝できる土壌細菌である。これまでに、我々は 2,4,6-TCP 初発水酸化酵素遺伝子（*hadA*）を含む *hadE-C* オペロンと、その上流に位置する LysR 型転写制御遺伝子（*hadR*）を同定し分解機構と転写制御機構を解析してきた。*hadR* 遺伝子破壊株を作製し 2,4,6-TCP 代謝能と *hadA* の mRNA 量を調べたところ、2,4,6-TCP 代謝能を欠損し 2,4,6-TCP によって *hadA* の mRNA が誘導されなかったことから、HadR は 2,4,6-TCP 代謝に必須な転写活性化因子であった。さらに、精製 HadR を用いたゲルシフトアッセイの結果より、HadR は 2,4,6-TCP を補因子として *hadE* プロモーター上流領域に結合することが示された。一方、2,4,6-TCP を唯一の炭素源として培養した時に野生株は増殖と同時に 2,4,6-TCP を代謝したが、2,4,6-TCP とコハク酸を炭素源として培養した時には定常期より 2,4,6-TCP を代謝した。以上の結果、DTP0602 株の 2,4,6-TCP 分解にはコハク酸が関与する転写制御機構が存在していると考えられた。そこで、本研究では DTP0602 株の 2,4,6-TCP 分解酵素遺伝子群の転写制御機構の解析を目的とした。

【結果・考察】野生株を用いてコハク酸のみ、2,4,6-TCPのみ、2,4,6-TCPとコハク酸の存在下で培養し*hadA*のmRNA量を測定した。コハク酸のみの存在下に比べて、2,4,6-TCPのみの存在下では約2000倍量、2,4,6-TCPとコハク酸の存在下では約20倍量のmRNAが転写されていたことから、2,4,6-TCP代謝の遅れは*hadE-C*オペロンの転写誘導の違いによって引き起こされていることが示された。*hadA*の転写と同様にコハク酸が関与する転写制御機構の1例として、*Acidovorax* sp. KKS102株の*bph*オペロンにおける転写制御機構が解析・報告されている。*bph*オペロンの転写は2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acidを補因子として負に制御するGntR型転写制御因子BphSと、正に制御する2成分制御系のBphP, Qが関与している。DTP0602株のドラフトゲノム内を検索したところBphP,Qと46%, 69%の相同を示すORFが存在しており、それぞれのORFを*hadP*, *hadQ*と命名した。そこで、*hadQ*遺伝子破壊株を作製し2,4,6-TCPを唯一の炭素源として培養し*hadA*のmRNA量を測定したところ、野生株の*hadA*のmRNA量に比べて約1/3まで低下したことから、HadQは*hadE-C*オペロンの転写活性化因子であることが示された。以上の結果から、DTP0602株の2,4,6-TCP分解酵素遺伝子群の転写制御機構には、活性化因子と抑制因子が関与している*bph*オペロンの例とは異なり、2つの転写活性化因子（HadR, Q）が関与していることが明らかになった。

Trichlorophenol, Two component regulatory system, Succinate

講演番号：3B19a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ B校舎19会場

Sphingobium sp. SYK-6株におけるリグニン由来ビフェニル化合物の脱メチルシステム
Characterization of the O Demethylation System for Lignin-Derived Biphenyl Catabolism in *Sphingobium* sp. Strain SYK-6

○鈴木 一也、並木 仁宏、上村 直史、笠井 大輔、大塚 祐一郎[1]、中村 雅哉[1]、片山 義博[2]、福田 雅夫、政井 英司（長岡技科大・生物、[1]森林総研、[2]日大・生資科）
○Kazuya Suzuki, Masahiro Namiki, Naofumi Kamimura, Daisuke Kasai, Yuichiro Otsuka,[1] Masaya Nakamura,[1] Yoshihiro Katayama,[2] Masao Fukuda, Eiji Masai (Nagaoka Univ. Tech., [1]FFPRI, [2]Nihon Univ.)

【目的】様々なリグニン由来の二量体化合物を分解する *Sphingobium* sp. SYK-6 株は、ビフェニル化合物の 5,5′-デヒドロジバニリン酸 (DDVA)を脱メチルし、その後、芳香環開裂、側鎖開裂と脱炭酸を経てバニリン酸に変換し、最終的にプロトカテク酸 4,5-開裂経路によって代謝する。SYK-6 株による DDVA 代謝については、脱メチル以降に関与する酵素遺伝子の構造と機能が明らかにされている。一方、DDVA の脱メチルについては、オキシゲナーゼと相同性を示す *ligXa* が関与することからオキシゲナーゼシステムであると推定されているが、電子伝達成分は明らかにされていない。本研究では DDVA の脱メチルに関わる酵素システムの解明を目的とした。
【方法】SYK-6 株の全ゲノム配列情報から、本脱メチル酵素が、オキシゲナーゼ (LigXa)、フェレドキシン (Fdx)、Fdx レダクターゼ (FdR)から構成される多成分オキシゲナーゼであると予測した。推定された各遺伝子を相同組換えによって破壊し、DDVA での生育能を調べた。His-tag 融合 *ligXa*, Fdx, FdR の各遺伝子を大腸菌にて発現させ、各成分を精製した。DDVA 脱メチル活性の再構成実験は、精製した LigXa, Fdx, FdR を NADH 存在下で DDVA と反応させることで行った。DDVA の分解活性は HPLC および LC-MS 分析によって調べた。
【結果】農薬である dicamba の脱メチルシステムは、オキシゲナーゼ、Fdx、FdR の 3 成分から構成されることが報告されている (Herman et al., 2005)。SYK-6 株のゲノム配列中に dicamba 脱メチル酵素の Fdx および FdR 遺伝子とそれぞれ相同性を示す *ligXc1*、*ligXc2* および *ligXd1*、*ligXd2* を見出した。これら遺伝子と *ligXa* を破壊し、DDVA での生育能を調べた結果、*ligXa*、*ligXc1*、*ligXd1* の破壊株において生育能の欠損が見られ、DDVA の脱メチルにこれら遺伝子が関与することが示唆された。LigXc1 は大腸菌組換え体での発現量が極めて低かったため、DDVA 脱メチル活性の再構成実験には、LigXc1 と 65%の相同性を示す LigXc2 を用いた。精製した LigXa、LigXc2、LigXd1 を用いて DDVA 脱メチル活性の再構成実験を行った結果、3 成分を混合した場合においてのみ、DDVA の分解と脱メチル産物の蓄積が観察された。以上の結果から、DDVA の脱メチルシステムがオキシゲナーゼ、Fdx、FdR の 3 成分で構成されることが明らかとなった。
本研究の一部は、農林水産省「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発（マテリアル）」により実施された。

lignin, *o*-demethylase, non-heme iron oxygenase

講演番号：3B19a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ B校舎19会場

Sphingobium sp. SYK-6株のフェニルクマラン型リグニン二量体化合物代謝系遺伝子の単離と解析
Characterization of the Dehydrodiconiferyl Alcohol Catabolic Genes in *Sphingobium* sp. Strain SYK-6

○高橋 健司、上村 直史、笠井 大輔、菱山 正二郎[1]、原 啓文[2]、梶田 真也[3]、片山 義博[4]、福田 雅夫、政井 英司（長岡技科大・生物、[1]森林総研、[2]岡山理大工・生体、[3]東農工大院・BASE、[4]日大生資科）
○Kenji Takahashi, Naofumi Kamimura, Daisuke Kasai, Shojiro Hishiyama,[1] Hirofumi Hara,[2] Shinya Kajita,[3] Yoshihiro Katayama,[4] Masao Fukuda, Eiji Masai (Nagaoka Univ. Tech., [1]FFPRI, [2]Okayama Univ. Sci., [3]Tokyo Univ. Agric. Tech., [4]Nihon Univ.)

【目的】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、さまざまなリグニン二量体化合物を唯一の炭素源・エネルギー源として生育できる。本株のリグニン分解酵素遺伝子を植物のリグニン構造の改変に利用することで、バイオ燃料生産に適した脱リグニンが容易な植物を作出できる可能性がある。リグニン生合成の初期にβ-アリールエーテル、フェニルクマラン、ピノレジノールが主要な二量体として生成することから、これらの分解遺伝子は、植物中のリグニン変換に有用であると考えられる。本研究では、分解酵素遺伝子に関する知見がほとんどないフェニルクマランの代謝に着目し、本代謝系に関与する酵素遺伝子の同定と機能解明を目的とした。これまでにフェニルクマラン型二量体化合物の dehydrodiconiferyl alcohol (DCA) は、B 環側鎖 Cγ位アルコールがカルボン酸に酸化された後、A 環側鎖の Cγ位の脱離、Cα-Cβ開裂を経て代謝されることが予想されている (Habu et al., 1988)。
【方法】DCA の B 環側鎖の酸化には、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) とアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) が関与すると推定された。ADH 遺伝子は *Pseudomonas putida* に構築した SYK-6 株の遺伝子ライブラリーから単離し、ALDH 遺伝子はゲノム情報を基に作製した ALDH 遺伝子発現ライブラリーから選別した。各遺伝子産物の酵素活性の検出と反応産物の同定は HPLC および LC-MS を用いて行った。また、DNA マイクロアレイ解析によって DCA 培養時に特異的に誘導される遺伝子をゲノムから探索した。
【結果】SYK-6 株の遺伝子ライブラリーから DCA 変換能を示す 3 つの ADH 遺伝子を単離した。その内の 1 つを大腸菌で発現させ、DCA 変換活性を調べた結果、B 環側鎖 Cγ位がアルデヒドに変換されたと推定される compound I の生成が観察された。SYK-6 株の 17 個の ALDH 遺伝子を大腸菌で発現させ、各遺伝子産物の compound I 変換活性を調べた結果、9 個の遺伝子において B 環側鎖 Cγ位がカルボン酸に変換された化合物 (compound II) の生成が示唆された。compound II の分解遺伝子を単離するために、DNA マイクロアレイ解析を行い、DCA 培養時に特異的に誘導される遺伝子を同定した。現在、候補遺伝子の破壊株を作製し、compound II 分解への関与を調べている。

本研究は NEDO バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発（先導技術開発）の助成を受けて行われたものである。

lignin, phenylcoumaran, *Sphingobium*

講演番号：3B19a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ B校舎19会場

Sphingobium sp. SYK-6株におけるフェルラ酸分解遺伝子の転写制御機構

Transcriptional Regulation of the Ferulic Acid Degradation Genes of *Sphingobium* sp. Strain SYK-6

谷 健太、笠井 大輔、○上村 直史、梅田 周佑、福田 雅夫、政井 英司（長岡技科大・生物）
Kenta Tani, Daisuke Kasai, ○Naofumi Kamimura, Shusuke Umeda, Masao Fukuda, Eiji Masai (Nagaoka Univ. Tech.)

【目的】*Sphingobium* sp. SYK-6株は、様々なリグニン由来の二量体および単量体化合物を唯一の炭素源、エネルギー源として生育する。これら化合物の一つであるフェルラ酸は、SYK-6株においてferuloyl-CoA synthetase (FerA)によりferuloyl-CoAに変換された後、feruloyl-CoA hydratase/lyase (FerB)によりバニリンへと分解される。*ferB*と*ferA*は同一の転写方向で隣接して存在し、*ferB*の上流には*ferBA*と異なる転写方向でMarR型転写制御因子と相同性を示す*ferC*が存在する。しかし*ferBA*の転写制御に関する知見は得られていない。本研究では*ferC*が関与すると推定されるフェルラ酸分解遺伝子の転写制御機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】フェルラ酸存在下または非存在下で培養したSYK-6株と*ferB*、*ferA*、*ferC*の各遺伝子破壊株から単離した全RNAを鋳型に用いてreverse transcription (RT)-PCR解析を行った。転写開始点の決定は、*ferB*上流から内部領域を含むプラスミドを導入したSYK-6株から単離した全RNAと*ferB*の開始コドン直下流に結合する蛍光標識プライマーを用いてプライマー伸長法によって行った。ゲルシフト解析は、精製したHis-tag融合FerCとジゴキシゲニン(DIG)標識したDNA断片を用いて行った。DNA-タンパク質複合体をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、検出は抗DIG抗体と化学発光基質を用いて行った。
【結果】フェルラ酸分解遺伝子のRT-PCR解析の結果、*ferB*と*ferA*はオペロンを形成することが示された。*fer*オペロンの転写量を定量的RT-PCRにより測定した結果、本オペロンの転写はフェルラ酸存在下での培養時に誘導されることが明らかとなった。一方、*ferC*破壊株では、*fer*オペロンの転写量がフェルラ酸非存在下においてもフェルラ酸存在下と同等であったことから、*ferC*は本オペロンの転写を負に制御することが強く示唆された。また、*ferA*破壊株および*ferB*破壊株を用いた転写量の解析から、フェルラ酸の代謝中間体であるferuloyl-CoAが*fer*オペロンの誘導物質であることが示唆された。プライマー伸長法により*fer*オペロンの転写開始点を同定した結果、*ferB*開始コドンから30塩基上流のチミン残基であることが示された。*ferB-ferC*遺伝子間領域を含むDNA断片をプローブに用いたゲルシフト解析から、FerCが本オペロンの転写開始点上に存在するインバーテッドリピート配列に結合することが示され、本領域にFerCが結合し*fer*オペロンの転写を制御することが示唆された。

transcriptional regulation, lignin, ferulic acid

講演番号：3B19p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ B校舎19会場

海洋由来のグラム陽性*Terrabacter* sp. OC11株が有するカルバゾール分解遺伝子の解析

Analysis of carbazole degradation genes from a marine isolated gram-positive carbazole degrader *Terrabacter* sp. strain OC11

○大場 進太郎[1]、前田 臨太郎[2]、鈴木 敏弘[3]、岩田 健一[1]、大森 俊雄[1]（[1]芝工大・シ工・生科、[2]芝工大院・工・応化、[3]芝工大院・地域環境システム）

○Shintaro Oba[1], Rintaro Maeda[2], Toshihiro Suzuki[3], Keniti Iwata[1] Toshio Omori[1] ([1]Department of Biosci. and Eng. Shibaura Inst. Tech. [2]Grad. School of Applied Chemistry, Shibaura Inst. Tech. [3]Grad. school of Regional Environment Systems, Shibaura Inst. Tech.)

【目的】カルバゾール（CAR）は難分解性の含窒素複素環式化合物である。現在までに微生物を利用した環境浄化技術の開発とともに、陸性環境から多数の細菌が単離されてきた。グラム陰性細菌では*Pseudomonas resinovorans* CA10、グラム陽性細菌では*Nocardioides aromaticivorans* IC177などが報告されている。そして、CAR分解遺伝子群（Car cluster）は、その構造、機能、および酵素活性に関連して広く研究されてきた。一方、海洋から単離されたCAR分解細菌の報告は少ない。現在までの研究で、グラム陰性細菌OC7株[1)]やOC9株[2)]などが単離され研究されている。しかしながら、海洋由来でグラム陽性細菌のCAR分解細菌が単離されたという報告はない。よって、海洋由来のグラム陽性細菌の単離、他の海洋由来の細菌やIC177株とのCar clusterの比較に興味が持たれる。本研究では、海洋由来でグラム陽性細菌のCAR分解細菌として初めて単離されたOC11株のCar clusterの遺伝子配列を解析し、その特色を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】OC11株は千葉県で採取した海水からCARを唯一の炭素源とした培地で分離された。本菌の16S rRNAは*Terrabacter* sp.P27-11と99%の相同性を示したことから、*Terrabacter* sp.OC11と同定した。また、既知のCAR分解細菌の中ではIC177株の16S rRNAと89%の相同性を示した。さらに、系統樹解析からOC11株とIC177株は同じグループに属していることが分かった。Car clusterを検出するため、すでに解析されたCAR分解細菌のCar clusterを基にした縮重プライマーを作成した。このプライマーを用いたPCRにより、CAR分解に関与すると思われる遺伝子クラスターの全体の約80%を決定した。このクラスターのCAR分解への関与を調べるために、野生株とCAR分解能欠損変異株のtotal DNAを用いてPCRを行った。これにより、野生株でのみ増幅が見られたためCar clusterであると同定された。Car clusterは、*carAa,carAc,carAd*（初発酸化酵素）と*carBa-Bb*（メタ開裂酵素）と*carC*（加水分解酵素）から構成され、IC177株のCar clusterの並びは*carAaCBaBbAcAd*であり、OC11株も同様の並びであった。またOC11株のCar clusterの各遺伝子はIC177株の各遺伝子とアミノ酸レベルで高い相同性を示した。CAR分解細菌ではクラスター内の遺伝子の並び方や重複にはいくつかのパターンがある。Car clusterの並び、相同性からOC11株はIC177株と類似していることから、グラム陽性細菌間で遺伝子の受け渡しがある可能性が示唆された。現在、他の難分解性物質の分解能についても検討している。
【参考文献】[1)]Maeda *et.al. Curr Microbiol.* (2009). [2)]Ito *et.al. Biotechnol Lett.* (2010)

carbazole, gram-positive, marine bacteria

講演番号：3B19p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ B校舎19会場

陸生･海洋性細菌のカルバゾール分解系遺伝子構造の解析と比較

Analysis and comparison of carbazole-degradation gene structures from terrestrial and marine bacteria.

○千葉 翔子[1]、前田 臨太郎[2]、鈴木 敏弘[3]、岩田 健一[1]、大森 俊雄[1]（[1]芝工大・シ工・生科、[2]芝工大院・工・応化、[3]芝工大院・地域環境システム）

○Shoko Chiba[1], Rintaro Maeda[2], Toshihiro Suzuki[3], Kenichi Iwata[1] Toshio Omori[1] ([1]Department of Bioscience and Engineering, Shibaura Institute of Technology, [2]Graduate School of Applied Chemistry, Shibaura Institute of Technology, [3]Graduate school of Regional Environment Systems, Shibaura Institute of Technology)

【目的】難分解性化合物であるカルバゾールは主に化石燃料中に含まれており、タンカーの座礁や化学工業廃水の漏洩等で海洋汚染の原因となっている。また、発癌性、変異原性等の毒性を有し、脂溶性であるため生物濃縮の作用が非常に高い。本研究室では環境浄化の観点から、カルバゾール資化能を持つ海洋性細菌を日本各地の海水から単離し、その分解過程やカルバゾール分解系遺伝子の構造などを明らかにし、陸生･海洋性細菌のカルバゾール分解系遺伝子構造解析と比較をおこなった。

【方法･結果】日本各地の海水から単離された、カルバゾール分解能を持つ*Caulobacter* sp. OC10株のtotal DNAを抽出後、shotgun cloningにより目的とするカルバゾール分解能を含む遺伝子断片(4,150 bp)を取得し解析をおこなった。カルバゾール分解系遺伝子は、*carAa*、*carAc*、*carAd*(初発酸化酵素遺伝子)と*carBa*、*carBb* (メタ開裂酵素遺伝子)と*carC* (加水分解酵素遺伝子)から構成されている。今回取得したOC10株の遺伝子断片は順に、*carAa-carC-carBa-carBb*であった。また、16S rRNA遺伝子解析でみた系統樹では、OC10株とOC7株は同グループに属し、OC10株の各*car* 遺伝子はOC7株とアミノ酸レベルで、CarAa 91%、CarC 83%、CarBa 77%、CarBb 86%の相同性を示した。次に、OC11S株やOC9株などの*Aequoricola*に属するグループとOC10株との相同性は、アミノ酸レベルで共に、CarAa 66%、CarC 58%、CarBa 42%、CarBb 43%であった。一方、グラム陽性の陸生細菌*Nocardioides aromaticivorans* IC177株、海洋性細菌*Terrabacter* sp. OC11株とのアミノ酸レベルでの相同性はそれぞれCarAa 44%、CarC 45%、CarBa 17%、CarBb 40%であった。また、*Pseudomonas resinovorans* CA10株とのアミノ酸レベルでの相同性はCarAa 53%、CarC 46%、CarBa 31%、CarBb 37%であった。さらに異なるグループに属する*Sphingomonas* sp. KA1株は*car* clusterを二つ有しており、cluster Iではアミノ酸レベルでCarAa I 51%、CarC I 47%、CarBa I 29%、CarBb I 48%、cluster IIではCarAa II 49%、CarC II 50%、CarBa II 25%、CarBb II 49%であった。これら菌株は16S rRNA遺伝子解析でみた系統樹で、OC10株の属するグループと全く異なるグループを形成していることが分かった。現在は、OC10株と同様に海水から単離されたKA1株と同グループに属しているOC4株の特徴を調べ、比較検討を進めている。

Carbazole , *Caulobacter* , marine bacteria

講演番号：3B19p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ B校舎19会場

Acidithiobacillus ferrooxidans のチオ硫酸デヒドロゲナーゼの構造と機能

Structure and function of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○菊本愛生、野上翔平、襟立佳那、金尾忠芳、高田潤、上村一雄（岡大院・自然）

○Mei Kikumoto, Shohei Nogami, Kana Eritate, Tadayoshi, Kanao, Jun Takada, Kazuo Kamimura (Okayama Univ. Bioscience)

【目的】*Acidithiobacillus ferrooxidans*は、二価鉄および還元型無機硫黄化合物を唯一のエネルギー源として生育する好酸性の化学合成独立栄養細菌である。本菌は、低品位の硫化鉱石から銅などの金属イオンを溶出させる技術であるバクテリアリーチングにおいて重要な役割を演じる細菌である。硫化鉱石からの金属イオンの溶出の際には、硫黄成分の除去が重要であるが、硫黄成分は、本菌あるいは好酸性の硫黄酸化細菌によって、チオ硫酸を介して硫酸へ酸化されると考えられている。これまでに、Soxシステムやチオ硫酸:キノン酸化還元酵素が関与する*Acidianus ambivalens*の経路などが、硫黄代謝経路として報告されているが、これらの硫黄代謝系においてキーとなる酵素の遺伝子は、本菌のゲノム中には存在しない。本菌からは、チオ硫酸を反応生成物とするテトラチオン酸加水分解酵素が精製されており、チオ硫酸の酸化にテトラチオン酸を反応生成物として生じるチオ硫酸デヒドロゲナーゼ（TSD）の存在が示唆された。本研究では、この遺伝子の解析を目的とする。【方法・結果】チオ硫酸脱水素酵素活性は、フェリシアナイドを電子受容体に用いて測定した。無細胞抽出液の酵素は、その活性発現に硫酸イオンを要求した。活性は、テトラチオン酸および硫黄生育細胞から調製した無細胞抽出液中に検出されたが、鉄生育細胞では検出されなかった。無細胞抽出液では、硫酸イオンが活性発現に必須であったが、精製酵素では硫酸イオン要求性が低下していた。精製酵素のN－末端アミノ酸配列から同定された遺伝子（*tsd*）は、その下流に硫酸結合タンパク質、チオ硫酸：キノン酸化還元酵素のサブユニットをコードする遺伝子、硫黄や黄鉄鉱で増殖した時に高発現するロダネース様タンパク質をコードする遺伝子をもっており、TSDは本菌のチオ硫酸代謝に密接に関連している酵素であることが示唆された。精製過程の各試料をSDS-PAGEで解析した結果、分子量約30kDaのタンパク質が存在する試料では、酵素活性の硫酸イオン依存性が認められた。従って、TSDは、遺伝子の下流に存在する硫酸結合タンパク質と複合体を形成して存在し、硫酸結合タンパク質が酵素活性の硫酸イオン依存性に関連しているものと推測された。*tsd*の相同性解析の結果、TSDと高い相同性を示すタンパク質を持つ細菌として、*Thiomonas intermedia*, *Gluconobacter oxydans*, *Burkholderia ubonensis*, *Hydrogenobaculum sp*, *Leptospirollum ferrodiazotrophum*が検出された。これらのいずれの細菌も、*A. ferrooxidans*の硫酸結合タンパク質と相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子を持っており、*tsd*と相同性の高い遺伝子とオペロンを形成していることが明らかとなった。TSDのさらなる機能解析と相同性の高い遺伝子を持つ細菌におけるこれらの遺伝子の役割についても検討を行っている。

Acidithiobacillus ferrooxidans、 Thiosulfate dehydrohenase、 sulfur oxidation

講演番号：3B19p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ B校舎19会場

揮発性酢酸イソアミルの *Escherichia coli* K-12 に対する生育阻害機構の解析

Analysis of growth inhibition mechanism by volatile isoamyl acetate against *Escherichia coli* K-12

○安藤 仁、西村 日向子[1]、本田 映子[2]、堀内 喜高[2]、倉田 淳志、岸本 憲明（近畿大院・農、[1]近畿大・農、[2]近畿大・ライフ研）

○Hitoshi Ando, Hinako Nishimura[1], Eiko Honda[2], Yoshitaka Horiuchi[2], Atsushi Kurata, Noriaki Kishimoto (Grad. Sch. of Agric., Univ. of Kinki, [1]Fac. of Agric., Univ. of Kinki, [2]Life Sci. Res. Inst., Univ. of Kinki)

【目的】本研究室では清酒酵母が吟醸過程で生産する吟醸香の主成分である揮発性酢酸イソアミルの幅広い抗菌抗真菌スペクトルを見出し、20 μl/dish で *Escherichia coli* の生育を殺菌的に阻害することを明らかにした。本研究では *E. coli* の殺菌に要する揮発性酢酸イソアミルの曝露時間と蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動（2D-DIGE）を用いたプロテオーム解析をおこない、揮発性酢酸イソアミル曝露によって発現が変動するタンパク質を同定した。

【方法・結果】vapor-agar contact 法で揮発性酢酸イソアミルに曝露した *E. coli* 菌体を回収し、新しい普通寒天培地に塗抹して 37℃で培養した。曝露後 2 h までは *E. coli* は生育したが、3 h 曝露すると生育が抑制、4 h で生育が強く阻害され、5 h でコロニーの形成は完全に阻害された。また、5 h 曝露した *E. coli* は CTC 蛍光試薬で染色されず、PI 蛍光試薬で染色されたことから、膜が損傷を受け、呼吸活性が消失していることを確認した。しかし、5 h 曝露した *E. coli* を電子顕微鏡で観察しても、菌の形態、細胞内部の構造に変化は認められなかった。そこで、揮発性酢酸イソアミルに 5 h 曝露した *E. coli* と曝露していない *E. coli* のタンパク質の発現変動を 2D-DIGE で解析した結果、可溶性タンパク質では発現量が抑制された複数のタンパクスポットを再現性高く検出した。これらのタンパク質は MALDI/TOF/MS 分析し、MASCOT 解析により、ペリプラズム領域に局在する糖輸送とリン酸基転移に関わるタンパク質と同定した。同様に、膜タンパク質では発現量が増加した多くのタンパク質スポットを検出し、一部のタンパク質は翻訳伸長と TCA 回路に関わるタンパク質と同定した。これらの結果をもとに、現在、揮発性酢酸イソアミルに対する同定したタンパク質をコードする遺伝子欠損株の感受性を評価している。

isoamyl acetate, antimicrobial, proteome

講演番号：3B19p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ B校舎19会場

酢酸菌におけるピルビン酸代謝系の遺伝子構成と発現制御

Genetic organization and regulation of pyruvate metabolism in acetic acid bacteria

○桜井　健太、新井　博之、石井　正治、五十嵐　泰夫（東大院農生科・応生工）
○Kenta Sakurai, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi (University of Tokyo)

酢酸菌は絶対好気性菌で、酸化発酵によりアルコールや糖類から有機酸を生成する。酸化発酵のひとつである酢酸発酵は伝統的に食酢醸造に利用されてきた。また糖類の酸化発酵によって、ビタミンCの工業生産の原料や医薬品の前駆体も生成し酸化発酵の物質生産への応用も期待されている。

酸化発酵の際にアルコールや糖類は膜結合型の脱水素酵素群によって酸化され、これに伴いユビキノンがユビキノールへと還元される。ユビキノールの再酸化はキノールオキシダーゼによる酸素の還元と共役する。そのため、アルコールや糖類がペリプラズムで膜結合型の脱水素酵素群によって酸化される際に、酸化的リン酸化によってATPが生成する。特にエタノールやグルコースは膜結合型の脱水素酵素群だけでなく、細胞質に存在する可溶性の脱水素酵素群によっても酸化されるため、エタノールやグルコースはエネルギー生産と炭素同化の両方に利用される。*Acetobacter*属細菌や*Gluconacetobacter*属細菌がエタノールを含む培地で生育する際には、エタノールの酸化発酵によって酢酸が培地中に一時的に蓄積するが、エタノールの枯渇後にこの蓄積した酢酸はさらに二酸化炭素へと酸化される。この現象は酢酸の過酸化と呼ばれていて、食酢醸造で問題になっている。酢酸の過酸化はTCAサイクルの酵素のひとつのaconitaseやacetyl-CoA synthetaseの活性の上昇と共に起こることが知られている。これらから酸化発酵の制御には中央炭素代謝系も密接に関わることが予想される。本研究では酢酸菌における炭素代謝の理解を目的とした。

Acetobacter aceti NBRC 14818と*Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283の炭素代謝系の遺伝子構成を比較したところ、ピルビン酸代謝やTCAサイクルの酵素をコードする遺伝子の構成が異なることが明らかになった。次にこの違いと各種炭素源の代謝との関連の解明を目指した。マイクロアレイ解析の結果から、NBRC 14818とNBRC 3283では解糖系由来のピルビン酸から酢酸に至る経路が異なることが示唆された。

acetic acid bacteria, pyruvate metabolism

講演番号：3B19p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ B校舎19会場

ソフトバイオマス分解に関わる*Clostridium cellulovorans*由来セルロソーム構成酵素サブユニットの同定

Identification of the *Clostridium cellulovorans* cellulosomal subunits on softbiomass degradation

○山本 康介[1]、川出 雄二郎[1]、田丸 浩[1,2,3]（[1]三重大院・生資、[2]三重大・生命支セ、[3]三重大・新産業創生）

○Kosuke Yamamoto[1], Yujiro Kawade[1], Tamaru Yutaka[1,2,3]（[1]Grad. Bioresour., Mie Univ., [2]Mie Univ. LSRC, [3]Mie Univ. ITII）

【目的】地球規模の気候変動や環境破壊問題、エネルギー供給問題の解決のため、再生可能エネルギーのひとつであるセルロース系バイオマスの有効利用が求められている。しかし、セルロース系バイオマスの複雑で強固な構造を分解することは容易ではなく、技術的ブレイクスルーが必須となっているが、嫌気性細菌*Clostridium cellulovorans*は超高分子複合体「セルロソーム」を構築することによって、稲わらやバガスといったソフトバイオマスを完全分解できる。これまでの研究から、*C. cellulovorans*は炭素源ごとに効果的なセルロソームの構成酵素サブユニットを変化させることが示されており、実バイオマスごとに分泌されたセルロソームの構成要素を解析することで、その分解に貢献する酵素群を同定できる。そこで本研究では、ソフトバイオマスを含む*C. cellulovorans*培養液のプロテオーム解析を行い、そのセルロソーム構成成分の同定を行った。

【方法および結果】稲わらおよびバガスをそれぞれ炭素源とした培地で*C. cellulovorans*を37℃で２週間嫌気的条件で静置培養し、遠心沈殿で培養上清を回収した後、硫安を用いて上清に含まれるタンパク質を沈殿させ、50mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) に溶解した。得られたタンパク質溶液を上清画分とし、さらに上清画分にAvicelを加えて4℃で1時間静置し、遠心分離でAvicelと上清を分離した。この上清画分を非吸着画分とし、沈殿したAvicelに吸着するタンパク質を吸着画分として、SDS Sample Bufferに溶出した。稲わらおよびバガスの上清画分、Avicel非吸着画分、Avicel吸着画分をSDS-PAGEに供してCBB染色を行った。また同様に、SDS-PAGEで分離したタンパク質をPVDF膜上に転写し、抗CbpA抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。さらに、吸着画分で稲わらとバガスに共通して検出されたバンドとバガス培養で顕著に濃く見られたバンド、バガス培養のみにバンドをそれぞれ切り出し、アルキル化処理してトリプシン消化し、液体クロマトグラフィーでさらに分離してMS/MS解析を行った。得られた分析データを*C. cellulovorans*ゲノム情報と照合してタンパク質を同定した。その結果、稲わらとバガスの培養から得られたセルロソームは異なるタンパク質バンドパターンが見られた。さらに、抗CbpA抗体によるウェスタンブロット解析によって、Avicelに吸着したタンパク質群はセルロソームを含んでいた。また質量分析の結果、稲わらおよびバガスの培養で異なるセルロソーム酵素サブユニットが発現誘導されていることが判明した。

C. cellulovorans, Cellulosome, Proteomics

講演番号：3B19p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ B校舎19会場

メタゲノム解析手法を用いた新規クオラムセンシングシグナル合成遺伝子の同定と機能解析

Identification and functional characterization of novel quorum sensing signal synthase genes using a metagenomic approach

○奈須野 恵理[1,2]、木村 信忠[1]、藤田 雅紀[3]、鎌形 洋一[1]、花田 智[1,2]（[1]産総研・生物プロセス、[2]筑波大院生命環境、[3]熊本大院・先導機構）

○Eri Nasuno[1,2], Nobutada Kimura[1], Masaki Fujita[3], Yoichi Kamagata[1], Satoshi Hanada[1,2]
([1] AIST, [2]University of Tsukuba, [3]University of Kumamoto)

【目的】シグナル物質を介して細菌が多様な集団行動を制御するクオラムセンシング機構（QS）が知られている。医療や農業で問題視されるバイオフィルム形成や毒性物質の生産などが QS によって制御されているため、これらの機構を解析し、人為的に制御することが期待されている。しかし、環境中の99%を超える細菌は従来の培養法では分離が困難であることから、未培養細菌の QS については多くが未知の状態である。そこで、本研究ではメタゲノム解析手法に基づくハイスループット、かつ高感度なシグナル物質合成遺伝子の探索手法を構築し、シグナル物質を合成する未知遺伝子の同定と機能解析を行う。

【方法】森林土壌と活性汚泥をサンプルとしてメタゲノムライブラリーを構築し、48 種類のメタゲノムクローンごとにグループ化して 96 穴培養プレートに集積した。次に、シグナル物質の存在下でGFPを発現する大腸菌（センサー菌）を用いて、GFP 発現を誘導するメタゲノムクローンを蛍光プレートリーダーにより検出した。さらに、検出したメタゲノムクローンからシグナル物質の合成に関わる遺伝子を同定し、1D-/2D-NMR と FAB-MS を用いてシグナル物質の構造を決定した。

【結果】約 10 万クローンのライブラリーから、GFP 発現を誘導する 8 種類のメタゲノムクローンを検出した。このうちN16株とN52株は、シグナル物質として*N*-dodecanoyl-L-homoserine lactone（C12-HSL）を合成していることを NMR と FAB-MS 解析により明らかにした。N16株とN52株由来の C12-HSL 合成に関わる遺伝子は、既知のシグナル物質合成遺伝子とは相同性が低く、特に、N16株由来のシグナル物質を合成するタンパク質 AubI は、これまでに実験で機能が同定されたホモログとは、系統的に深い分岐を示す新しいクラスの合成遺伝子であることが明らかとなった。一方、AubI は基質特異性の認識に関わるアミノ酸残基の保存性が低いにも関わらず、基質結合部位の立体構造は高度に保存されていることが AubI の立体構造の三次元モデル解析によって推定された。したがって、未培養細菌における QS は、シグナル物質を合成するタンパク質の配列は分離可能な細菌と比べて多様性がある一方、機能は広く保存されていることが示唆された。本研究により、メタゲノム解析手法を用いた独自の探索方法が、未培養細菌に由来する新しいシグナル物質合成遺伝子の探索に有用であることを示した。

Quorum sensing, QS signal, Metagenome

講演番号：3B19p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ B校舎19会場

芳香族化合物汚染土壌における経時的メタゲノムによって明らかになった土壌微生物の適応反応

Sequential metagenomics of a soil contaminated with aromatic hydrocarbons revealed adaptations of soil microbiota.

○加藤　広海、森　宙史[1]、豊田　敦[2]、大坪　嘉行、丸山　史人[3]、堂園　亜由美[1]、永田　裕二、藤山　秋佐夫[4]、黒川　顕[1]、津田　雅孝（東北大院生命科、[1]東工大院生命理工、[2]国立遺伝研、[3]医科歯科大院、[4]国立情報研）

○Hiromi Kato, Hiroshi Mori[1], Atsushi Toyoda[2], Yoshiyuki Ohtsubo, Fumito Maruyama[1,3], Ayumi Dozono[1], Yuji Nagata, Asao Fujiyama[4], Ken Kurokawa[1], Masataka Tsuda (Tohoku University [1] TITEC [2] NIG, [3] TMDU, [4] NII)

【目的】近年爆発的な勢いで様々な環境のメタゲノムデータが蓄積されつつある。環境変動による生態系への様々な撹乱が懸念されるなか、メタゲノムが撹乱に対してどのような変動を示すのかを理解することが、今後は重要になるだろう。本研究の目的は、土壌微生物が汚染物質による撹乱を受け、それが時間とともに元の状態へと収束していく一連の遺伝子プールの変動を理解することである。そこで我々は汚染された土壌環境のスナップショットではなく経時的なメタゲノムを行なうことで、どのように土壌微生物システムが汚染に対して適応していくのかを、網羅的に解析することにした。

【方法】汚染歴の無い土壌に対して、3-クロロ安息香酸（3CB)、フェナントレン、ビフェニルおよびカルバゾールによる複合汚染を施し、経時的（汚染から0、1、3、6、12および24週目）にメタゲノムDNAを調整して、Illumina GA IIxによってメタゲノムの大規模塩基配列解析することで、遺伝子プールの変動を調べた。得られたおよそ合計10 Gbのリードデータを各種データベースにBlast解析することで、メタゲノムの機能的な変遷を調べることにした。また16S rRNA遺伝子のPCR産物の454シーケンスを行なうことで、菌叢解析をおこなった。

【結果】これらの解析によって、汚染物質添加が除去された時期（3CBは2週間目前後、その他の多環芳香族化合物は6から12週目）に、土壌遺伝子プールに変動があったことがわかった。また特に3CB汚染時に菌叢に大きな変化が生じ、例えば1週目において*Proteobacteria*特に*Burkholderia*属の細菌による増加を引き起こした。興味深いことに、この時期土壌微生物は菌叢の多様性が一時的に減少したにも関わらず、土壌の基本的な代謝能力を維持する遺伝子の多様性においては多様性が減少しないことが明らかとなった。これは遷移していく微生物間の機能的冗長性がもたらす土壌微生物システムの機能的頑健性を示している。また同時に、汚染物質の上流代謝に量的質的変動が生じており、土壌微生物システムがそのメタゲノムにおいて、頑健性と適応性の両方を同時に発揮しうることが示唆された。

Metagenome, Soil, Aromatic hydrocarbon

講演番号：3B19p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ B校舎19会場

培養非依存的手法による土壌からの新規芳香族化合物分解遺伝子の探索

Direct isolation of novel genes for degradation of aromatic compounds from soils that were artificially contaminated with aromatic pollutants

○ 永山浩史、菅原智詞、遠藤諒、加藤広海、大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝(東北大、院生命)
○ Hirofumi Nagayama, Tomonori Sugawara, Ryo Endo, Kato Hiromi, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, and Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

【目的】これまでの環境汚染物質分解細菌の研究は、汚染物質を炭素源として集積培養で生育可能な細菌の詳細な解析が中心であったが、環境中に棲息する99%以上の微生物は実験室では培養困難であり、実際の環境においてもこれら難培養微生物が環境汚染物質の分解に関与している可能性がある。また、これらの難培養微生物集団の中には新規反応特性のある分解酵素遺伝子が存在している可能性や、実際の自然環境中における共存微生物の詳細な関係を調べるためにも、これら難培養性微生物を含めた分解遺伝子の詳細な解析を行なう必要がある。そこで、本研究では複数の芳香族化合物で汚染化した土壌から培養非依存的手法により、新規性のある分解酵素遺伝子の取得することを目的とする。
【方法】原油汚染土壌のような長期間集積された環境では、分解に特化した既知の細菌群が優先的に増殖することが懸念される。そのため、本研究で用いる土壌はこれまで汚染経歴の無い土壌を使用することで既知遺伝子とは異なる分解酵素遺伝子の取得を試みることにした。具体的には、4種の芳香族化合物(3-クロロ安息香酸、フェナントレン、ビフェニル、カルバゾール)で土壌を汚染化し、これら分解遺伝子が十分に増えた時点でコスミドベクターを用いて土壌DNAライブラリーを構築した。受容菌としてはナフタレン分解遺伝子群の初発酸化酵素遺伝子のみを破壊した受容細菌にライブラリーを導入し、インドールを含む培地上でスクリーニングを行なった。一般的に芳香族化合物初発酸化酵素は、インドールを青色のインディゴに変換する活性を備えている。この方法でインディゴ生産能を発現する宿主を取得することにより、新規の芳香族化合物分解初発酸化酵素遺伝子の取得を試みた。
【結果】総クローン数53,437に対してスクリーニングを行なった結果、インディゴ生成により青色コロニーを形成する16株の陽性クローンを取得することができた。さらに、各クローンを制限酵素消化しバンドパターンを比較した結果、それぞれ異なるバンドパターンを示すクローンが多数存在していることがわかった。また、既知初発酸化酵素遺伝子をプローブに用いてサザン解析を行なった結果、得られた16クローンからはシグナルが検出されなかった。このことから、これらコスミドクローンの挿入配列は由来の異なる細菌のものであると考えられ、さらに既知の初発酸化酵素遺伝子とは相同性の低い遺伝子が存在していることが明らかとなった。

metagenome, aromatic compounds, functional screening

講演番号:3B19p11
講演日時、会場:3月24日15:49～ B校舎19会場

GenoFinisher for finishing draft genomic sequences
フィニッシング用のツールGenoFinisherの開発
○大坪 嘉行、奥野 周、永田 裕二、津田雅孝[1]（東北大院生命科）
○Yoshiyuki Ohtsubo, Chikashi Okuno, Yuji Nagata, Masataka Tusda (Tohoku university)

【目的】次世代シーケンサーの登場によって細菌のドラフトゲノム配列を得ることは非常に容易になった。しかしゲノム配列を十分に活用するには、ドラフトゲノム配列をもとにゲノム配列を完全決定すること、すなわちフィニッシングを行うことが必要である。本研究では、フィニッシングを効率よく実施するのに有効なソフトウエアを構築することを目的とした。
【結果】MacOSX10.6以降で動作するソフトウエアGenoFinisherを開発した。本ソフトウエアはhttp://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/genoFinisher/よりダウンロード可能である。本ソフトウエアは、Roche社の454シーケンサーに付属のアッセンブラーであるnewblerによりアッセンブルを行って得られたドラフト配列を出発点として、微生物ゲノム配列を完全決定するのに有用な機能群を備えている。newblerは、コンティグ群と、これらコンティグ群がお互いにどのようにつながっているかについての情報を出力するが、GenoFinisherはこの情報に基づき、コンティグおよびコンティグ間のつながりをグラフィカルに表示することができる。また重複配列を境にコンティグ間のつながり方が不明になっている部分を自動抽出し、これを解決するのに必要なPCR primerや付随して必要となる情報を一括して出力する。またスキャフォールドが得られている場合には、スキャフォールド内のgapに相当するコンティグを前述の情報から探索し、可能性のあるコンティグルートを表示することができる。またGenoFinisherには各コンティグがどのようなリードにより構成されているかについて、詳細に解析する機能がある。この機能を利用することで、重複コンティグに存在するバリエーションの有無について確認し、必要に応じて修正を行うことが可能である。このようにGenoFinisherを利用することで、既に得られているリードデータを有効に活用すること、フィニッシングに向けてどのような追加実験をするべきかを決定する上で重要となる判断材料を視覚的に得ることが可能である。また付属機能として、k-merの出現頻度に基づいて、リードに内在するエラーやアダプター配列を除去する機能、リファレンスゲノムに対してリードをblastnで比較し、結果に基づいてリードを分別する機能などがあり、あわせて利用可能である。

finishing, draft genomic sequence, software

講演番号:3B19p12
講演日時、会場:3月24日16:10～ B校舎19会場

Genedata Selector™を用いた醸造酵母ゲノムの網羅的統合解析：凝集性関与遺伝子群の特性比較

Genedata Selector™: Integrative analysis of multi-omics data of yeasts focusing on flocculation genes

Hans-Peter Fischer、Thomas Hartsch、Ludwig Macko、Sebastien Ribrioux、Niko Bausch、下広英樹[1]、○新城 雅子[1] (Genedata AG, [1]Genedata KK)

Hans-Peter Fischer、Thomas Hartsch、Ludwig Macko、Sebastien Ribrioux、Niko Bausch、Hideki Shimohiro[1], ○Masako Shinjoh[1] (Genedata AG, [1]Genedata KK)

【背景・目的】次世代シーケンシング（NGS）技術によりゲノム研究、とりわけゲノムやトランスクリプトームのシーケンシングのようなNGS応用研究において、生じるデータ量が飛躍的に増加している。この状況下、NGSデータの管理、解析、可視化の統合アプローチが望まれている。これを満たすため、Genedata Selector™と命名したフレキシブルでハイスループットかつ統合性に優れたソフトウェアソリューションを開発した。Genedata Selector™は、公共データとインハウスデータを一つのデータベースへ統合することを容易にし、データ解析と可視化用ツール有している。これを用いると複雑で膨大なゲノムデータを生む研究における解析プロセスの合理化、自動化が可能になり、研究者が研究結果の解釈に集中できるようになった。この統合アプローチは、様々なバイオテクノロジー分野（たとえば飼料・食品添加物、バイオ燃料、酵素、薬剤前駆体、農業科学、飲料や醸造）の研究開発プロセスの改善に貢献している[1,2)]。今回は、醸造酵母における凝集性関与遺伝子群に注目し、ビール、ワイン、清酒酵母のNGSデータとオミクスデータを用い凝集特性を統合解析した。

【方法・結果】*Saccharomyces cerevisiae*ゲノム情報は、S288C実験室株、ビール酵母(FosterO株、FosterB株)、ワイン(Vin13株, VL13株)、清酒酵母（協会７号）のものを使用し、単一ソフトウェアプラットフォーム上で、ゲノムレベルで網羅的に遺伝子の多様性、代謝能力、蛋白質相互作用、制御ネットワークを評価した。今回の解析では、菌体凝集に関連する*FLO*遺伝子ファミリー（*FLO1*、*FLO5*、*FLO8*、*FLO9* 、*FLO10*、*FLO11*遺伝子）及び*CIS3*、*HSP150*遺伝子に焦点を当て、醗酵過程における凝集特性を解明するために、比較ゲノム解析を行った。下面ビール酵母*S. carlbergensis*（*S. pastorianus*としても知られる）の菌体凝集関連遺伝子のマイクロアレイ経時変化データも用いた。さらに、工業生産プロセス開発における特許調査 Freedom to operate (FTO)を酵母凝集遺伝子群を対象に行った例も紹介する。

１）新城雅子ら　2011年度農芸化学会大会要旨集 115頁: 次世代シーケンシング統合システムの醗酵生産菌育種への適用

２）Thomas Hartschら　2011年 Society of Industrial Microbiology Abstract p115: Genedata Selector™: A software system for fungal strain optimization

next generation sequencing, *Saccharomyces*, comparative genomics

講演番号：3B19p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ B校舎19会場

菌類重複遺伝子およびオルソログ遺伝子間におけるヌクレオソーム位置の比較

Comparison of nucleosome positions in fungal duplicated and orthologous gene pairs

○西田 洋巳（東大院農生科）
○Hiromi Nishida (Univ. Tokyo)

【目的】真核細胞生物のゲノムDNAはヒストン8量体に巻きつきヌクレオソームを形成しており，その形成位置は（特に遺伝子プロモータ領域において）遺伝子発現に影響を与えている．そこで，糸状子嚢菌類*Aspergillus fumigatus*の重複遺伝子間におけるヌクレオソームの位置，および*A. fumigatus*と子嚢菌酵母*Saccharomyces cerevisiae*のオルソログ遺伝子間におけるヌクレオソームの位置の比較を遺伝子プロモータ領域（翻訳開始点上流領域）およびボディ領域（翻訳開始から終結領域）に分けて行い，その異同を明らかにすることを目的とした．

【方法】遺伝子にコードされているタンパク質のアミノ酸配列類似性に基づき重複遺伝子およびオルソログ遺伝子を抽出した．次に，*A. fumigatus*および*S. cerevisiae*のヌクレオソームマップ（Nishida et al., 2009, *Bioinformatics* **25**, 2295; Matsumoto et al., 2011, *PLoS ONE* **6**, e16372）より比較遺伝子領域のヌクレオソーム位置プロファイル（Nishida, 2009, *Open Access Bioinformatics* **1**, 1-6）を計算し，それらのプロファイルの類似度をSpearmanの相関係数で表した．なお，本研究では翻訳開始点の上流1000塩基領域をプロモータ領域として扱った．

【結果と考察】*A. fumigatus*の重複遺伝子間においては遺伝子プロモータ領域の方が遺伝子ボディ領域よりもヌクレオソーム位置の保存性が高いことが示され，遺伝子発現の制御にプロモータ領域のヌクレオソームの位置が影響を与えていることを示している．他方，*A. fumigatus*と*S. cerevisiae*のオルソログ遺伝子間においては遺伝子プロモータ領域およびボディ領域ともにヌクレオソーム位置の共通性は見出せず，ランダムな組み合わせと大差ない結果であった．このことより，異なる生物種におけるヌクレオソームの位置はそれぞれの生物種に特有の機構で維持されていると考えられる．

Nucleosome, Aspergillus, Saccharomyces

講演番号：3B19p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ B校舎19会場

強力にトリ羽毛分解を行う好熱性細菌*Meiothermus ruber* H328株のゲノム塩基配列解析とペプチダーゼ／プロテアーゼ遺伝子群の検討

Genome analysis of *Meiothermus ruber* H328 degrading intact chicken feathers and investigations of peptidase / protease genes.

○稲田 秀平、村田 明紀、渡部 邦彦（京府大院・生命環境）
○Shuhei Inada, Aki Murata, Kunihiko Watanabe (Grad. Sch., Kyoto Pref. Univ.)

【目的】難分解性のトリ羽毛ケラチンを強力に分解する好熱性細菌*Meiothermus ruber* H328株は、ケラチン分解性プロテアーゼを菌体外に生産する*。このプロテアーゼは巨大な複合体を形成し、SDSを含む界面活性剤や有機溶媒などの変性剤に対して著しい耐性を示す。しかしこれだけでは充分な分解が得られないことから、トリ羽毛分解には本酵素と共に複数のペプチダーゼ／プロテアーゼ酵素群も関与していると考えている。そこで、この巨大なプロテアーゼ複合体の構成成分および本酵素以外の他の酵素群を検討し、これらの酵素群によるトリ羽毛分解機構やケラチン分解性プロテアーゼの安定性機構を解明することを目的に、本研究ではH328株ゲノムDNAの全塩基配列を決定し、本菌株が有する遺伝子の全容解明を行っている。

【方法・結果】H328 株ゲノムの全塩基配列を決定するため、まずゲノム DNA を次世代シーケンサーにより配列決定し、31-165,891 bp の長さの contig が 308 個得られた。次にそれぞれの contig を H328 株ゲノムとして構築するため、H328 株の基準株である *Meiothermus ruber* DSM 1279 株の既知ゲノムの塩基配列 (3,097,457 bp) を対照として割り当てると、約 3.0 Mbp のドラフトゲノムが構築でき、基準株に対するカバー率は約 98.66%であった。また contig 間の、配列未決定な gap 領域は 55 ヶ所 (最小 2 bp、最大 9,879 bp、予想塩基総数 41,542 bp) であった。さらに別途、PCR により gap 領域の目的部分を増幅後、キャピラリーDNA シーケンサーで個別に配列決定した。これにより、現在までに 34 ヶ所の配列決定を行うことができ、gap 領域の予想塩基総数を 37,195 bp、基準株に対するカバー率を約 98.80%まであげることができた。

この暫定的な H328 株ゲノムの塩基配列情報に対し、BLAST により基準株の遺伝子群との相同性を調べ、H328 株ゲノムに含まれる遺伝子を解明した。基準株の持つ 3,052 個の遺伝子のうち、2,874 個が H328 株においても確認され、そのうちトリ羽毛分解に関与している可能性のあるペプチダーゼ／プロテアーゼ遺伝子を計 26 個特定した。

他方で、H328 株が生産する巨大なケラチン分解性プロテアーゼの部分精製サンプルに対して SDS-PAGE を行い、得られた複数のバンドを回収して N 末端アミノ酸配列解析を行ったところ、そのうち 2 つのバンドのみから異なる N 末端配列を得ることができた。H328 株ゲノムの塩基配列情報との照合により、このプロテアーゼ複合体には少なくとも今回判明したセリンペプチダーゼと機能未知タンパク質が含まれ、ゲノム上ではこの両遺伝子がオペロン構造を保持していることを突き止めた。そこで現在、これらのタンパク質を大腸菌で発現させ、調査を行っている。

Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82,941-950 (2009)

Thermus, genome, protease

講演番号：3B19p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ B校舎19会場

Streptomyces rochei 7434AN4株の線状染色体の塩基配列解析

Nucleotide sequencing of linear chromosome of strain *Streptomyces rochei* 7434AN4

○曹 志生、Yosi NINDITA、片岡 憂祐、荒川 賢治、田上 道平[1]、 Alexander LEZHAVA[1]、志波 優[2]、吉川 博文[2]、石川 淳[3]、木梨 陽康（広島大院・先端研、[1]理研・OSC、 [2]東農大・応生科、[3]国立感染研）

○Zhisheng Cao, Yosi Nindita, Yusuke Kataoka, Kenji Arakawa, Michihira Tagami[1], Alexander Lezhava[1], Yuh Shiwa[2], Hirofumi Yoshikawa[2], Jun Ishikawa[3] and Haruyasu Kinashi (Hiroshima Univ., [1]RIKEN, [2]Tokyo Univ. Agri., [3]NIID)

【目的】放線菌*Streptomyces rochei* 7434AN4株は３つの線状プラスミド(pSLA2-L, -M, -S)を有し、抗生物質ランカサイジン、ランカマイシンを生産する。本研究室ではプラスミドの全塩基配列を決定し、pSLA2-L (210, 614 bp)がLC, LM生合成遺伝子をコードしていること、pSLA2-M (113, 463 bp)がku70/80, CRISPRクラスターなどの生体防御関連遺伝子を有すること、pSLA2-S (17, 525 bp)が末端複製遺伝子をもたないことなどを明らかにした。また、染色体の末端3.1 kbはpSLA2-L, -Mの右末端98.6%であった。本研究では、線状染色体の全塩基配列解析を行い、染色体の起源の解明およびアーム領域に含まれる二次代謝遺伝子の解析を目指した。

【方法及び結果】次世代シークエンサーを用いて、*S. rochei* 7434AN4株の全ゲノム解析を行った。Illumina GAIIシークエンサーより80塩基のリードが2600万ペア得られた(ゲノムサイズの約450倍)。これらをアセンブリーし、以前得られたRoche 454シークエンサー由来のcontigsと組み合わせて、500 bp以上のhybrid contigが213個で、染色体由来の塩基配列が合計約8.5 Mbになった。染色体由来のcosmidsを取得し、コロニーハイブリダイゼーションよりcosmid-contig walkingおこなった結果、染色体右末端から820 kb、左末端から330 kbの領域が明らかになった。さらに、線状ゲノム特有の末端逆位重複配列 (Terminal Inverted Repeat, TIR)が確認でき、その長さは約54 kbであった。現在、線状染色体の*Ase*I制限酵素マップによる、各contigの位置の確認およびcontig間のギャップ連結を行っている。また、染色体右末端から約550 kbのところにポリケチド生合成遺伝子クラスターの存在が見出せた。遺伝子相同性解析したところ、ポリエン抗生物質filipinの生合成遺伝子クラスターと高い相同性を示しており、本菌が生産するポリエン抗生物質Pentamycinの生合成遺伝子クラスターであることが示唆された。本発表ではその経緯について報告する。

Streptomyces, terminal inverted repeat, secondary metabolites

講演番号:3B19p16
講演日時、会場:3月24日16:54～ B校舎19会場

次世代シークエンサーSOLiD5500xlの特性を活用したゲノム解析

Genome analysis using the characteristics of the next generation sequencer SOLiD 5500xl

○寺林 靖宣、下地 真紀子、保 日奈子、照屋 邦子、小林 靖尚、佐藤 万仁、照屋 盛実[1]、養王田 正文[2]、平野 隆（沖縄科技セ、[1]沖縄県工技セ、[2]東京農工大・院工）

○Yasunobu Terabayashi, Makiko Shimoji, Hinako Tamotsu, Kuniko Teruya, Yasuhisa Kobayashi, Kazuhito Satou, Morimi Teruya[1], Masafumi Yohda[2], Takashi Hirano (OSTC, [1]OITC, [2]TUAT)

当初､エマルジョンPCRやパイロシークエンス等の技術を背景として登場した次世代シークエンサーは、従来型キャピラリーシークエンサーの数百倍から数万倍という大規模スループットという特長をもとにわずか数年で急速に普及した。最近では実験室単位で導入可能なベンチトップ型の次世代シークエンサーも市場に投入されているほか、シークエンスからその後のデータ解析までの受託を行うところも増加し、身近な存在となりつつある。性能面においてもリード長やリードの品質、スループットなどが年々向上し、当初はベンダーからの提供が主であったソフトウェアの面でも開発が急速に進んだ。その結果、ChIP-Seqやトランスクリプトームなど、多彩な目的に応用されるようになった。

一概に次世代シークエンサーといってもそれぞれにリード長、スループットなど異なる特徴を有している。当初は困難とされていたゲノムの大きな生物におけるde novoアセンブルも、異なる種類の次世代シークエンサーによるシークエンス結果を組み合わせることによる達成例が報告されている。このことから、次世代シークエンサーを実際の解析に活用するに際しては、個々の特徴を把握することが極めて重要であると考えられる。

次世代シーケンシングプラットフォームのうち、ライフテクノロジーズ社のSOLiDシステムは、ライゲーションシークエンスやダイベースエンコーディングなどの独自の技術を背景とした高いデータ精度を特徴としている。また、最新のSOLiD 5500xlシステムはこれまでのSOLiD 4システムと比較してリードの伸長(75base)やスループットの向上（最大180GB)の他、ECC（Exact Call Chemistry）モジュールの導入による精度の更なる向上が特徴として挙げられる。

今回は配列既知のゲノムDNAをサンプルとして、SOLiD 5500xlシステムによるシークエンシングをECCモジュール使用あるいは不使用で行った。それらの結果を比較することでECCモジュールの導入がデータ精度の向上に与える効果の検証を行った。また、同じシークエンス結果に対し異なる前処理を施したデータセットを用意し、それぞれを使用してde novoアセンブルあるいは全ゲノムマッピングを行った。これらの結果を比較解析することでSOLiDシステムの特性であるダイベースエンコーディング法に適したデータ処理法の検討を行った。現在はこれらの特性を把握したうえでその大規模スループットを活用したメタゲノム解析などへの応用を検討中である。

next-generation sequencer, SOLiD 5500xl, exact call chemistry

講演番号：3B19p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ B校舎19会場

産業用糸状菌 *Aspergillus* 属菌のプロテオーム解析

Proteomics on the industrial fungus, *Aspergillus*

○小島海平、井原美智子、寺本寛、宇田川裕晃、髙木忍、大箸信一[1]（ノボザイムズ ジャパン、[1]金沢工大）

○Kaihei Kojima, Michiko Ihara, Hiroshi Teramoto, Hiroaki Udagawa, Shinobu Takagi, Shinichi Ohashi[1]
(Novozymes Japan Ltd, [1]KIT)

[目的] *Aspergillus* 属菌は、産業用酵素をはじめとする有用物質の生産菌として広く利用されている。今回は、産業用酵素生産における *Aspergillus* 属菌の細胞内活動、すなわち代謝、タンパク質の生合成・分泌、菌体生産・分解などに関する知見を得ることを目的として、菌体内タンパク質のプロテオーム解析を試みた。

[方法と結果] 産業用酵素発現に用いる *A.niger* 宿主株と酵素遺伝子発現をさせた菌株を各々液体培養し、得られた菌体より菌体内タンパク質を抽出して、2 次元電気泳動/MALDI-TOF-MS 質量分析法により、プロテオーム解析を行った。合計 1824 の泳動スポットを分析し、348 種のタンパク質を同定し得た。得られたタンパク質は、代謝経路酵素群、機能性因子、菌体構成成分、遺伝子の転写・翻訳に関わる因子、タンパク質の分泌・分解に関わる因子など多岐にわたり、これらの局在性も細胞質、核内、ミトコンドリア、その他のオルガネラと多様であった。一方、膜タンパク質やヒストンなど今回の手法では確認できないタンパク質群も存在した。本プロテオーム解析により得られたその他の知見を合わせて紹介する。

proteomics, *Aspergillus*

講演番号：3B19p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ B校舎19会場

タイトル 麹菌プロテオーム・マイクロアレイデータベースの開発

Title Development of *Aspergillus oryzae* Proteome - Microarray Database

○相良純一、佐野元昭、大箸信一（金沢工大・ゲノム研）

○Jun-Ichi Sagara, Motoaki Sano, Shinichi Ohashi (Kanazawa Institute of Technology)

【目的】麹菌（*Aspergillus oryzae*）の遺伝子の発現とタンパク質の発現の相関性を明らかにし、麹菌の生産する有用物質の代謝経路の解明することを目的とし、遺伝子発現データであるマイクロアレイデータとタンパク質発現データであるプロテオームデータを統合し、相互検索を可能としたデータベースの開発を行った。

【方法】プロテオームデータは以下の手順に従い作成した。ProteoPrep Reduction and Alkylation Kit（Sigma）を用い、タンパク質溶液の還元・アルキル化を、ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad)を用いてタンパク質溶液の精製、濃縮を行った。濃度を 2-D Quant Kit (GE Healthcare)を用いて測定したのちCoolPhoreStar IPG-IEF（Anatech）を用いて一次元目の等電点電気泳動を、は CoolPhoreStar SDS-PAGE Dual-200K (Anatech)を用いて二次元目の SDS-PAGE を行った。電気泳動により得られたスポットは xcise、LDI-TOF CFR+ (Shimadzu)、MASCOT (Matrix Science)により同定を行った。

マイクロアレイデータは以下の手順に従い作成した。ISOGEN（日本ジーン）を用い total RNA の抽出を、OligotexTM - dT30 <Super> mRNA Purification Kit（TAKARA ）を用い mRNA の精製を、Ethachinmate（日本ジーン）濃縮を行い、CyScribe cDNA Post Labelling Kit（ＧＥヘルスケア）を用いたポストラベリング法によりマイクロアレイを作成した。

発現条件として２種類の培地（YPD, PDB）を用い、それぞれ１日目、３日目、５日目、７日目における測定を行った。

得られたデータから、遺伝子の発現とタンパク質の発現の相互検索が可能なデータベースの作成を行った。

【結果】麹菌の遺伝子発現データとタンパク質発現データを統合し、相互検索可能なデータベースの開発を行い、各発現条件における発現した遺伝子とタンパク質の情報の抽出を行うことを可能とした。これにより遺伝子の発現とタンパク質の発現の相関関係が明らかにされ、有用物質の代謝経路の解明が行えることが期待できる。今後、抽出した遺伝子発現情報とタンパク質発現情報の相関関係を解析するツールを本データベースに実装することにより、相互関係の解析を容易にすることを目指す。

Aspergillus oryzae, proteome data, microarray data

講演番号:3B19p19
講演日時、会場:3月24日17:37～ B校舎19会場

異なる栄養条件下における*Synechocystis* sp. PCC 6803株のメタボローム、トランスクリプトーム、代謝フラックスの統合解析

Integrative analysis using metabolome, transcriptome and metabolic flux analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under different trophic conditions

○吉川 勝徳[1,2]、仲嶋 翼[1,2]、小川 健一[1,2]、梶畠 秀一[1,2]、平沢 敬[1,2]、古澤 力[1,2]、清水 浩[1,2] ([1]阪大院情報・バイオ情報、[2]CREST・JST)

○Katsunori Yoshikawa, Tsubasa Nakajima, Kajihata Shuichi, Takashi Hirasawa, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu (Dept. Bioinfo., Grad. Sch. Info. Sci. Tech., Osaka Univ., [2]CREST・JST)

【目的】ラン藻*Synechocystis* sp. PCC 6803 GT株は光独立栄養条件下での生育に加え、グルコースを有機炭素源とした従属栄養条件下においても生育が可能な特徴を有する。本研究では、トランスクリプトーム解析、メタボローム解析、代謝フラックス解析により、栄養条件の違い(光独立栄養条件、光混合栄養条件、従属栄養条件)が細胞に与える影響の理解を目的とした。
【方法・結果】光混合栄養条件と従属栄養条件では、炭素源としてグルコースを培地に添加し、光照射下で培養を行った。さらに従属栄養条件では、光合成阻害剤であるアトラジンを培地へ添加した。各栄養条件において対数増殖期の細胞を回収し、解析に供した。トランスクリプトーム解析には、DNAマイクロアレイを用い、メタボローム解析には、キャピラリー電気泳動質量分析計(CE/TOF-MS)を用いた。代謝フラックス解析は光混合栄養条件と従属栄養条件で行い、^{13}C標識したグルコースを添加した培地で培養し、菌体のタンパク質由来アミノ酸の^{13}C濃縮度の情報より中央代謝経路の代謝フラックス分布を求めた。オミクス解析の結果、栄養条件間の顕著な特徴として、光独立栄養条件と比較して従属栄養条件では、酸化的ペントースリン酸経路に関する遺伝子の発現量、代謝物質の濃度、代謝反応のフラックスが増加し、従属栄養条件における酸化的ペントースリン酸経路の活性化が示唆された。

Synechocystis sp. PCC 6803, Metabolome, Metabolic flux analysis

講演番号：3C20a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ C校舎20会場

リュウキュウアイからの泥藍の製造に関わる微生物の特性

Characteristics of microorganisms related to production of Doroai dye from Ryukyuai

○常盤豊、世嘉良宏斗、市場俊雄（沖縄県工技セ）
○Yutaka Tokiwa, Hiroto Yokaryo, Toshio Ichiba (OITC)

【目的】琉球地域の伝統染織に広く使用されている藍染料は、リュウキュウアイの浸漬液に消石灰を添加して沈澱させた泥藍（琉球藍）である[1)]。泥藍には、藍染料成分（インジゴ）とともに沈澱した浸漬液中の微生物も含まれており、藍染め液の調製にも影響していると思われる。そこで、泥藍の製造条件が、浸漬液および泥藍中の微生物に与える影響について検討したので報告する。

【方法】微生物の特性は、pH 7およびpH10に調整したグルコース、酵母エキス、ポリペプトン等を含む寒天平板培地を用い、30 ℃で培養して調べた。

【結果】リュウキュウアイ浸漬液の微生物（生菌）数は、浸漬１日以内に急激に増大し、その後、大きな変化はなかった。リュウキュウアイ浸漬液からの沈殿藍の調製においては、消石灰の添加量が多い程、回収される沈澱部（泥藍）の体積は増えたが、pH11.1以上では検出できる微生物数は極端に少なくなった。0.08%の消石灰を添加した場合（pH8.7)、沈澱部の微生物が濃縮されることを確認した。

１）沖縄県工業技術センター平成22年度研究報告書、**13**、1-6　(2011)

Indigo, Ryukyuai, doroai,

講演番号：3C20a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ C校舎20会場

好アルカリ性細菌*Exiguobacterium* sp.によるL-乳酸の生産

Production of L-lactic acid by alkaliphilic *Exiguobacterium* sp.

○世嘉良 宏斗、常盤 豊、市場 俊雄（沖縄県工技セ）
○Hiroto Yokaryo, Yutaka Tokiwa, Toshio Ichiba (OITC)

【目的】乳酸は様々な分野で利用されており、特に最近ではプラスチックの原料としても注目されている。微生物による発酵生産が可能なことから食品残渣などの未利用資源を活用したバイオポリマー生産が期待できる。しかしプラスチックとして利用するためには光学純度の高い乳酸が必要となるため、光学純度の高い乳酸を効率的に生産する菌株が求められている。一般的に知られている乳酸菌は主に食品分野で利用されており、中性以下の条件で生育するものが多いが、藍染料や海洋由来の分離源からはアルカリ条件で生育するものも分離・報告されている。このような好アルカリ性乳酸菌のいくつかは高純度のL-乳酸を生産することから、高いpHで生育できる特異な発酵微生物として産業利用できる可能性がある。我々はアルカリ条件で生育する高純度L-乳酸生産株を取得する目的で、沖縄地域で採取した試料を分離源として、pH10のアルカリ条件で生育する乳酸菌を探索するとともに、分離株の生産する乳酸の光学純度や発酵生産性などについて調べた。
【方法と結果】沖縄地域で採取した植物や海水などの様々な試料から、pH10に調整したグルコース添加培地で生育する微生物を分離し、同じくpH10の液体培地中で培養したときの乳酸の生産量をHPLCで分析した。生産した乳酸の光学純度は酵素キットで分析した。アルカリ条件で高い光学純度のL-乳酸を生産する株について、16SrRNA遺伝子領域の解析及び相同性検索を行ったところ、10株が*Exiguobacterium*属に分類される細菌と近縁であることが分かった。これらのうち乳酸生産量が最も多かった株について、効率的に乳酸発酵する条件を検討するため、卓上型培養装置を用いて異なる条件（温度、ｐＨ、培地成分等）で培養したときの乳酸の生産量を比較した。

Exiguobacterium, L-lactic acid, fermentation

講演番号：3C20a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎20会場

Cupriavidus necator による(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸の生産

Production of (*R*) -3-hydroxybutyric acid by *Cupriavidus necator*

○楽　隆生、平賀　美穂、常盤　豊[1]、世嘉良　宏斗[1]、市場　俊雄[1]（甲南化工㈱、[1]沖縄県工技セ）
○Takao Raku, Miho Hiraga, Yutaka Tokiwa[1], Hiroto Yokaryou[1], Toshio Ichiba[1] (Konan Chemical Industry,Co.,Ltd., [1]OITC)

【目的】演者らは、沖縄県産のサトウキビ由来の廃糖蜜や車麩製造時に副生されるデンプン等から、(*R*) -3-ヒドロキシ酪酸の微生物による生産を検討している。(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸は、生分解性プラスチック、ポリ[(*R*) －3－ヒドロキシ酪酸)]（PHB）の単量体であり、また、光学活性な有機機能性材料や抗生物質の原料などキラルビルディングブロックとしても期待できる。今回、PHBからの(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸の生産を目的として、*Cupriavidus necator*を用いてデンプンからの同時糖化発酵法によるPHBの生産について検討した。
【方法】同時糖化発酵のために、種々のグルコース濃度における*C. necator* の増殖挙動を調べた。同時糖化発酵は、デンプンを液化アミラーゼで低粘度にしてから、微生物をシードするときにグルコアミラーゼを添加して行った。
【結果】*C.necator* の培養において、生育阻害を与えない程度の原料のグルコース濃度を確定した。また、グルコースを原料とした*C.necator* の培養において窒素、リンの制限はPHBの蓄積に重要であることがわかった。さらに、デンプンを原料に用いて同時糖化発酵を行い、窒素あるいはリン制限下、*C.necator* の増殖（菌体量と生菌数）とPHB蓄積の関係について検討した結果も報告する。

Cupriavidus necator, poly(hydroxybutyrate), 3-hydroxybutyric acid

講演番号：3C20a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎20会場

天然藍染め染料スクモの高速発酵生産法の開発

Development of high speed fermentation for the production of natural indigo dye “Sukumo”.

○諸麥 豪二、李 恩映、新居 修[1]、大森 勇人[2]、土居 克己[2]、大島 敏久[2]（九大院・生資環、[1]新居製藍所、[2]九大院・農）

○Gouji Moromugi, Unyon Ri, Osamu Nii[1], Taketo Ohmori[2], Katsumi Doi[2], Toshihisa Ohshima[2]（Grad. Sch. Biores. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [1]Niiseiaisyo, [2]Fac. Agr., Kyushu Univ.）

【目的】スクモと呼ばれる天然染色剤を利用する藍染めは、ジャパンブルーと呼ばれる優れた色合いから現在でも人気の高い伝統的な染色法である。このスクモの生産は、原料の蓼藍の乾燥葉に施水し、110～120日間の長期間にわたる発酵法によって行われる。この発酵法は藍師と呼ばれる職人の経験と勘に基づく伝統技術で生産されており、そのため大量生産が困難で合成インジゴと比較して高価である。本研究は、その生産工程を生化学的・分子生物学的・微生物学的手法により分析し、得られた知見をもとに、より迅速・簡便なスクモの発酵生産法を確立し、21世紀型のジャパンブルーの創生を図ることを主な目的としている。

【方法と結果】約110日かかるスクモの発酵生産工程の温度とpHなどの分析を行った。その結果、スクモ内部の温度は発酵開始から数日で室温から60℃付近に上昇し、最終的に70℃付近まで上昇した。一方、pHは、発酵開始時の5.5付近から一旦4.5付近まで低下した後、数日後から次第に上昇し、45日後に9.2付近まで上昇することが分かった。また、スクモ中の殆どのアミノ酸の濃度が減少するとともに、気体のアンモニアの発生が認められた。これらの知見をもとに、三角フラスコに藍葉を入れ振とう培養によってスクモ生産を行い、解析するモデル実験系を組み立てた。一方、藍師の経験的な感によるインジゴ発酵生産工程のモニタリングを科学的に行うために、分光学的測定法を検討した。その結果、水に不溶性なインジゴを有機溶媒のDMSOで抽出し、その可視吸収スペクトル(インジゴに由来する619 nm付近に吸収ピークが存在)により追跡する手法を開発した。この手法によりモデル実験系によるスクモの高速発酵生産法を検討した。その結果、60℃でpH 10.0の高温アルカリ条件下で発酵を行うと、天然スクモと類似の可視吸収スペクトルが得られ、フラスコ内で高速発酵生産が可能であることを見出し、大幅な生産時間の短縮が可能であることが示唆された。また、天然スクモと化学合成インジゴの可視吸収スペクトルの比較から、412 nm付近に前者に特有の吸収ピークが存在することを見出した。さらに、HPLCによる色素の分析の結果、天然スクモと合成インジゴでは、含有されるインジゴ同位体の割合が異なることが判明した。これらの相違が天然藍(スクモ)と合成藍（インジゴ）の色相の相違に関連するかどうかの解明は今後の課題である。なお、本高速スクモから細菌の単離を試みた結果、*Thermoactinomyces vulgaris*と*Geobacillus pallidus*に近縁の好熱・好アルカリ性細菌の分離に成功した。

Indigo,fermentation,dye

講演番号：3C20a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ C校舎20会場

泡盛酒造所間および醸造過程におけるもろみ中微生物叢の解析

Analysis of the microflora in awamori moromi.

○喜舎場拓[1]、平良東紀[1]、塚原正俊[2]、伊藤進[1]（[1]琉球大・農、[2]株式会社バイオジェット）

【目的】沖縄県の伝統的な蒸留酒である泡盛の醸造工程は開放系で行われており、糖化・発酵のために添加される黒麹菌や酵母以外にも、その他の微生物の存在が予測でき、各酒造所間、醸造工程の違いによりもろみ中の微生物叢が異なっていると考えられる。日本酒やウイスキーでは乳酸菌等が風味に影響を与えることが報告されており、泡盛醸造においても混在微生物の解析は重要であると考えられた。本研究では、平板寒天培養法およびPCR-DGGE（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動）を用いてもろみ中微生物叢の解析を行った。

【方法】酒造所間の微生物叢の違いを調べるために、泡盛酒造所のうち15カ所のもろみを用いた。また、もろみ微生物叢の仕込み容器による差異や経時変化についても調べた。平板寒天法ではMRS培地とGPY培地の両方に、異なるpH・アルコール濃度で集積培養を行い、その後、寒天培地に混釈培養して、生育したコロニーをその性状から分離した。分離した細菌の同定は16SrRNAの塩基配列の全長を調べることで行った。また、DGGEによる解析ではWhatman社のFTAカードによりDNAの抽出を行い、1st PCRにより16SrRNA全領域を増幅後、2nd PCRにより16SrRNA V3-V5領域を増幅させてDGGEに供した。DGGEの条件は、8%ポリアクリルアミドゲルに変性剤として尿素とホルムアミドを濃度勾配30%～60%になるように調整し、58℃・80Vで16時間泳動した。泳動後、SYBR Greenで染色し、そのバンドパターンを比較した。さらに主なバンドからDNAを抽出して再度PCRを行い、得られたPCR産物をサブクローニングして塩基配列解析を行った。

【結果】平板寒天培養法では、酒造所間で共通および酒造所で特有の細菌が分離され、*Lactbacillus acetotolerans*などの乳酸菌や*Bacillus amyloliqefaciens*などが含まれていた。また、DGGE解析においても酒造所間で明らかにバンドパターンが異なっており、もろみ中微生物叢に差異があることが分かった。また、同一の酒造所においても、発酵日数ごとに微生物叢が変化することが分かった。さらに、仕込み容器が異なるサンプルでも、明らかなバンドパターンの違いが確認できた。DGGEで得られたバンドの塩基配列解析の結果においても、*L. acetotolerans*、*B. amyloliqefaciens*等の細菌が泡盛もろみ中に存在していることが確かめられた。

DGGE, Awamori moromi, 16S rRNA

講演番号：3C20a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ C校舎20会場

Candida sp.SN-18のグリセロール生成に関わる*glycerol 3-phosphate dehydrogenase*の取得と機能解析
Cloning and functional analysis of *glycerol 3-phosphate dehydrogenase* in relation to glycerol production of *Candida* sp.SN-18

○水島　大貴、石川　浩介[1]、小山　善幸[1]、荻原　淳、加藤　順[1]、春見　隆文（日大院生資科、[1]日大生資科・生化）
○Daiki Mizushima, Kosuke Ishikawa[1], Yoshiyuki Koyama[1], Jun Ogihara, Jun Kato[1], Takahumi Kasumi (Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ, [1] Dept.Chem.Life.Sci.,Nihon Univ)

【目的】 *Candida* sp.SN-18は高浸透圧条件下で適合溶質として大量のグリセロールを生成することが知られている。グリセロール生成においては解糖系glycerol-3-phosphate dehydrogenase（GPD）が鍵酵素と考えられていることから、本菌の*GPD*の完全長cDNAを取得し、高浸透圧条件下での*GPD*の発現量及びグリセロール生成における機能解析を行うことを目的とした。
【方法・結果】 3’RACE法及び染色体歩行法により本菌由来のisogeneである*GPD1*及び*GPD2*を取得した。*GPD1,GPD2*はそれぞれ378アミノ酸残基をコードする1,134 bpの遺伝子であり、両遺伝子から推定されるアミノ酸配列にはN-terminal NAD-bindiding domainとC-terminal substrate-binding domain が存在していることを確認した。*S.cerevisiae*のGPD1との配列比較では、本菌由来のGPD1は53%、GPD2は56%の相同性を示し、基質結合部位の三アミノ酸残基のうち、一アミノ酸残基、のみ異なっていた。*S.cerevisiae*の*gpd1*欠損株に本菌の*GPD*を導入した株は、浸透圧条件下においてグリセロール生成をしていることから本菌のGPDは*S.cerevisiae*のGPD1を相補することを示した。これらのことから、取得した両遺伝子は本菌由来のisogeneである*GPD1,GPD2*と断定し、それぞれ*CaGPD1,CaGPD2*と命名した。
　浸透圧条件下における*CaGPD1,CaGPD2*の発現量は、*CaGPD2*は浸透圧による変動はなく定常的な発現量を示すのに対し、*CaGPD1*は培養36時間以降に発現量が上昇するとともにグリセロールの生産量も上昇することがRT-PCR及びイオン交換クロマトグラフィーを用いた解析により明らかとなった。このことから、本菌は浸透圧環境下において、*CaGPD1*の発現を制御することで適合溶質として大量のグリセロールを生成することが示唆された。

glycerol, glycerol 3-phosphate dehydrogenase, osmotic stress

講演番号：3C20a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎20会場

培養条件の検討による*Candida*属酵母からの高グリセロール生産方法の検討

Cultural conditions of *Candida* species for high yield glycerol production

○ 石川　浩介、水島　大貴[1]、小山　善幸[2]、荻原　淳[1]、加藤　順[2]、春見　隆文[1]（日大・生資科・農化、[1]日大院生資研究科・生資利用、[2]日大生資科・生命化）

○ Kousuke Ishikawa, Daiki Mizushima[1], Koyama yoshiyuki[2], Jun Kato[2], Jun Ogiwara[1], Takahumi Kasumi[1]

(Dept,Agric,Biol,Chem,NihonUniv,[1]Dept.Biores.Util.Sci.,Grad.Sch.Biores.Sci.,NihonUniv,[2]Dept.Chem.Life.Sci.,Nihon Univ)

【目的】グリセロールは化成品や化粧品、化学工業の原料など多方面に利用されているが、油脂工業の副産物から製造されており、さらに広範な用途拡大のためには、効率的で純度の高い発酵法が有利と考えられている。しかし、現状では発酵法の生産収率が必ずしも高くないことがその隘路となっている。*Candida* sp SN-18株は自然界から分離された酵母で、グルコースを炭素源とする培地で培養すると著量のグリセロールを生成する。そこで、本酵母を用いたグリセロールの発酵生産を念頭に、培地、培養条件とグリセロールの生産性について基礎的な検討を行うこととした。
【方法】2%グルコース+1%yeast extract (YE)の培地100mLを500mL三角フラスコに採り、スラントに生育させた*Candida* sp.SN-18株を1白金耳植菌し、前培養を行った。次に、グルコース及び種々の窒素源を含む100mLの培地を500mL三角フラスコに加え、前培養液を植菌し、30℃、200rpmの条件で72hr培養した。培養液は遠心分離により菌体と培養上清に分け、培養上清に含まれるグルコース及びグリセロールなどのポリオール類をイオン交換クロマトグラフィーにより検討した。
【結果】浸透圧耐性とグリセロール生産性を検討するため、20%,30%,40%のグルコースを炭素源として 72hr 培養を行った結果、20%のときグリセロール生産量は 22.51g/L と最も高く、30%で 12.49g/L、40%で 7.48g/L と減少傾向を示した。次に、YE、コーンスティープリカー、硫安、魚粉、Peptone、ソヤレックス、尿素など窒素源の影響を検討したところ、グリセロール生産には YE が最も有効であることが明らかとなった。また、pH4,7,10 で培養を行ったところ、pH10 の培地において生育が認められず、pH4 が 26.4g/L と最も高い生産量を示した。NaCl による塩ストレス、リン酸塩、前培養液の植菌量の違い(1,5,10,20mL)による影響では、2%グルコース+1%YE に 1M NaCl を添加した場合、無添加と比べてグリセロール生産量が約 1/5 に減少した。また、GY 培地を基本としてリン酸塩を添加したところ、$NH_4H_2PO_4$ が最も生産量が高かった。植菌量では、1mL と比べて、20mL が 1.5 倍量のグリセロール生産量を示した。これらの結果をもとに、炭素源としてグルコースを 20%、窒素源として YE を 0.5%とし、30℃、120hr 培養したとき 61g/L と最もグリセロール生産量が高く、消費グルコースあたりの収率は約 50%を示した。

Candida species, glycerol, culture conditions

講演番号：3C20a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ C校舎20会場

プロリン蓄積と一酸化窒素合成の亢進による実用パン酵母の乾燥・冷凍耐性と発酵力の向上

Improvement of stress tolerance and fermentation ability by proline accumulation and enhancement of nitric oxide synthesis in baker's yeast

○笹野 佑、灰谷 豊[1]、大津 厳生、島 純[1]、高木 博史（奈良先端大・バイオ、[1]京大・微生物科学）

○Yu Sasano, Yutaka Haitani[1], Iwao Ohtsu, Jun Shima[1], Hiroshi Takagi (Nara Institute of Science and Technology, [1]Kyoto Univ.)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は発酵生産過程において曝される様々なストレスにより発酵力が制限されている。当研究室では、代謝工学的手法により作製したプロリン（Pro）蓄積酵母が冷凍、乾燥、高浸透圧、エタノール等のストレスに耐性を示すことを明らかにしてきた。最近我々は、Pro を蓄積させた実用パン酵母株が冷凍処理後および高濃度ショ糖を含むパン生地中においても高い発酵力を保持していることを見出した。一方、実験室酵母株では酸化ストレス時において、Pro 分解酵素 Put1 とアセチル化酵素 Mpr1 を介して Pro からのアルギニン（Arg）合成が亢進され、増加した Arg から生成する一酸化窒素（NO）が酸化ストレス耐性に関与することを見出している。さらに、触媒活性や熱安定性が向上した高機能型 Mpr1（Mpr1-K63R, Mpr1-F65L）を実用パン酵母株で発現させると、高温乾燥処理後の発酵力が向上することも明らかにしている。本研究では、実用パン酵母のストレス耐性及び発酵力の向上を目的に、これらのストレス耐性因子を組み合わせて各種製パンストレス（乾燥、冷凍など）条件での発酵に最適な組み合わせを検討した。

【方法】Pro を蓄積すると同時に高機能型 Mpr1-F65L を発現する実用パン酵母二倍体株をセルフクローニング法によって作製した。本菌株は Pro によるフィードバック阻害感受性の低下した変異型グルタミルキナーゼ（Pro1-I150T）を発現させているが、Put1 が正常に機能しているため Pro を蓄積しつつ、ストレスに応答して Pro からの NO 合成が活性化されることが期待される。作製した菌株について乾燥（フィルター上に集菌後、恒温乾燥器にて 37℃、90 分処理）および冷凍（-20℃、3 週間）処理後の細胞生存率、活性酸素種（ROS）レベル、パン生地発酵力を測定した。

【結果】作製した菌株は乾燥ストレス後の細胞内 NO 含量が増加し、対照株（Put1 破壊株）では増加が見られなかったため、実用パン酵母株においてもストレスに応答した Pro から Arg を介した NO 合成機構が存在することが示唆された。本菌株は親株に比べて酸化ストレス耐性（細胞生存率の増加、ROS レベルの低下）が向上していたのに加え、乾燥と冷凍処理に対する耐性も向上していた。これらの結果から、酸化ストレスに応答して Pro から Put1 と Mpr1 を介して合成された NO が、細胞内 ROS レベルの上昇を抑えることでパン酵母に乾燥・冷凍耐性を付与することが示された。さらに本菌株は、乾燥および冷凍処理後の生地発酵力が親株と比較して約 20%向上しており、Pro/Arg 代謝の改変が実用パン酵母の育種に有用であることが実証できた（本研究は生研センターイノベーション創出事業の一環である）。

proline, nitric oxide, baker's yeast

講演番号：3C20a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎20会場

Lactobacillus plantarum VL103 *pflB2* 欠損株によるコハク酸生成

Production of succinct acid by a *pflB2 ldhD ldhL* triple mutant of *Lactobacillus plantarum*.

○辻 聡，今井 祐斗，岡田 早苗，Pascal Hols[1]，佐藤 英一
（東農大応生科・化学、[1]ルヴァンカトリック大学・生命科学）
○Akira Tsuji, Yuto Imai, Sanae Okada, Pascal Hols[1],Eiichi Satoh (Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr., [1]Université Catholique de Louvain)

【目的】これまでの研究で、*L. plantarum* NCIMB 8826株の乳酸生成経路を欠損したVL103株に$NaHCO_3$を二酸化炭素源として供給し、pyruvate carboxylase (PC) やphosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK)、malic enzyme (ME)の高発現や共発現により、コハク酸生成量の向上に成功した[1)]。しかし、*L. plantarum* VL103株はコハク酸以外にも多数の副産物を生成している。そこで、これらの副産物生成経路の欠損の行うことでもコハク酸生成量を向上させることができると考えられる。本研究では副産物として生成が確認されているギ酸に着目した。このギ酸生成経路の欠損により、コハク酸生成に利用される炭素流量の更なる向上を試みた。

【方法・結果】ギ酸生成経路遺伝子の欠損を行うに当たり温度感受性プラスミドpBTEを用いて、欠損用プラスミドpBTE::*pflb2*を作出した。このプラスミドを用いて*L. plantarum* VL103 Δ*pflb2*株（以下VL104株）を取得した。この*L. plantarum* VL104株はこれまでの*L. plantarum* VL103株に比べて生育が減少することが判明した。これは*L. plantarum* NCIMB 8826株の乳酸生成経路を欠損した際にも確認されており、*pflB2*の欠損によりグルコール代謝が減衰したことが影響していると考えられる。また代謝産物を測定したところ、コハク酸、アセトイン、エタノールが検出されたが、コハク酸、アセトインは菌体辺りの生成物量が低下していた。

この*L. plantarum* VL104株に*L.plantarum* 由来PEPCKや*L.plantarum* 由来ME、*Bacillus subtilus* ATCC 23857由来PCを形質転換した。これらの形質転換体をMRS培地にて培養し、代謝解析を行った。*L. plantarum* VL104 PEPCK高発現株、*L. plantarum* VL104 ME高発現株はコハク酸生成量、生育ともに有意な向上は確認されなかった。しかし、*L. plantarum* VL104 PC高発現株は生育の向上が確認され、コハク酸生成量もこれまで頭打ちとなっていた50mM程度を超える61.2mMを示した。以上の結果より、*L. plantarum* VL104 PC高発現株はコハク酸生成量をこれまで以上に向上させることに成功した有用な株であると判断した。また、PC高発現が代謝に影響を与えたのに対して、PEPCKやMEの高発現が代謝に与える影響が低かったことは各酵素の活性の違いに由来していると考えられる。

1) 辻ら 日本乳酸菌学会2009年度大会

Lactobacillus plantarum, succinic acid, metabolic engineering

講演番号:3C20a10
講演日時、会場:3月24日10:49～ C校舎20会場

醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の aspartate：alanine 交換輸送体 AspT の TM3 変異体を用いた基質認識機構の解析

Mutant analisis of Trans Menbrane region 3 of AspT, aspartate：alanine antiporter of lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus*

○木村 拓哉[1]、鈴木 聡美[1]、笹原 綾子[1]、七谷 圭[2]、阿部 敬悦[1,3]（[1]東北大・院・農、[2]東北大・院・工、[3]東北大・未来研）

○Takuya Kimura[1], Satomi Suzuki[1] , Ayako Sasahara[1], Kei Nanatani[2] , Keietsu Abe[1,3] ([1]Dept. of Molecul. and Cell Biol., Grad. Sch. of Agri., Tohoku Univ., [2]Dept. of Biomol. Eng., Grad. Sch. of Eng., Tohoku Univ., [3]Microbial Genomics Lab., NICHe, Tohoku Univ.)

【目的】醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* は L-aspartate (Asp) の脱炭酸反応により L-alanine (Ala) と CO_2 を生成する。この反応は Asp:Ala Antiporter (AspT) の触媒する電位差形成的な Asp:Ala 交換輸送反応と、Asp-β-decarboxylase (AspD)の触媒する Asp の細胞内脱炭酸反応から構成される。我々のこれ迄の研究から AspT に 10 本の膜貫通領域 (TM) があること、第3膜貫通領域 (TM3) が基質透過経路に位置することが明らかになっている。また、アミノ酸を及び阻害剤を用いた輸送の Kinetics 解析から Asp、Ala の基質結合部位が異なることが示唆された。本研究では、TM3 変異体の Asp、Ala 輸送能の違いを調べることで、基質の認識・輸送に関与する TM3 内のアミノ酸残基の特定を行うことを目的とした。また、TM3 変異体のラベリング実験を行い、Asp 、Ala 結合時における AspT の構造の違いを解析した。
【方法】AspT の TM3 を構成する各アミノ酸残基を L-cysteine(Cys) に置換した single cysteine 変異体を作製し、大腸菌を宿主として発現・精製した各変異体を人工膜小胞に再構成し、Asp 及び Ala の放射性基質を用いて、各基質の自己交換輸送反応の初速を測定した。また、Cys 特異的蛍光ラベリングでは AspT 変異体を発現した大腸菌を浸透圧法によって破砕し、得られた膜画分を Asp 及び Ala 存在下で、親水性 SH 基修飾試薬である OGM と共にインキュベートし、TM3 内の親水性領域に存在する Cys を蛍光修飾した。蛍光修飾された AspT を精製し、SDS-PAGE に供した後、蛍光検出、CBB 染色によって、各変異体の蛍光修飾効率を定量した。
【結果】TM3 の Cys 置換体の中に Asp と Ala の自己交換輸送能が大きく異なる変異体が見出されたことから、Asp と Ala の基質結合部位が異なる可能性がより強く示唆された。特に TM3 の細胞質側に存在する親水性の高い領域では、Asp の輸送が大きく低下している残基が多くみられた。この結果から TM3 は Asp の基質認識及び輸送に重要な役割を持つことが示唆された。OGM 修飾では、P79C において、Asp 濃度依存的な蛍光修飾効率の増加が見られた一方で、Ala 存在下では修飾効率の変化が見られなかった。この結果はAspT への Asp の結合が TM3 周辺の構造変化を引き起こすのに対し、Ala の結合ではそのような変化は起こらないことを示しており、両基質の結合時における AspT の構造が異なっていることが示唆された。すなわち、TM3 は Asp の認識・輸送に重要な役割を担い、Ala 輸送については他の TM が関与していると考えられる

antiporter , bacteria , amino acid

講演番号：3C20a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ C校舎20会場

不飽和脂肪酸ハイドロキシル化能の高い乳酸菌の分離と焼酎製造への利用

Isolation and utilization of lactic acid bacteria having hydroxylation ability of unsaturated fatty acids for *shochu* making

○金子　健太郎、進藤　斉、佐藤　和夫、高橋　康次郎（東農大応生科・醸造）
○Kentaro Kaneko, Hitoshi Shindo, Kazuo Sato, Kojiro Takahashi (Tonodai)

【目的】乳酸菌は、生もと仕込み清酒の濃醇な香味や泡盛の特徴香であるバニリン、モルトウィスキーの甘くファッティな香りなど酒類の香味形成において重要な役割を果たしている。本研究では、乳酸菌と酵母との協調により生成される桃様香気成分であるγ-dodecalactone、γ-decalactone を高含有する焼酎を製造するために、焼酎醪の環境下でもその効果が期待されるどぶろくから分離した乳酸菌を用い、①不飽和脂肪酸をγ-dodecalactone、γ-decalactone の前駆物質へ変換するハイドロキシル化能、②醪中の脂肪酸の供給源、③選択した乳酸菌の焼酎醪での各種 lactone 生成能について検討した。
【方法】どぶろくより分離した乳酸菌67株と焼酎酵母SH-4を用い、不飽和脂肪酸を含む液中でδ-nonalatone, γ-dodecalactone及びγ-decalactoneを生成させ、ジエチルエーテル・n-ペンタンで抽出しGLCにて定量し、乳酸菌のハイドロキシル化能を評価した。また、脂肪酸の供給源として黒麹エキス、酵母自己消化により遊離する脂質及び玄米糖化液を用いてγ-lactoneの生成株である当室保存の*Lactobacillus paracasei*の培養を行い、生成した各lactoneを定量した。さらに選抜した乳酸菌について、脂肪酸の供給培地を用いて焼酎の小仕込みを行い、乳酸菌の醪中でのlactone生成能を比較した。
【結果】分離乳酸菌はδ-nonalactone生成菌が17株と最も多く、次いでγ-dodecalactone生成菌11株、γ-decalactone生成菌4株であったが、桃様香の強いγ-dodecalacton、γ-decalactoneの生成量が多かった乳酸菌8株を選抜した。また、玄米糖化液を脂肪酸の供給源とした条件でのみγ-dodecalactoneの生成が確認されたが、この理由として黒麹や酵母よりも玄米表層部の粗脂肪が多いため、醪への遊離脂肪酸の供給量が多いことによると考えられる。選抜した8株と玄米を用いた小仕込み試験では、2次醪においてγ-dodecalalactoneのみが4.8-7.5ppm生成された。以上の結果から、乳酸菌を利用することで焼酎に果実様香を付与することができると考えられた。今後、各lactoneの生成経過等をより詳細に検討する予定である。

講演番号:3C20a12
講演日時、会場:3月24日11:21～ C校舎20会場

乳酸菌による不飽和脂肪酸のヒドロキシル化に関する研究

The Hydroxylation of Unsaturated fatty acid with Lactic acid Bacteria

○鈴木由佳、金内誠、下山田真、石田光晴（宮城大・食産）
○Yuka Suzuki, Makoto Kanauchi, Makoto Shimoyamada, Mituharu Ishida (Miyagidai)

【目的】消費者の食品への安全・安心の高まりから、「天然香料」の需要が高まっている。そのため、各企業では「天然香料」を低コストで安定的に高生産する技術の開発が求められており、その生産技術として、微生物の利用が研究されている。微生物による「天然香料」の生産の中でも、各香料会社で研究されている香気成分は、桃やイチゴなどの果実様香を示すγ-ラクトン類である。γ-ラクトン類は、「天然香料」として精製する場合、原料から抽出できる量が極微量である。このことから、「天然香料」のγ-ラクトン類を大量生産することが期待されている。
これまで、*Penicillium*属や*Empedobacter*属などの微生物を利用し、γ-ラクトン類を精製する方法が研究されてきたが、近年、鰐川ら[1)]は乳酸菌と酵母の発酵によって不飽和脂肪酸から桃の香りを呈するγ-ラクトン類が生産することを報告した。これは、乳酸菌によって不飽和脂肪酸をヒドロキシル化した後、そのヒドロキシ脂肪酸を酵母がβ酸化することで得られるものである。しかし、乳酸菌の不飽和脂肪酸をヒドロキシル化するメカニズムに関しては、まだ不明確な点が多い。そこで本研究では、乳酸菌による不飽和脂肪酸をヒドロキシル化する最適条件の検討及びそのメカニズムの解明を行った。

【方法】天然界から乳酸菌の分離を行った。その後、分離した乳酸菌とγ-ラクトン生成能の高い酵母を選抜し、不飽和脂肪酸(オレイン酸)添加による培養試験を行った。試験培地はＬＢ培地を用いた。また、乳酸菌と酵母それぞれの培養温度、培養時間の条件検討を行い、ヒドロキシ脂肪酸とγ-ラクトン類を高生産する培養条件の検討を行った。培養液中から抽出したヒドロキシ脂肪酸とγ-ラクトン類の検出はGS/MSによって行った。

【結果】乳酸菌の分離の結果、200菌株の乳酸菌を分離した。その後オレイン酸添加による乳酸菌の培養試験の後、その培地に酵母を添加し、さらに培養を行った結果、200菌株の乳酸菌培養液のうち2菌株の乳酸菌培養液からγ－dodecalactoneの生成が確認された。さらに、γ－dodecalactoneが確認された乳酸菌の菌体から、リシノール酸が検出された。また、乳酸菌の培養条件を検討したところ、20℃25時間の培養条件において、ヒドロキシ脂肪酸の生成率が最も高いことが確認された。

1):Akira Wanikawa ,Kenji Hosoi and Taro Kato:J.Am.Soc.Brew.58(2)51-56,2000

Lactic acid bacteria , γ-lactone, Hydroxyl fatty acid

講演番号：3C20a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ C校舎20会場

Lactobacillus plantarum VL103株におけるphosphoenolpyruvate calboxykinase高発現による生育向上

Effect of the overexpression phosphoenolpyruvate carboxykinase on the growth of *Lactobacillus plantarum* VL103

○大場 彩[1]、辻 聡[1]、梶野 敦史[1]、Pascal Hols[2]、岡田 早苗[1]、佐藤 英一[1]（[1]東農大応生科・化学、[2]ルヴァンカトリック大学・生命科学）

○Aya Ohba[1], Akira Tsuji[1], Atsusi Kajino[1], Pascal Hols[2], Sanae Okada[1],Eiichi Satoh[1]（[1]Tokyo University of Agriculture, [2]Université Catholique de Louvain）

【目的】これまでの研究で、*L. plantarum* NCIMB 8826株（WT株）の乳酸生成経路を欠損したVL103株に3種の内因性炭酸固定酵素を高発現し、コハク酸生産量が向上することを報告してきた[1)]。その結果、phosphoenolpyruvate carboxykinase（PEPCK）高発現株はコハク酸生成量の向上と共に生育が向上していることが分かった。この現象は、WT株でPEPCKを高発現した場合にも起こることが分かり、その理由に興味が持たれたが、これまで生育に着目した研究は行われていない。そこで、PEPCK高発現による生育向上の仕組みの推定を行うこととした。

【方法・結果】まず、*E. coli* JM 109、*L. casei* ATCC 393の2種にPEPCKを高発現させ、PEPCK高発現による生育向上が異種菌株でも観察されるのかを調べた。*E. coli* JM 109、*L. casei* ATCC 393のPEPCK高発現株を取得し、代謝を解析したがPEPCK高発現による変化は見られなかった。次にVL103株でPEPCKと同様の経路を触媒する酵素であるphosphoenolpyruvate calboxylase（PEPC）を高発現させ、生育に与える影響を調べた。*L. delbrueckii* subsp. *blugaricus* ATCC 11842のPEPCをVL103株に形質転換し、VL103 PEPC高発現株を取得した。そして、代謝解析を行ったところ、生産物量に差はないものの、生育はPEPC高発現株がPEPCK高発現株に劣るという結果になった。今回の実験結果からPEPCK高発現による生育向上はVL103株が持つ代謝経路が重要であり、PEPCK高発現による代謝流量の変化が生育向上に大きく関与しているのではないかと考えられる。また、WT株とWT PEPCK高発現株で乳酸生成量が同じであること、VL103株でPEPCKを高発現した場合、ギ酸の生成量が約2.2倍になっていることが分かった。このことから、ホスホエノールピルビン酸からリンゴ酸を生産し、そこからmalic enzymeを介してピルビン酸へ流れ、ギ酸を生成する経路がVL103株の生育向上に関与しているのではないかと推定した。また、VL103株のギ酸生成経路を欠損し、PEPCKを高発現させた株では生育向上が起こらなかったため、予想した経路が生育向上に関与している可能性が強く示唆される結果となった。

1) 辻ら 日本乳酸菌学会2009年度大会

phosphoenolpyruvate calboxykinase, growth, *Lactobasillus. plantarum*

講演番号：3C20a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ C校舎20会場

Lactobacillus plantarum NCIMB 8826 株 における糖輸送系遺伝子欠損株の代謝解析

Metabolic characterization of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 deficient on the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system

○塚田 崇典、辻 聡、Pascal Hols[1]、岡田 早苗、佐藤 英一（東農大応生科・化学、[1]ルヴァンカトリック大学・生命科学）

○Takanori Tsukada, Akira Tsuji, Pascal Hols[1], Sanae Okada, Eiichi Satoh (Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr., [1]Université Catholique de Louvain)

【目的】これまでの研究で、*L. plantarum* NCIMB 8826株の乳酸生成経路を欠損したVL103株に内因性の各種炭酸固定酵素を高発現し、コハク酸生成量が向上することを報告してきた[1)]。しかし、これまでの代謝改変による物質生産には未だ改良の余地を多く残している。さらなる*L. plantarum* NCIMB 8826株による効率的な物資生産を目指すため、基質となる糖取込み機構についての調査を試みた。ゲノム情報より*L. plantarum* NCIMB 8826株は糖取込みに関する遺伝子のうちホスホトランスフェラーゼシステム（PTS）の遺伝子を他菌種と比較しても多く保持している。そこで、糖取込み機構に関する研究の基盤として*L. plantarum* NCIMB 8826株のPTSに着目しその遺伝子の一つである*ptsI* の欠損を試みた。

【方法・結果】相同組換えにより*L. plantarum* NCIMB 8826株の*ptsI* 欠損株を取得した。PTSおよび非PTSによる糖取込みの探索を行うため、まず*ptsI* 欠損株における糖類資化能試験を行った。試験には本菌株が通常資化可能な15種の糖類を用いた。その結果、フルクトース、ソルビトール、マンノースなど13種を単一糖源とした培地での生育が不能となった。これらの糖はPTSを介して細胞内に取り込まれていたことを示す結果となった。一方でグルコースとマルトースを単一糖源とした培地では資化能が認められPTS以外の輸送体で糖の取込みが行われていることが示唆された。現在、*ptsI* 欠損株において生育が確認された糖源を用いた際の有機酸などの代謝産物量の測定や、PTSに関連する遺伝子の発現量について野生株と比較し*ptsI* 欠損による影響について詳細な解析を進めている。

1) 辻ら 日本乳酸菌学会2009年度大会

Lactobacillus plantarum, phosphotransferase system , metabolic engineering

講演番号:3C20p02
講演日時、会場:3月24日14:00～ C校舎20会場

キャピラリー電気泳動を用いた27種類の濃口醤油のクラスター分析

Cluster analysis of 27 *koikuchi* soy sauces with capillary electrophoresis

大西 茂彦、○松岡 博美、浅井 貴子、稲津 忠雄(香川産技センター)
Shigehiko Ohnishi, ○Hiromi Matsuoka, Takako Asai, Tadao Inazu (KagawaITC)

【目的】醤油の成分情報により自他社製品の特徴を簡便に把握できれば、新製品開発等において強力なツールとなりうる。醤油の品質評価は通常、官能検査と全窒素、塩分、アルコール、ｐＨなどの分析により行われているが、これらの限られた情報で複数の製品間の品質差異を正確に把握することは難しい。一方、醤油成分を高速液体クロマトグラフィなどで詳細に分析する方法も考えられるが、分析試料調製の煩雑さや分析時間の長さ等に問題がある。そこで、より簡便に多成分の同時分析が可能なキャピラリー電気泳動システムを用い、濃口醤油27製品を成分分析してクラスター分析することで、複数製品間の品質差異が評価できるか検討した。
【方法】市販されている本醸造濃口醤油27製品(大手メーカー4社7製品、中小メーカー19社20製品)を超純水で50倍希釈した後に、膜分画分子量30,000の限外ろ過フィルターでろ過してキャピラリー電気泳動システム(ベックマン・コールターP/ACEシステムMDQ)に供した。キャピラリーは内径50 μm、有効長1,020 mmのヒューズドシリカ管(ベックマン・コールター)を、電気泳動用緩衝液はベーシックアニオンバッファ(アジレント・テクノロジー)を使用し、15℃で－30 kV、30分間印加して無機塩1種(塩化物イオン)、有機酸5種、アミノ酸15種および単糖2種の計23成分を分離し、230 nmにおける間接吸光度法で検出した。分析データの階層的クラスター分析と主成分分析にはケモメトリックス用ソフトウェアPirouette Ver 4.0(GLサイエンス)を用いた。
【結果】成分分析の結果をオートスケールで正規化してインクリメンタル法で階層的クラスター分析を行い、27の濃口醤油のクラスター化を試みた。その結果、分析した醤油は50%以上の類似度を示す5つのクラスターに分類された。また、同一メーカーの生揚醤油を使用している3製品は、約80%の類似度で同じクラスターに分類された。次に、成分分析の結果をオートスケールで正規化して主成分分析を行った。その結果、27種類の醤油は、第１主成分(寄与率48.0%)および第２主成分(17.2%)で65%の分散が説明できた。ローディングプロットの結果、第１主成分はグルタミン酸を含む11種類のアミノ酸(＋)および塩化物イオン(－)と相関が高いことから「アミノ酸／塩分比」を、第２主成分は乳酸(－)、酢酸(－)、クエン酸(＋)およびリンゴ酸(＋)と相関が高いことから「醸造中の乳酸発酵の程度」を表していると考えられた。27種類の濃口醤油をスコアプロットし、階層的クラスター分析の結果を適用したところ、今回分析した醤油は、大手メーカーの製品が多く含まれるグループ(6製品)を中心として、アミノ酸／塩分比が大きいグループ(3製品)と小さいグループ(4製品)、醸造中の乳酸発酵が旺盛なグループ(3製品)と過少と思われるグループ(11製品)の5つにクラスター化することができた。キャピラリー電気泳動システムは、醤油の呈味成分や、醸造過程で消長する成分を網羅的かつ短時間に分析できることから、ケモメトリックス分析と併用することで醤油の品質管理や醸造管理にも利用できると考えられた。

cluster analysis, *koikuchi* soy sauces, capillary electrophoresis

講演番号:3C20p03
講演日時、会場:3月24日14:11～ C校舎20会場

27種類の濃口醤油のピログルタミン酸と他の成分の回帰分析

Regression analysis of pyroglutamic acid and other components in 27 *koikuchi* soy sauces

○大西 茂彦、松岡 博美、浅井 貴子、稲津 忠雄(香川産技センター)
○Shigehiko Ohnishi, Hiromi Matsuoka, Takako Asai, Tadao Inazu (KagawaITC)

【目的】醤油中の主要な呈味成分であるグルタミン酸は、原料である大豆等のたんぱく質が醸造中に分解されて遊離するものと、同じくたんぱく質由来のグルタミンが、麹菌の生産するグルタミナーゼによって変換されて生成するものからなっている。一方、醸造中にグルタミンやグルタミン酸の一部は非酵素的に、まったく呈味性のないピログルタミン酸に変換される。よって、醤油醸造において、グルタミン酸が多くピログルタミン酸が少ない製品を作ることが重要となる[1)]。本研究では、主にキャピラリー電気泳動システムを利用して濃口醤油27製品の成分と全窒素およびpHを分析し、回帰分析によりピログルタミン酸含量と相関の高い成分等を調べることにより、ピログルタミン酸含量の多い醤油の成分傾向を調べた。
【方法】市販の濃口醤油27製品(大手メーカー4社7製品、中小メーカー19社20製品)の成分のうち、塩化物イオン、有機酸5種、アミノ酸15種および単糖2種の計23成分はキャピラリー電気泳動システム(ベックマン・コールターP/ACEシステムMDQ)を用いて一斉分析した。エタノールはガスクロマトグラフ法で、全窒素はケルダール法で分析した。分析データのPartial Least Squares (PLS)回帰分析にはケモメトリックス用ソフトウェアPirouette Ver 4.0(GLサイエンス)を用いた。
【結果】取得した分析データをオートスケールで正規化し、ピログルタミン酸を目的変数、その他の成分等を説明変数としてPLS回帰分析することにより醤油中のピログルタミン酸含量の説明を試みた。ローディングプロットの第１主成分の解析から、ピログルタミン酸含量が多い醤油は、クエン酸およびリンゴ酸が多く、乳酸、酢酸およびグルタミン酸が少ない傾向にあった。醸造過程において、醤油乳酸菌の代謝により乳酸および酢酸が生成するだけでなくクエン酸およびリンゴ酸が減少することが知られていることから[2)]、乳酸発酵が緩慢な醤油はピログルタミン酸が多く、グルタミン酸が少ない、と解釈できた。醤油醸造初期において過剰に乳酸発酵が進行して諸味pHが下がると、グルタミナーゼ活性が低下してグルタミンのグルタミン酸への変換が抑制され、相対的にピログルタミン酸量が増加するとされているが[1)]、その他の醸造ステージにおける乳酸発酵とピログルタミン酸生成の関係についての知見は少ないことから興味深い結果といえる。一方、第２主成分の解析から、ピログルタミン酸含量が多い醤油は、塩分(塩化物イオン)が多く、グルタミン酸が少ない、という傾向が読み取れた。第１主成分と第２主成分で作成したピログルタミン酸含量の予測モデル値と実測値の相関を調べたところ、相関係数(R^2)は0.6488と比較的高い値を示した。今回の分析結果から、ピログルタミン酸の多い醤油は、「乳酸発酵が緩慢」で「塩分含量が多い」傾向にあることが確認された。

1) 栃倉辰六郎　編著, 醤油の科学と技術, 日本醸造協会, 1994, p.8-9.
2) 栃倉辰六郎　編著, 醤油の科学と技術, 日本醸造協会, 1994, p.192-193.

pyroglutamic acid, *koikuchi* soy sauces, regression analysis

講演番号：3C20p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎20会場

発酵改善のための酵母総合診断システムの開発

Development of yeast diagnosis system for improvement of fermentation

○善本　裕之、榎本　賢一、目瀬　友一朗、川久保　武、櫟　友彦（キリンビール・酒類センター）
○Hiroyuki Yoshimoto, Kenichi Enomoto, Yuichiro Mese, Takeshi Kawakubo, Tomohiko Ichii (Kirin Brewery Company Limited)

【目的】酵母の生理状態を正確に把握することは、高品質のビールを安定して製造するために不可欠である。これまで酵母細胞内pH(ICP法：Intracellular pH法)により酵母活性を推定していたが、商品特性や製造方法が多様になり、既存のICP法だけでは発酵における問題の発生を予測することが困難な事例が増加してきた。特に、発酵不良やオフフレーバー発生は原因の特定がされずに、それらの適切な対応策が打てない場合があった。今回、イメージプロセシングプログラムCalMorphを用いた酵母細胞形態定量解析(日本生物工学会2009年度大会で報告)やキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計（CE-TOFMS）を用いた酵母細胞内代謝物濃度解析(日本農芸化学会2010年度大会で報告)の技術を活用し、酵母の生理状態をより表現形及び代謝産物レベルで比較解析できる技術(酵母総合診断システム)を開発した。この手法を用いることにより、事象発生の初期段階での原因を推察することができるようになり、現象に即した適切な対応を取ることで酵母繰りの改善や品質向上に貢献することが期待できる。

【方法】ヒトの健康診断で行われる身長等の測定や血液検査の考え方をビール酵母の診断に応用した。細胞壁、アクチン、核が染色された細胞形態の定量値やイオン性低分子の網羅的な解析による細胞内代謝物濃度を活用して、酵母細胞生理状態を多面的、且つ定量的に把握し、酵母集団の状況を比較解析できる技術(人間ドックの酵母バージョン)へと繋げた。従来のICP法では、細胞内pHという数値指標で生理状態を表現していたために原因となる物質や代謝を明らかにすることができなかったが、新しい方法では細胞の形や細胞内の物質の違いを多面的に定量評価することができる。これらの関係をデータベース化して比較検討することで、その酵母が抱える課題の原因を表現形及び物質レベルで推定した。今回は、発酵不良を発生したサンプルについて、酵母総合診断システムによる解析を行った。

【結果】発酵不良を発生した酵母サンプルと正常な発酵の酵母サンプルの細胞形態定量値や細胞内代謝物濃度を測定する酵母総合診断システムによる解析を行い、過去のデータと比較をしながら、原因の推定を行なった。その結果、発酵不良を発生した酵母サンプルの細胞形態や細胞内代謝物は、正常な発酵の酵母サンプルと比較して、異常な細胞形態や代謝経路上の律速が観察された。これらのデータから具体的な対応策を検討し、現象に即した適切な対応を取り、酵母繰りの改善や品質向上に繋げることができた。今後、ICP、細胞形態、細胞内代謝物との相互関係を明確にしてデータベースを充実させると共に、酵母診断技術を更に向上させて行きたい。

Yeast, Morphology, Metabolite

講演番号：3C20p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ C校舎20会場

糖類以外の栄養源がビール類の発酵性・香味に及ぼす影響について

Effects of non-sugar nutrients concentration on fermentation and beer taste.

○川久保　武、岩崎　健太郎、田中　美佐、目瀬　友一郎、林　伸之、善本　裕之（キリンビール・酒類センター）

○Takeshi Kawakubo, Kentaro Iwasaki, Misa Tanaka, Yuichiro Mese, Hiroyuki Yoshimoto (Kirin Brewery Company Limited)

【目的】糖類と糖類以外の栄養源(例えば、アミノ酸や微量元素等)のバランスが酵母の生理状態を変化させ、ビールの発酵性・香味に影響を及ぼすことが知られている。発泡酒や新ジャンル（第３のビール）の様にビールと比較して糖類以外の栄養素が不足している条件下では、まれに発酵遅延や発酵由来の香味上の課題が発生する場合がある。一方、糖類以外の栄養源の中で、微量栄養素（ビタミン・ミネラル）の種類・濃度とビール酵母の発酵性やビール品質の関係は部分的にしか明らかになっていない。そこで、ビタミン・ミネラルの濃度が少ない条件下でビール酵母を発酵させた際の発酵性・香味に及ぼす影響について調査した。

【方法】ビタミン・ミネラルの含有量を調節した合成培地もしくは、ビール類の発酵前液を用いて発酵試験を実施した。これらの発酵に使用した酵母に対して、CalMorphを用いた細胞形態定量値、及びCE-TOFMSを用いた細胞内代謝物濃度の解析を行い、生理状態を推定すると同時に、ミネラル・ビタミンの作用機構について調査した。

【結果】様々な条件で試験を行った結果、ビタミン・ミネラルなどの栄養源の少ない条件下での発酵では、連用（一度発酵に使用した酵母を回収し次回の発酵へ添加する操作）回数を経る毎に発酵が遅延する事や、閾値を越えた有機酸濃度の上昇といった課題が存在する事が明らかになった。有機酸濃度・発酵遅延について、様々な栄養素の寄与を調査した所、カリウム・チアミンを一定濃度以下に制限した場合に、発酵遅延・有機酸濃度が顕著に増加する事が明らかになった。これらの発酵に使用した酵母に対する細胞形態定量値や細胞内代謝物濃度の解析結果から、細胞サイズの減少、有機酸バランスの変化等が観察され、酵母の生理状態が変化し、酵母の有機酸代謝や糖代謝に異常が生じている事が明らかになった。これらの結果から、ビタミン・ミネラルの糖類以外の栄養源が不足した条件で発酵を実施した場合、酵母の生理状態が変化し、発酵の遅延や香味の異常を生じる事が明らかになった。これらの知見を蓄積・応用していく事で、麦芽由来の栄養源が少ないビール類の製造においても、発酵不良や香味上の課題を発生させない制御法の開発に繋げて行きたいと考えている。

Fermentation, Trace elements, Yeast metabolism

講演番号：3C20p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ C校舎20会場

薬剤による酵母中心代謝制御

Chemical regulation of yeast central metabolism

○松田史生、近藤昭彦[1]（神戸大・自然科学、[1]神戸大・工）
○Fumio Matsuda, Akihiko Kondo (Kobe Univ.)

【目的】薬剤を利用した微生物代謝制御について代謝物プロファイル分析法を用いて再検討を行った。これまで中心代謝経路の各反応ステップを阻害するさまざまな薬剤が報告されているが、薬剤の処理が微生物中心代謝全体に与える影響には不明な点が多い。そこで本研究では、真核生物のモデル生物である出芽酵母に代謝阻害剤を処理し、中心代謝経路に生じる変化を代謝プロファイル分析法を用いて解析した。

【方法】出芽酵母実験室株(*Saccharomyces cerevisiae*, YPH499株)を96穴ウェルプレート中、YPD培地中で培養し(30℃、200 rpm)、濁度の上昇から増殖速度を検定するハイスループットな系を構築した。生育阻害活性の見られた代謝阻害剤について、500 mLのYPD培地中で浸とう培養を行い、代謝物プロファイルの経時的な比較を行った。酵母菌体はフィルターでろ集後、クロロホルム―メタノール―水法をもちいて、代謝物を抽出した。代謝物プロファイル分析は、糖リン酸、αケト酸、補酵素については液体クロマトグラフィー―タンデム四重極型質量分析計のMRMモードで行い、(LC-MS/MS, Agilent 6460)、有機酸、アミノ酸、糖については、GC-MSを用いたメタボローム分析法に従って実施した。

【結果】３種の代謝阻害剤、エコナゾール（ステロール生合成阻害)、グリホサート（芳香族アミノ酸生合成阻害)、メナジオン（TCAサイクル阻害）について、96穴プレートを用いたアッセイ法で培養開始18時間後の生育阻害活性を調べたところ、エコナゾール、メナジオンは強い活性を示した。50%生育阻止濃度pIC50はエコナゾール、メナジオンでそれぞれ6.1, 4.3だった。一方、グリホサートは全く活性を示さなかった。活性の見られたエコナゾール、メナジオンについてフラスコスケールでの培養を行い、培養開始16時間後に薬剤を投与した。投与後、0, 2, 4, 7, 24時間後に菌体を回収し、代謝物プロファイル分析を行った。分析の結果、40以上の中心代謝関連化合物を同時に定量できた。エコナゾール処理後の代謝物プロファイルをコントロールと比較したところ、大きな変化が見られず、静菌的な作用が起きていると推測された。一方、メナジオン処理区では、TCAサイクルの中間体である、クエン酸の増加と、フマル酸、リンゴ酸、コハク酸の減少が起きた。これはメナジオンのターゲットであるアコニターゼの阻害を反映したものであると考えられた。また、メナジオン処理区ではペントースリン酸経路の中間体の含量が著しく増加していた。これは、メナジオン処理により生じた酸化還元バランスの変化に対抗するために、酵母代謝経路中では、酸化的リン酸化経路を活性化して、NADPHの再生を行っていると推測された。

metabolic inhibitor, Saccharomyces cerevisiae, metabolic profiling analysis

講演番号：3C20p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎20会場

放線菌の新規窒素代謝経路の解明

Analysis of a novel nitrogen metabolism in actinomycete *Streptomyces coelicolor*

○小口　悠、佐々木　康幸、小林　卓矢、高谷　直樹[1]、矢島　俊介、池田　治生[2]、高野　英晃[3]、大澤　貫寿、祥雲　弘文（東農大応生、[1]筑波大・生命研、[2]北里大・北里生命研、[3]日大生資科・生命セ）

○ Haruka Oguchi, Yasuyuki Sasaki, Takuya Kobayashi, Naoki Takaya[1], Shunsuke Yajima, Haruo Ikeda[2], Hideaki Takano[3], Kanjyu Osawa, Hirofumi Shoun (Dept. of. Biosic., Tokyo Univ. of Agri., [1]Grad. Sci. of Life and Env. Sci., Univ. of Tukuba, [2]Inst. For Lifesci., Kitasato Univ., [3]LSRC. Fac. of Biore., Nihon Univ.)

近年、我々は脱窒放線菌 *Streptomyces antibioticus* に有機体窒素からの NO_2^-生産能を見いだした。阻害剤等を使用した生化学的実験から、NO_2^-生産活性について、以下の作業仮説が考えられた。すなわち、[有機体窒素→NO→NO_3^-→NO_2^-→NH_4^+→グルタミン]をたどる NO を介した代謝系である。また、この新規窒素代謝系には、膜結合型 nitrate reductase (dNar)、flavohemoglobin (Fhb)、同化型 nitrite reductase (aNir)、そして glutamine synthetase (GS) が関与していることが考えられた。既知の知見では dNar は嫌気かつ NO_3^-存在下で生産される呼吸系の酵素として知られているが、*S. antibioticus* では恒常的に生産されていた。また、aNir は唯一の窒素源を NO_3^-あるいは NO_2^-とした際に生産され、同化系の酵素として知られているが、*S. antibioticus* では天然培地で生育しているにも関わらず、生産していることが示唆された。このように、今までの知見とは異なる状況下での酵素活性が得られたことから本代謝の意義を検証することは興味深い。本研究では、*S. antibioticus* では遺伝情報が不足であった為、同様の現象が確認されており、全ゲノム解読済みである *S. coelicolor* A3 (2) M145 を用い、作業仮説の検証及び本代謝の意義を明らかとすることを目的とした。

本代謝に関わると考えられる遺伝子の発現確認を行ったところ、Fhb,dNar,aNir の発現が確認された。また、破壊株を作成し、dNar, aNir 破壊株と野生型の表現型の比較により、本代謝が行われる意義についての検証を行った。

Streptomyces, Nitrogen metabolism, Nitric oxide

講演番号：3C20p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎20会場

グリオキシル酸経路が*Acetobacter aceti*の酢酸代謝に与える影響

The role of glyoxylate pathway in acetate metabolism of *Acetobacter aceti*

○山崎 翔子、桜井 健太、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫（東大院農生科・応生工）
○Shoko Yamazaki, Kenta Sakurai, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi (Dept. of Biotech., Univ. Tokyo)

【背景・目的】
酢酸菌はアルコールや糖を有機酸や糖酸に酸化する能力をもち、食酢醸造や物質生産に用いられている。*Acetobacter aceti*はエタノールを酢酸に酸化して培地中に一時的に蓄積した後、酢酸を資化する性質をもつ。ドラフトゲノム解析の結果、*A. aceti*はグリオキシル酸経路を有していた。酢酸生成菌の中にはグリオキシル酸経路を持たないものも知られているため、その役割に興味がもたれた。グリオキシル酸経路はTCA回路の補充経路として知られており、酢酸を唯一炭素源として利用する際重要な役割を担っている。酢酸を資化する*A. aceti*において、グリオキシル酸経路が酢酸代謝、酢酸耐性に対して果たす役割を調べた。
【方法】
*A. aceti*のグリオキシル酸経路構成遺伝子(*aceA, glcB*)を破壊した株GLP1を作製した。主な炭素源としてエタノール、エタノール＋グルコース、酢酸を与えた場合の、野生株とGLP1の生育とエタノール、酢酸の培地中濃度変化を調べた。また、野生株、GLP1のADH、ALDH活性測定と、主な炭素源としてエタノール、エタノール＋グルコースを与えた場合のトランスクリプトーム解析を行った。さらに、酢酸を主な炭素源とした培地について、酢酸濃度を変化させたときの野生株とGLP1の生育を比較した。
【結果】
野生株とGLP1の生育を比較したところ、エタノール、エタノール＋グルコース培地において、GLP1の生育が野生株より悪くなり、酢酸の蓄積・消費も遅くなった。この傾向は特にエタノール＋グルコース培地で顕著にみられた。グルコースを含む培地ではグリオキシル酸経路が存在しなくてもTCA回路への補充が行えるためこの結果は意外であった。ADH、ALDH活性は野生株とGLP1との間にほぼ差がなく、グリオキシル酸経路の有無はエタノールからの酢酸生成能には影響がないことが示された。マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、エタノール＋グルコース培地で培養したとき、GLP1の*maeA* (malic enzyme)、*acs2* (acetyl-CoA synthase)、*katE* (catalase)、molecular chaperon、一部のNAD^+-ALDH等の発現が上昇していた。TCA回路の構成遺伝子の発現は同程度であった。これらの結果から、GLP1ではグリオキシル酸経路の代わりにmalic enzymeが補充経路として働いている可能性や、細胞内に何らかの酸化ストレスが生じていることで生育が悪くなった可能性が示された。また、異なる濃度の酢酸培地で培養したとき、GLP1は野生株と比較して生育が悪くなったものの、増殖可能な酢酸濃度は変わらなかった。以上の結果より、グリオキシル酸経路は*A. aceti*の酢酸代謝には寄与するが酢酸耐性には大きく影響しないことが示唆された。

Acetobacter, acetic acid bacteria, glyoxylate pathway

講演番号：3C20p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎20会場

酢酸菌*Acetobacter pasteurianus* SKU1108の膜結合型アルデヒド脱水素酵素が酢酸発酵に関与する遺伝学的証拠

Genetic evidence for involvement of a membrane-bound aldehyde dehydrogenase in the acetic acid fermentation of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* SKU1108

児玉知大，○薬師寿治，松谷峰之介，ティーラグール・ガンジャナ[1]，松下一信（山口大・農，[1]カセサート大・理）

Tomohiro Kodama, ○Toshiharu Yakushi, Minenosuke Matsutani, Gunjana Theeragool[1], and Kazunobu Matsushita (Yamaguchi Univ., [1]Kasetsart Univ.)

【目的】酢酸菌による酢酸発酵は，本菌の細胞質膜に存在するピロロキノリンキノン（PQQ）依存のアルコール脱水素酵素とモリブドプテリン依存のアルデヒド脱水素酵素（ALDH）による二つの酸化反応の結果であると説明される。しかしながら意外にも，ALDHの酢酸発酵への関与について生理学的な証拠は少なく，遺伝学的な根拠もないというのが現実である。本研究は，酢酸発酵におけるALDHの関与を遺伝学的に実証することを目的に，その遺伝子破壊株の作製を行った。ALDHは三つのサブユニットから構成されており，推定アミノ酸配列からサブユニットI（*aldH*遺伝子にコード）はモリブドプテリンを持つ脱水素酵素サブユニット，サブユニットII（*aldF*）は3つのヘムCを持ち，ユビキノンと反応するチトクロムサブユニット，サブユニットIII（*aldG*）は[Fe-S]クラスターを持つ電子伝達サブユニットであると考えられる。しかしながら，複数の研究グループが独立に様々な酢酸菌からのALDH精製を報告しており，その補欠分子族やサブユニット構成などで現在でも整合性がとれていない。例えば，昨年，*Gluconacetobacter diazotrophicus*から，PQQ依存性ALDHの精製の報告があった。このような背景からも，生理学的に重要なALDHを特定する必要がある。【方法】最近我々がドラフトゲノムを解析した酢酸菌*Acetobacter pasteurianus* SKU1108の*aldH*遺伝子について，相同組み換えに基づく「マーカー・フリー法」によってインフレーム欠失体を作製した。広宿主域ベクターを用いて，推定プロモーター領域を含む*aldFGH*，ならびに推定プロモーター領域と*aldH*のみを持つプラスミドを構築した。【結果と考察】我々が作製したΔ*aldH*株は，酢酸発酵条件（4%エタノール培養）でほとんど生育できず，酢酸の生成もほとんどみられなかった。この表現型は*aldFGH*を含むプラスミドを持たせることで完全に回復した。我々の知る限り，この膜結合型のALDHが酢酸発酵に関与するという遺伝学的証拠を示したのは，これが最初の報告である。しかしながら，膜画分を用いたin vitroでのALDH活性を調べたところ，Δ*aldH*株は野生株よりも低下していたが，野生株の35%を保持していた。野生株とΔ*aldH*株の膜画分を用いて，ALDHのアセトアルデヒドに対するミカエリス定数を求めたところ，それぞれ1.5 mMと12 mMとなり，異なる分子種の酵素が働いていることが示唆された。また，ドラフトゲノムデータから，*aldFGH*遺伝子と相同性の高い遺伝子群がもう１セット存在することがわかったので，このパラログがΔ*aldH*株で機能していることが考えられる。

acetic acid bacteria, *Acetobacter* sp., molybdopterin

講演番号：3C20p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ C校舎20会場

*Acetobacter pasteurianus*の酢酸排出能に対する培養条件及び菌膜多糖の影響

Effect of culture conditions and pellicle polysaccharide on acetic acid efflux by *Acetobacter pasteurianus*

○川邉　宣彦，Watchara Kanchanarach，薬師寿治，足立収生，松下一信（山口大・農）
○Nobuhiko Kawabe, Watchara Kanchanarach, Toshiharu Yakushi, Osao Adachi, Kazunobu Matsushita (Dept. of Biol. Chem., Fac. Agriculture, Yamaguchi University)

【目的】　酢酸菌は、α-proteobacteria に属している好気性細菌であり、エタノール、糖アルコール、そして糖を対応する酸に酸化する強い酸化力を有している。中でも、*Acetobacter* 属酢酸菌は高濃度の酢酸に耐えることが可能であり、少なくとも、酢酸の排出系 [1,2] と酢酸の受動拡散を抑制する細胞表層の菌膜多糖 [3] が関与していることが示唆されている。この排出系及び菌膜多糖がどのように酢酸耐性に関与しているかどうかを調べるため、酢酸発酵条件下と非発酵条件下で培養した菌体、さらに多糖を生成する R 株と生成しない S 株について比較解析した。

【方法】　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* IFO 3283 の S 株と R 株、さらに耐熱性酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 株とその高温発酵適応変異株 TH-3 株の休止菌体を用いて、酢酸の受動拡散活性を [1-^{14}C]酢酸ナトリウムの取り込み(pH 3.5)によって調べた。また、R 株から多糖を精製し、それを S 株と共存させることによって、酢酸の取り込みへの影響を調べた。

【結果】　IFO 3283 株と SKU1108 株における酢酸の受動拡散は、呼吸基質を加えることで強く抑制され、これらの株でエネルギー依存的な酢酸排出系が機能していることが示唆された。また、この受動拡散活性は TH-3, SKU1108, IFO 3283 の順で強くなるため、酢酸耐性能は TH-3 が最も強く、IFO 3283 が最も弱いと考えられた。

一方、IFO 3283 の R 株と S 株では、既報 [3] に比べより顕著に R 株で酢酸の拡散が抑制された。そこで、菌膜多糖がこの現象に関与していると考え、R 株から精製した菌膜多糖を S 株と共存させて酢酸の拡散を調べた。その結果、多糖濃度を増やすほど、酢酸の拡散は抑制された。

以上の結果は、非発酵条件下で培養した菌体から得られた結果であるが、酢酸発酵条件下で培養した菌体で、同様の実験を行い、その受動拡散活性を検討しているので、併せ報告する。

文献

(1) Matsushita K, Inoue T, Adachi O, and Toyama H, *J. Bacteriol.*, 187, 4346-4352 (2005)
(2) Nakano S, Fukaya M, and Horinouchi S, Appl. *Environ. Microbiol.*, 72, 497-505(2006)
(3) Kanchanarach W, Theeragool G, Inoue T, Yakushi T, Adachi O, Matsushita K, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(8), 1591-1597(2010)

Acetic acid bacteria, Acetic acid resistance, Pellicle polysaccharide

講演番号：3C20p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ C校舎20会場

階層的な代謝応答から理解する大腸菌緊縮応答の代謝メカニズム

Hierarchical manner of metabolic response under the stringent response in *Escherichia coli*

○ 斎藤　菜摘、中東　憲治、増田　豪、曽我　朋義、冨田　勝　（慶大・先端生命研）
○Natsumi Saito, Kenji Nakahigashi, Takeshi Masuda, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita (Inst. Adv. Biosci. Keio Univ.)

【目的】細胞の代謝は、転写、翻訳、翻訳後修飾、酵素反応といった異なるレベルの生体反応の相互作用で機能しているため、そのメカニズムは非常に複雑である。我々は、このようなシグナル伝達における代謝システムを明らかにするために、細胞の全代謝物質（メタボローム）を網羅的に解析する技術であるメタボロミクスをコア技術に利用し、大腸菌の緊縮応答をモデルケースとした代謝メカニズムの研究を行っている。
【方法】IPTG誘導系を用いて*relA*遺伝子を大腸菌で発現し、細胞内でグアノシン4リン酸 (ppGpp) を誘導的に合成した。時系列で代謝物質およびタンパク質を抽出し、キャピラリー電気泳動–飛行時間型質量分析計（CE-TOFMS）によるメタボローム解析と同時に高速液体クロマトグラフィー一質量分析計（LC-MS/MS）によるプロテオーム解析を行った。独自に構築した試験管内のOne pot 酵素反応系を利用して、これらの網羅的解析から示唆された代謝メカニズムを検証した。
【結果】大腸菌緊縮応答下の時系列メタボローム解析で取得した代謝変動パターンは、k-meansクラスタリング法により、時間的な濃度変化の挙動が異なる６つのグループに分類された。ヌクレオチド合成系や解糖系の中間体代謝物質は、蓄積したppGppに速く応答して（15分以内）代謝物質濃度が変動した。一方、これら速い応答を示した代謝物質に関連する酵素群の細胞内量にはほとんど変動が見られなかった。これに対して、誘導後に遅延して（30分以降）蓄積してくる代謝物質とその合成酵素の間には、それらの量的変動に正の相関が認められた。One pot 酵素反応系による検証から、緊縮応答下で酵素量に依存しない代謝物質変動は、酵素に対するppGppの直接的な阻害効果や代謝フィードバックによる影響であることが示唆された。これらの結果は、メタボロームの時間依存的な“階層的”変動が、代謝制御メカニズムを表現していることを示唆した。

stringent response, metabolomics, ppGpp

講演番号：3C20p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎20会場

腸内常在菌が大脳皮質メタボロームに与える影響

Impact of intestinal microbiota on metabolome of cerebral cortex

○松本 光晴[1,2]、木邊 量子[2]、大賀拓史[3]、相場勇志[4]、澤木笑美子[1]、古賀泰裕[4]、辨野義己[2]（[1]協同乳業・技術開発、[2]理研・辨野研、[3]HMT、[4]東海大・医）

○Mitsuharu Matsumoto[1,2], Ryoko Kibe[2], Takushi Ooga[3],Yuji Aiba[4], Emiko Sawaki[1], Yasuhiro Koga[4], Yoshimi Benno[2] ([1]Kyodo Milk Industry, [2]Benno Lab. RIKEN, [3]HMT, [4]Tokai Univ. Medicine)

【目的】腸内常在菌が宿主に多大な影響を与えているのは周知の事実である。近年では動物の行動に関わる脳機能への影響も報告されている。腸と脳は、神経系や液性因子などの共通の情報伝達物質と受容体を介し双方向的なネットワーク、すなわち腸脳相関（Gut-brain axis）を形成していることが知られていたが、最近の研究で、腸脳相関の腸管側刺激因子として腸内常在菌が注目され、腸脳相関に腸内常在菌を加えたIntestinal microbiota-Gut-Brain axisが提唱されている。しかしながら、腸内常在菌の存在による脳内代謝産物の変動は、特定の神経伝達物質やその関連分子に関する報告が僅かにある程度で殆ど解明されていない。本研究では、大脳組織をメタボロミクス解析することで、腸内常在菌が脳の代謝に与える影響を調べることを目的とした。
【方法】同腹の雄性マウスを無菌マウス（GF）と通常菌叢を定着させたマウス（Ex-GF）の2群に分けて飼育し（n = 3）、7週齢で麻酔下にて採血後、頸椎脱臼にて屠殺し、直ちに大脳を摘出、前頭葉部の大脳皮質を切り取り液体窒素で保存した。試料はメタノール中でビーズ式細胞破砕装置を用いて破砕し、クロロホルムとMilli-Q 混合液で抽出し水相を限外ろ過（5 kDa）した。ろ液は乾固させ、Milli-Q 水に溶解して、分子量1,000以下をターゲットとしたキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計（CE-TOFMS）にてメタボローム解析した。
【結果】大脳皮質から196（カチオン 120, アニオン 76）の代謝産物が検出された。GFの方がEx-GFより濃度が高かった成分（$p < 0.05$あるいは平均値で1.5倍以上）は23成分検出された。この中には、行動と関連深い神経伝達物質ドーパミン、統合失調症との関連性が示されているSer、多発硬化症やアルツハイマーのマーカーである*N*-Acetylaspartic acidが含まれていた。更に解糖系代謝産物（Glucose 6-phosphate, Fructose 6-phosphate, Fructose 1,6-diphosphate）や補酵素NADHやNADP+とエネルギー代謝に関連する成分も含まれており、大脳のエネルギー利用にも腸内常在菌が影響を与える可能性が示唆された。反対に、GFの方がEx-GFより濃度が低かった成分は15成分検出され、この中には、神経伝達物質の前駆物質である芳香族アミノ酸（Trp, Tyr, Phe）やてんかんとの関連性が示唆されているPipecolic acidなどが含まれていた。以上の結果は、Intestinal microbiota-Gut-Brain axisにより大脳の代謝系が大きな影響を受けていることを示している。中でも神経伝達物質やその前駆物質およびエネルギー代謝系への影響は、動物の行動や脳神経系の疾病に対する腸内常在菌の影響を研究する上で重要な知見となる。

本研究は、生研センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業の補助で行ったものである。

Intestinal microbiota, Brain, Metabolome

講演番号：3C20p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎20会場

*pdhR*欠失変異が大腸菌の糖代謝に与える影響

Effects of *pdhR* deletion on glucose metabolism in *Escherichia coli*

○前田 壮矢，紀平 知枝，清水 久美子，吹谷 智，和田 大，横田 篤（北大院農・応生科）
○Soya Maeda, Chie Kihira, Kumiko Shimizu, Satoru Fukiya, Masaru Wada, Atsushi Yokota (Hokkaido Univ.)

【目的】当研究室では中枢代謝の増強による発酵生産の効率化を目指している．Pyruvate dehydrogenase complex（PDH）をコードする*pdh*オペロンの転写調節因子PdhRは，菌体内ピルビン酸濃度に応答して負の転写調節を行う．近年，PdhRは*pdh*オペロンだけでなく，呼吸鎖酵素であるNADH dehydrogenase IIおよびcytochrome bo_3 oxidase の遺伝子群の転写抑制因子としても働くことが明らかとなった．*pdhR*欠失株（Δ*pdhR*株）では，PDH活性上昇に伴うピルビン酸変換反応の活性化や呼吸鎖酵素の活性上昇に伴うNADH再酸化の増強が起こるものと期待される．また，PDHやTCA回路の初発反応を担うcitrate synthaseはNADHによって阻害されるため，中枢代謝の増強においてNADHの再酸化を亢進することは重要である．そこで本研究では，W1485（野生株）およびΔ*pdhR*株を用いて，特に溶存酸素充足度の影響に着目して培養特性を解析し，さらにいくつかの酵素活性についても測定した．

【方法・結果】野生株とΔ*pdhR*株について，炭素源として50 g/Lのグルコースを含む無機塩培地を用いたバッチ培養を行った．培養中の溶存酸素濃度（DO）を一定に保った条件（DO-STAT条件，DO>2 ppm），もしくはDO-STAT非適用条件の二条件で培養を行った．その結果，DO-STAT条件では両株とも速やかな糖消費と良好な生育を示した．一方，DO-STAT非適用条件（対数期後期以降に溶存酸素が枯渇）で培養を行った場合，野生株ではDO-STAT条件に比べて，生育および糖消費が大幅に低下したが，Δ*pdhR*株ではこれらが野生株よりも高く保たれる傾向にあった．また，野生株では溶存酸素の枯渇に伴ってピルビン酸や酢酸といった有機酸類が顕著に生成されたが，Δ*pdhR*株ではその生成量が大幅に減少した．これらの結果から，Δ*pdhR*株は溶存酸素枯渇の影響を受けにくくなっていることが示唆された．また，有機酸の生成に関して，親株では解糖系からのオーバーフローによってピルビン酸や酢酸が生成したと考えられるが，Δ*pdhR*株ではPDHによるピルビン酸変換反応や呼吸鎖におけるNADHの再酸化が亢進されたことで，これらの有機酸が生成されにくいと予想された．これを検証するために，DO-STAT適用条件および非適用条件を用いた培養の対数期後期で菌体を採取し，その細胞抽出液を関連酵素の活性測定に供した．その結果，Δ*pdhR*株ではPDHやNADH dehydrogenase IIの活性が野生株に比べて4～5倍程度に上昇していることが明らかとなり，*pdhR*欠失変異の影響として予想された通り，PDH反応や呼吸鎖によるNADHの再酸化の亢進が達成されたと示唆された．現在，中枢代謝や呼吸鎖に関連する他の酵素に関して，さらなる解析を進めている．

PdhR, *Escherichia coli*, NADH reoxidation

講演番号：3C20p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎20会場

NADH dehydrogenase II過剰発現による大腸菌の糖代謝特性の変動

Alterations of glucose metabolism in *Escherichia coli* by over expression of NADH dehydrogense II

○紀平知枝，林　由香里，吹谷　智，和田　大，横田　篤（北大院農・応生科）
○Chie Kihira, Yukari Hayashi, Satoru Fukiya, Masaru Wada, Atsushi Yokota. (Hokkaido Univ.)

【目的】当研究室では中枢代謝の増強による発酵生産の効率化を目指し，細胞内エネルギーレベルが糖代謝に与える影響を検討している．細胞内ATP生産の大部分を担うF_1F_o-ATPaseは呼吸鎖の形成するプロトン駆動力を駆動源とする．呼吸鎖成分のうちプロトン駆動力形成能の高いNADH dehydrogenase I (NDH-1)あるいはcytochrome bo_3 oxidaseの単独または両欠損によるATP形成効率の低下が大腸菌の糖代謝に与える影響を調べたところ，プロトン駆動力形成効率が低い株ほど比増殖速度が低下したが，菌体あたりの糖消費速度に増大が見られた．しかしいずれの欠損株も最大生育量の低下がみられ，ピルビン酸および酢酸などの蓄積が見られた．また，これらが原因となりバッチ当たりの糖消費時間が野生株に比べて遅延した．これは菌体当たりの糖消費速度の増大に比べて呼吸活性の増加率が低いためNADHが過剰になり起こると推測された．そこで本研究では，プロトン駆動力形成能を持たないNADH dehydrogenase II (NDH-2) の過剰発現によるNADH再酸化能力の補強が野生株および呼吸鎖欠損株の糖代謝に与える影響を生理学的解析により明らかにすることを目的とした．

【方法・結果】NDH-2をコードする遺伝子*ndh*のプロモーターを含む領域をpBR322プラスミドにクローニングし，野生株および各呼吸鎖欠損株に導入した．各株を50 g/Lグルコースを含む無機塩発酵培地を用いたDO-STAT条件でバッチ培養を行った．その結果，過剰発現株で呼吸活性，菌体当たり糖消費速度，および最大生育量に増大が見られた．特にNDH-1欠損株および二重欠損株ではNDH-2過剰発現により最大生育量が野生株並みに回復し，バッチ当たりの糖消費時間が大幅に短縮した．さらにNDH-2過剰発現により呼吸鎖欠損株においてピルビン酸および酢酸の生成量が顕著に低下し，副生成物がほとんど生じなくなった．これは解糖系フラックスとNADHの再酸化の不均衡が解消されたためと予想される．しかし，NDH-1欠損株では，NDH-2を過剰発現した株では菌体当たり糖消費速度の増大と比較して呼吸活性の増大比率が低いにも関わらず代謝系のオーバーフローによる副生成物の生成が見られなかった．このような代謝変動が起こった理由を調査するため，現在酵素活性測定により中枢代謝系酵素および呼吸鎖酵素の活性変動について検討を行っている．

NADH dehydrogenase II, respiratory chain, *Escherichia coli*

講演番号：3C20p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎20会場

Corynebacterium glutamicum I2L における高温で誘導されるグルタミン酸生産のメカニズム

Mechanism on high-temperature L-glutamic acid fermentation in *Corynebacterium glutamicum* I2L

○丸山拓真、中野由希子、Nawarat Nantapong[1)]、 Savitr Trakulualeamsai[2)]、松谷峰之介、薬師寿治、松下一信（山口大・農、[1] Suranaree University of Technology、[2] Kasetsart University）

Takuma Maruyama, Yukiko Nakano, Nawarat Nantapong[1)], Savitr Trakulualeamsai[2)] Minenosuke Matsutani, Toshiharu Yakushi, and Kazunobu Matsushita (Dept. Biol. Chemi., Fac. Agriculture, Yamaguchi University, [1]Suranaree University of Technology, [2]Kasetsart University)

【目的】タイで単離された *Corynebacterium glutamicum* I2L は高温でのグルタミン酸生産が可能である。高温でのグルタミン酸生産株は発酵熱による発酵槽内の温度上昇の抑制に必要な冷却コストの低減が期待される。本研究では *C. glutamicum* I2L 株の高温でのグルタミン酸生産を可能にするメカニズムを検討した。

【方法】I2L 株を、温度条件を変えて培養し、それらの細胞内外のグルタミン酸量を比較した。また、ドラフト・ゲノム解析に基づいて、グルタミン酸生産において重要な役割を持つことが知られている Mechano-sensitive channel (Msc) のホモログ遺伝子を探索し、さらにその発現解析を行った。

【結果】I2L 株は 30℃の非生産温度条件下で細胞内にグルタミン酸を蓄積し、高温（37℃）の生産条件になると蓄積したグルタミン酸を排出することが分かった。そこで、温度によってグルタミン酸排出チャネルの機能もしくは発現に影響があると考え、ゲノム解析を行った。その結果、I2L 株ゲノムに２つの Msc ホモログが見つかり、Msc1、Msc2 と名付けた。RT-PCR によって、それらの発現を調べたところ、Msc2 が生産、非生産条件に関わらず発現しているのに対し、Msc1 はいずれの条件でも発現していないことが見出された。発現に温度による影響が見られないことから、温度が細胞膜の構造に影響を与えることを予測し、ビオチン濃度をより減少させて 30℃で培養したところグルタミン酸を排出することが分かった。ビオチンは膜の合成に関与することが知られていることから、高温が細胞膜を介して Msc に影響を与え、グルタミン酸生産を誘導していることが推測された。

文献

1)中野由希子ら：2010 年度　農化大会 3App08

2) Nakamura. J et al. Appl. Environ. Microbiol. 73:4491-4498. (2007)

講演番号：3C20p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ C校舎20会場

*Corynebacterium glutamicum*のピルビン酸キナーゼ欠失およびクエン酸シンターゼ変異がアミノ酸生産に与える影響

Effects of pyruvate kinase gene deletion and citrate synthase defect on amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*

○澤田 和典、下野 雄太、小倉 紘太郎、和田 大、横田 篤（北大院農・応生科）
○Kazunori Sawada, Yuta Shimono, Kotaro Ogura, Masaru Wada, Atsushi Yokota (Hokkaido Univ.)

【目的】ピルビン酸キナーゼ (PYK) はホスホエノールピルビン酸 (PEP) からピルビン酸への変換を触媒し、アロステリック調節を受ける解糖系の鍵酵素である。またクエン酸シンターゼ (CS) はTCAサイクルの初発反応であるアセチルCoAとオキサロ酢酸の重合反応を触媒し、クエン酸を生成する。過去の研究において、PYK活性欠損、 PEPカルボキシラーゼフィードバック阻害解除, CS活性低下の3種類の変異を持つ株でアスパラギン酸の生成量向上が報告された。しかしこの株はランダム変異導入によって得られたため、これら以外の変異が入っている可能性は否定できず、アスパラギン酸の生成量向上がこれらの酵素活性の変化のみに由来するかどうかについては明らかではない。これまでの研究で、グルタミン酸発酵条件下で培養した際の、PYK欠失株が示すアミノ酸生産については明らかにされた[1)]。そこで本研究ではPYK・CS二重変異株を用い、これらの変異がアミノ酸生産にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。
【方法】*C. glutamicum* ATCC 13032 PYK欠失株にCS活性を低下させる変異を二重相同組換え法によって導入した。得られた株をビオチン量を制限したグルタミン酸発酵条件下で2Lジャーファーメンターを用いて培養し、その発酵特性について解析を行った。
【結果】PYK欠失株は野生株の約1.3倍にあたる32 g/Lのグルタミン酸生産量を示すが、PYK・CS二重変異株では、グルタミン酸生産量は1 g/L以下に減少した。アスパラギン酸の生産量については野生株が0.5 g/L程度の生産量であるのに対し、PYK欠失株では約2 g/L、PYK・CS二重変異株では約4 g/Lとなった。グルタミン酸生産量の減少はCS活性の低下によりTCAサイクルの流量が減少したためと考えられ、それによって起こるオキサロ酢酸の蓄積がアスパラギン酸生産量の増大につながったと考えられた。

1) Sawada, K., et. al., *Metabolic Engineering*, **12**, 401-407 (2010).

Corynebacterium glutamicum, amino acid production, central metabolism

講演番号：3C20p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ C校舎20会場

*Corynebacterium glutamicum*のピルビン酸キナーゼ欠失およびアナプレロティック経路変異がアミノ酸生産に与える影響

Effects of pyruvate kinase gene deletion and anaplerotic pathway gene mutation on amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*

○下野 雄太、澤田 和典、和田 大、横田 篤（北大院農・応生科）
○Yuta Shimono, Kazunori Sawada, Masaru Wada, Atsushi Yokota（Hokkaido Univ.）

【目的】ピルビン酸キナーゼ（PYK）は、ホスホエノールピルビン酸（PEP）からピルビン酸への変換を触媒する解糖系の鍵酵素である。これまでの研究で、PYK欠失株では過剰なPEPの蓄積を避けるためにアナプレロティック経路の酵素活性を変化させ、PEPからオキサロ酢酸生成方向へと代謝を傾かせることを報告した。この結果、グルタミン酸およびアスパラギン酸生産量は増大した[1)]。一方で、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPCx）は、PEPからオキサロ酢酸へのアナプレロティック反応を触媒している。またその活性は、アスパラギン酸およびα-ケトグルタル酸によってフィードバック阻害を受けることが知られている。この様な阻害様式から、PEPCxはTCA回路中間体に由来するアミノ酸の生合成経路へ向かうカーボンフローを調節する重要な酵素であると考えられてきた。そこで本研究では、PEPCxのアスパラギン酸によるフィードバック阻害の解除が、アミノ酸生産に与える影響を解析した。また、PYK欠失とPEPCx変異とを組み合わせ、二重変異の影響についても解析した。
【方法】*C. glutamicum* ATCC 13032およびPYK欠失株に、PEPCxのフィードバック阻害を解除する変異を二重相同組換え法によって導入した。得られた株を、ビオチン量を制限したグルタミン酸発酵条件下で2Lジャーファーメンターを用いて培養し、その発酵特性について解析を行った。また、各株の細胞抽出液をアナプレロティック経路およびTCAサイクル関連酵素の活性測定に供した。
【結果】PEPCx変異株および二重変異株において、それぞれの親株よりも最大生育量の減少が見られた。しかし、糖消費速度（OD_{660}当たり）に有意な差はみられなかった。一方でグルタミン酸およびアスパラギン酸濃度は、両株において有意な上昇が認められた。以上の表現型および酵素活性測定の結果から、PEPCxのアスパラギン酸によるフィードバック阻害の解除は、PYK欠失と同様に、PEPの代謝をオキサロ酢酸生成方向に傾かせることが示唆された。また、二重変異株では更なるグルタミン酸生産量の増大が観察されたことから、2つの変異には相乗効果があり、グルタミン酸生産においてはオキサロ酢酸の供給量が重要な因子であることが改めて示唆された。

1）Sawada, K., et al., *Metabolic Engineering*, **12**, 401-407（2010）

Corynebacterium glutamicum, phosphoenolpyruvate carboxylase, feedback inhibition

講演番号：3C20p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ C校舎20会場

時系列データに基づくラクトコッカス属の解糖経路予測

Prediction of glycolysis pathway of *Lactococcus lactis* using time-series data

○シユタサ　カンスポーン[1,2]、白石文秀[3]、平井優美[1,2,*]（[1]理研 PSC、[2]JST CREST、[3]九大・院農）
○Kansuporn Sriyudthsak[1,2], Fumihide Shiraishi[3], Masami Yokota Hirai[1,2,*] ([1]RIKEN PSC, [2]JST CREST, [3]Kyudai)

【目的】Clarification of a large-scale metabolic reaction network and understanding of metabolite correlations are still one of the most challenging tasks in the metabolomics and systems biology. A number of time-series metabolic concentrations have been acquired by high-throughput analytical instruments. Multivariate data analysis such as principal components analysis has been widely used to analyse metabolomics data resulting in identification of metabolic correlations. However, some of the actual metabolic reaction networks of correlated metabolites are still unclear. Therefore, to determine a network structure including inhibition and activation on metabolic fluxes, the present work proposes a new algorithm to predict a metabolic reaction network structure using time-courses of metabolite concentrations.
【方法】Firstly, time-series data of metabolites in glycolysis pathway of *Lactococcus lactic* MG1363 were properly fitted using locally estimated scatterplot smoothing (LOESS). Fitted data was used for prediction of metabolic reaction network. Secondly, bivariate Granger causality test was used to indicate the casual relationships between metabolites and unrelated metabolites were removed out. Thirdly, differential equations were set up in terms of S-system in the framework of Biochemical Systems Theory (BST). Levenberg-Marquardt algorithm (LMA), nonlinear regression which interpolates between the Gauss-Newton algorithm and the method of gradient descent, was exploited to further reduce less important parameters. Finally, the metabolic reaction network was assembled underlying on remained parameters.
【結果】Our results indicate the pathway starts from glucose to produce glucose-6-phosphate (G6P), fructose-1,6-bisphosphate (FBP), and products including acetate and lactate, respectively. Moreover, we found that G6P also have an effect on lactate and acetate which may be considered as pentose phosphate pathway. Interestingly, our approach can also point out inhibition of lactate on this pathway. Our assembled network well agreed with the glycolysis pathway widely known. This means that our new algorithm successfully determined the network structure as well as pointed out possible pathways including its inhibition and activation.

Metabolic network, Time-series data, Glycolysis pathway

講演番号：3C20p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ C校舎20会場

鉄還元菌*Shewanella*における代謝活性の電気化学的制御

Electrochemical regulation of metabolism activity of iron reducing bacteria *Shewanella*

○松田　翔一[1]、劉　歓[2]、中西　周次[2]、橋本　和仁[1,2]（[1]東大院工、[2]ERATO/JST）

○Shoichi Matsuda[1], Huan Liu[2], Shuji Nakanishi[2], Kazuhito Hashimoto[1,2] ([1]Univ. Tokyo, [2] ERATO/JST)

【目的】鉄還元菌*Shewanella*は、その細胞膜外膜シトクロムを介した細胞外電子伝達により、固体状態の金属酸化物を呼吸の最終電子受容体として利用することができる。ここで、金属酸化物の代わりに、電位が適切に制御された電極を電子受容体として用いると、代謝電子は電気化学回路を流れ、呼吸活性を電流として電気化学的に検出することが可能となる。また、電極電位の操作を介することで電子受容体のエネルギーレベルを自在に制御することが可能となる。今回、我々は、*Shewanella*の代謝活性が設定する電極電位に依存することを見出したので報告する。

【方法】電気化学測定には通常の三電極方式を採用し、作用極（兼、電子受容体）としてはITO基板、参照極としてはAg|AgClを使用した。電子・炭素源としては乳酸を用い、実験はすべて嫌気条件下で行った。

【結果】

電極電位を–0.2Vおよび0.2Vに設定し、微生物代謝電流の時間変化を検討したところ、–0.2Vにおいて0.2Vよりも高い電流値が観測された。0.2Vの場合の方が、外膜シトクロムから電極への電子移動反応が起こりやすいことから高い電流値が期待されたが、実際にはこの予想に反する結果が得られた。この電極電位の応じた電流値の由来を調べることを目的として、TCA回路の反応阻害剤であるマロン酸を適切な濃度で添加した際の電流値変化を調べた。(Fig.1) –0.2Vの場合には、マロン酸添加によって電流値が大きく減少したのに対し、0.2Vの場合には、マロン酸添加によって電流値の変化は観測されなかった。このことから、–0.2Vの場合に観測された高い電流値は、TCA回路が関与した代謝活性の違いに起因するものであると考えられる。また、電極電位依存性をより詳細に検討したところ、この代謝活性の変化が外膜シトクロムの酸化還元電位を境に起こっていることが明らかとなった。以上の結果から、今回明らかとなった電極電位に依存した代謝活性の変化は、外膜シトクロムを介した電極電位操作によって誘起される、TCA回路の活性変化に起因するものであると推測される。

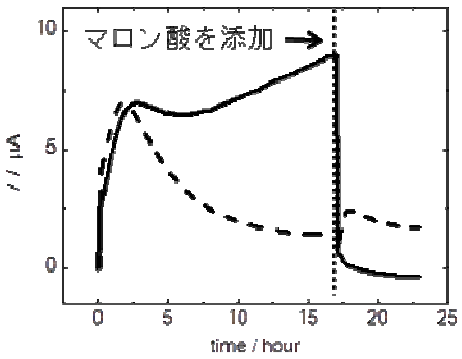


Fig.1　–0.20V（実線）, +0.20V（破線）における呼吸代謝電流に対するマロン酸添加

Cytochrome, Electrochemistry, TCA cycle

講演番号:3C21a01
講演日時、会場:3月24日09:00～ C校舎21会場

枯草菌におけるゲノムワイドな転写開始点解析

Genome-wide analysis of transcription start sites in *Bacillus subtilis*

○松本 貴嗣[1]、吉川 博文[1,2]（[1]東京農大ゲノムセ、[2]東京農大応生科・バイオ）

○Takashi Matsumoto[1], Hirofumi Yoshikawa[1,2]（[1]NGRC, Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.）

高速に大量の塩基配列データを取得することが可能な次世代シーケンサーはゲノムシーケンスだけでなく、遺伝子発現解析（RNA-seq）やクロマチン免疫沈降サンプルの解析（ChIP-seq）など、従来はマイクロアレイが担っていた用途にも利用されている。

枯草菌を材料にイルミナ社のGenome Analyzer IIを用いて培養温度37℃と49℃の2条件でRNA-seqを行い、熱ショック応答を示す遺伝子群を抽出した。各遺伝子がどのような制御を受けているのか理解する上で転写開始点（TSS）が重要な情報となるが、RNA-seqのデータからTSSを正確に決定することは困難であった。インタクトなRNAの5’末端がトリリン酸であるのに対し、プロセシングや分解を受けたRNAではモノリン酸になっている。特異的な酵素活性を持つヌクレアーゼにより5’末端がモノリン酸のRNAを分解し、トリリン酸を持つRNAにのみ合成オリゴを付加することでTSS-seqライブラリーを作製した。

枯草菌ゲノムには4,422の遺伝子が存在し、578の転写単位に対する930のTSSがデータベースに登録されている。本研究で実施したゲノムワイドな解析によって、1,500あまりの新規TSSを決定することができた。

本研究は文部科学省「戦略的研究基盤形成支援事業」の一環として実施したものである。

Bacillus subtilis, next generation sequencer, TSS-seq

講演番号：3C21a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ C校舎21会場

ゲノムデザイン学：人工解糖系オペロンの転写・翻訳解析

Genome designing Biology: Analysis of artificial glycolysis operons at transcription and translation levels

○柘植 謙爾[1]、中東 憲治[1]、富樫　貴[1]、長谷部　雅子[1]、高井　幸[1]、長谷川　美紀[1]、五十嵐 康行[1]、杉山　直幸[1]、石濱 泰[1,2]、冨田 勝[1,3]、板谷 光泰[1,3]（[1]慶應大・先端生命研、[2]京大・薬科学、[3]慶應大・環境情報）

○Kenji Tsuge[1], Kenji Nakahigashi[1], Takashi Togashi[1], Masako Hasebe[1], Yuki Takai[1], Miki Hasegawa[1], Yasuyuki Igarashi[1], Naoyuki Sugiyama[1], Yasushi Ishihama[1,2], Masaru Tomita[1,3], and Mitsuhiro Itaya[1,3] ([1] Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]Pharma. Sci., Kyoto Univ., [3]Env. Info., Keio Univ.)

【目的】ゲノムを一から設計（デザイン）することで所望の機能を有する微生物を構築することは、マイコプラズマゲノムを化学合成DNAから組み立てられることが示されて以降、いよいよ現実味を帯びてきたように感じられる。しかしながら一方で、ゲノムをどのようにデザインすれば目的の機能が発現するかという、ゲノムデザインの法則（ルール）については全く示されていない。代謝経路を例にとると、多数の酵素によって成り立っており、その制御には、各酵素の転写レベル、翻訳レベル、機能レベル、分解レベルと様々なレベルで行われていることが知られている。このうち機能レベル（即ちアロステリック制御）を除けば、代謝経路の制御は、各酵素の細胞内濃度を制御すること、即ちその酵素をコードする遺伝子の発現量を制御することにより行われている。よって代謝経路をデザインするためには、単純に必要な酵素をコードする遺伝子を取り揃えるばかりでなく、それらの遺伝子群の発現量の総括的に制御をするための何か巧妙なメカニズムが必要だと考えられる。我々は、バクテリアゲノムに良く見出されるポリシストロニックなオペロン構造に代謝経路遺伝子群の発現量を制御するメカニズムがあると考え、この解明を目的として、人工解糖系オペロンを持つ大腸菌を構築し、転写・翻訳レベルでの解析を行った。
【方法】枯草菌を用いた遺伝子集積法のOGAB法により、大腸菌ゲノム中に分散して存在する解糖系遺伝子１０個をBAC由来のプラスミドベクターに、ラムダファージ由来のPrプロモーターを先頭にポリシストロニックに連結した。ここで遺伝子連結順序を様々に変えることで、多種類の人工解糖系オペロンプラスミド構築し、解糖系の全遺伝子をゲノム上から削除した宿主大腸菌に導入した。得られた株について、増殖速度、ChIP解析、転写量、翻訳量の解析を行った。
【結果】人工オペロン中の遺伝子の連結順序は、宿主の増殖速度に大きな影響を与え、オペロン内の遺伝子は、連結順序により発現量（転写量・翻訳量）が変化している可能性が考えられた。そこで、特徴的な連結順序をもつ５種類のオペロンを選び、各遺伝子の転写量と翻訳量について定量した。その結果、転写量は、プロモーターから単調減少の傾向を示した。一方翻訳量は、ほぼ転写量に比例していたが、その傾向は遺伝子の種類により大きく異なっていた。これらの結果を踏まえて、オペロンにおける転写・翻訳レベルでの調節について考察したい。

operon, gene assembly, glycolysis

講演番号：3C21a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎21会場

好気性光合成細菌*Roseobacter denitrificans* OCh114の光合成遺伝子制御因子の機能解析

Functional analysis of regulator for photosynthetic genes in *Roseobacter denitrificans* OCh114

○青山 晴菜、木村 真人、石井 正治、五十嵐 泰夫、新井 博之（東大院農生科・応生工）
○Haruna Aoyama, Makoto Kimura, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi, Hiroyuki Arai (The University of Tokyo)

【目的】一般的な紅色光合成細菌は、嫌気条件下で酸素非発生型の光合成を行い、その光合成関連遺伝子は低酸素分圧または嫌気条件でのみ発現し、酸素により抑制される。しかし、紅色光合成細菌の中には光合成関連遺伝子を高酸素分圧下でも発現させる好気性酸素非発生型光合成細菌が存在する。近年、好気性光合成細菌は海洋表層の優占種として、海洋中の物質循環に寄与していることが明らかとなってきた。我々は、好気性光合成細菌の環境優占化にはそのエネルギー代謝が重要な役割を果たしていると考えており、モデル生物の一つである *Roseobacter denitrificans* OCh114 を用いて、その光合成制御機構の解明を行っている。本研究では、好気性光合成細菌の光合成制御機構の解明のため、OCh114 における光合成遺伝子発現制御に関わる因子の同定及び機能解析を行った。
【結果】OCh114のゲノム上には、近縁種の嫌気性光合成細菌である*Rhodobacter sphaeroides* において、主要な光合成遺伝子発現抑制因子であるPpsRのホモログをコードする*ppsR* 遺伝子が存在していた。また、好気性光合成細菌に特徴的な制御因子を探索したところ、他の好気性光合成細菌のゲノム中にも比較的良く保存されている、Light, Oxygen, Voltage (LOV) -domainを持つhistidine kinase（LOV-HK）をコードする遺伝子が存在した。そこで、これらの遺伝子破壊株（⊿*ppsR*、⊿LOV-HK）を作製し、光合成色素定量及びトランスクリプトーム解析から両遺伝子についての機能解析を行った。その結果、⊿*ppsR* において光合成色素の過剰生産及び光合成関連遺伝子の発現量の増加が起こっており、OCh114においてもPpsR が光合成遺伝子の発現抑制に関与していることが明らかとなった。また、⊿LOV-HK において光合成色素量の低下及び光合成関連遺伝子の発現量の減少が起こっており、OCh114における光合成遺伝子の発現制御にLOV-HK が重要な役割を果たしていることが示唆された。以上より、OCh114の光合成遺伝子発現において、抑制機構は嫌気性光合成細菌と同様にPpsR が制御因子として機能する一方、促進機構は嫌気性光合成細菌と異なる独自の機構をもつ可能性が示唆された。

Roseobacter denitrificans, photosynthesis, regulation

講演番号：3C21a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎21会場

*Vibrio parahaemolyticus*のキチンオリゴ糖デアセチラーゼ遺伝子発現解析

Gene expression profiling of chitin oligosaccharide d eacetylase from *Vibrio parahaemolyticus*

○小笠原 講平[1]、池上 孝紀[1]、神田 裕士[1]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化）

○ Kouhei Ogasawara[1], Takanori Ikegami[1], Hiroshi Kanda[1], Takako Hirano[2], Wataru Hakamata[1,2], and T oshiyuki Nishio [1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept.Chem.and Life Sci., Bioresource Sciences,Nihon Univ.)

【目的】多くの海洋性細菌はキチンをGlcNAcやそのホモオリゴ糖に分解し栄養源にしている。その中で*Vibrio*属細菌は、多くがキチナーゼを分泌しキチンから$(GlcNAc)_2$を生産することが知られている。当研究室で単離・同定した*Vibrio parahaemolyticus* KN1699は、さらにキチンオリゴ糖デアセチラーゼ（COD）を分泌して、キチンからヘテロ2糖(GlcNAc-GlcN)を生産している。これまでに我々は、GlcNAc-GlcNがKN1699株のようなCOD生産性細菌にとって特異的なキチン分解酵素の誘導因子や遊走性因子であることを解明した。このようにCODは一部の細菌にとってのシグナルを生産するために必須の酵素であるが、その発現メカニズムについては分かっていない。そこで、本研究では*Vibrio parahaemolyticus*におけるCODの遺伝子発現制御機構を明らかにする事を目的とした。

【方法と結果】KN1699株のCODの遺伝子周辺の構造を確認したところ、本酵素遺伝子の周辺にはプロモーター部位と推定される配列と、キチンオリゴ糖の取り込みと分解を担うと推定されるタンパク質の遺伝子(推定PTS)の配列、さらに*lac*I様遺伝子配列の存在が確認できた。従って、この遺伝子群はオペロンを形成し、*lac*I様遺伝子にコードされているリプレッサーがCODを含むこれらの遺伝子の発現に関与していると推測された。そこでこのリプレッサーがCODの遺伝子発現に関与しているかどうかを明らかにする為、CODの推定オペレーター部位と特異的に結合するか確かめることにした。まず、本リプレッサーのリコンビナント体を作成し、COD及びPTSの推定オペレーター部位を含むDNAフラグメントとの結合をそれぞれゲルシフトアッセイ法を用いて調べた。その結果、PTSの推定オペレーター部位のDNA配列では、リプレッサーとのDNA-タンパク質複合体の形成は確認できたが、CODの推定オペレーター部位では確認出来なかった。このことから、*lac*I様リプレッサーはCODの遺伝子発現調節には関与していないことが明らかになった。そこで、全ゲノム配列の解析が終了している同菌種のRIMD2210633株に実験対象を移行して、CODの推定オペレーター配列に特異的に結合するタンパク質を生体分子間相互作用解析装置（BIACORE X）を用いて探索することにした。本菌の細胞抽出液を作用させた結果、本オペレーター部位と特異的に結合するタンパク質を得た。これを回収しSDS-PAGEを行った結果、約70 kDaと約60 kDaの位置にタンパク質バンドを確認することができた。

chitin oligosaccharide deacetylase, *Vibrio parahaemolyticus*, gene expression

講演番号:3C21a05
講演日時、会場:3月24日09:44～ C校舎21会場

土壌細菌*Burkholderia multivorans* ATCC 17616株の鉄応答転写因子Furと過酸化水素応答転写因子OxyRの各種表現型への関与

Fur and OxyR are related to pleiotropic phenotypes in *Burkholderia multivorans* ATCC 17616

○木村　明音、湯原　悟志、大坪　嘉行、永田　裕二、津田　雅孝（東北大院・生命科）
○Akane Kimura, Satoshi Yuhara, Yoshiyuki Ohtsubo、Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku university)

【背景・目的】*B. multivorans* ATCC 17616株の鉄応答転写因子Furの遺伝子破壊株(Δ*fur* 株)は、多くの炭素源の資化能を失い、活性酸素種である過酸化水素(H_2O_2)やスーパーオキサイド(O_2^-)、活性窒素種である一酸化窒素(NO)、細胞内遊離鉄イオンにより活性化する抗生物質ストレプトニグリンに対し高感受性であり、抗酸化酵素であるSODやカタラーゼ活性が低下している。前回までにNO高感受性から復帰したΔ*fur* 株の自然サプレッサー突然変異株(SOF株)を取得し、タイリングアレイ解析によりSOF株の変異箇所が過酸化水素応答転写因子OxyRの遺伝子内であることを同定した。またΔ*fur* 株において*oxyR* 遺伝子を破壊すると、NO高感受性だけでなく活性酸素種やストレプトニグリンに対する高感受性や炭素源資化能の低下といった、Δ*fur* 株の各種表現型の多くが回復することを報告した。今回*oxyR* の変異によって多種表現型が回復する機構を明らかにすることで、ATCC 17616株のFurおよびOxyRについて更なる知見を得ることを目的に解析を行った。
【方法・結果】野生株、Δ*fur* 株、SOF株、Δ*fur* Δ*oxyR* 株、Δ*oxyR* 株の細胞内タンパク質の発現パターンをSDS-PAGEにより比較した結果、SOF株、Δ*fur* Δ*oxyR* 株、Δ*oxyR* 株で過剰発現しているタンパク質が存在した。これらのタンパク質を同定したところ、活性酸素種・窒素種除去能を有することが考えられる酵素KatG、AhpCおよびAhpDであることが明らかになった。qRT-PCRによりこれら3つの酵素遺伝子は転写レベルで高発現していることが明らかとなった。OxyRにはこれら遺伝子の転写抑制能力があり、*oxyR* が破壊されることで転写抑制が解除されたことが推測された。また野生株において*katG* は過酸化水素添加により顕著に転写誘導され、Δ*fur* 株においてKatGを高発現させると過酸化水素感受性がΔ*fur* Δ*oxyR* 株なみに回復することが明らかとなった。このことからΔ*fur* 株の過酸化水素高感受性が*oxyR* に変異が導入されることで回復したのは、KatGの高発現によるものであることが示唆された。今後AhpCDや、他の関与すると推察される因子の高発現などが上記表現型へ与える影響について解析する必要がある。

Fur, OxyR, *Burkholderia*

講演番号:3C21a06
講演日時、会場:3月24日10:05～ C校舎21会場

枯草菌ファージφ29の複製に関わるRNA結合蛋白質gp1の欠損はRNaseHによって補償される
RNase H can compensate the absence of the RNA binding protein of Bacillus phage ϕ29, gp1, which is involved in ϕ29 DNA replication.

○竹内 有、刀禰高広、牧野 修（上智大・遺伝学）
○Ari Takeuchi, Takahiro Tone, Osamu Makino (Sophia Univ. Lab. of Genet.)

【目的】我々はφ29の効率的な複製に必須であるφ29の遺伝子1産物（gp1)が RNA結合性を持ち、φ29初期mRNAを細胞の極や隔壁領域に局在化させる事を明らかとしてきた。しかしgp1の複製における役割は定かでなかった。φ29の複製中間体は数kb～10 kbに渡るssDNA領域を持ち、その配列はφ29初期mRNA（～5 kb)と相補的である。これらのssDNAとmRNAがハイブリッドを形成した場合、複製が阻害されることが考えられる。そこでgp1はssDNA領域へのmRNAの結合を抑制している可能性を検証した。
【方法】φ29はgp1が欠損すると42℃で増殖できなくなる。この時DNA:RNAハイブリッドのRNA部分を分解する枯草菌の主要RNaseH遺伝子rnhC を過剰発現する事でφ29の増殖が回復しないか検討した。一方、φ29は30℃ではgp1がなくても増殖する。そこで逆に宿主内のRNaseH活性をなるべく低下させるために枯草菌のRNaseH遺伝子rnhCとrnhBを欠損させ、φ29が増殖できなくなるかを検討した。
【結果】42℃において枯草菌内で枯草菌rnhCをプラスミドベクターに乗せて過剰発現した結果、gp1の欠損により野生型の1%以下に阻害されていたφ29の増殖が10倍以上促進された。一方、30℃で枯草菌のrnhCとrnhBを欠損させた結果、30℃でgp1欠損時に見られたφ29のプラークサイズは著しく小さくなった。以上の結果はgp1の欠損がRNaseHの過剰発現によって補償される事を示唆し、gp1がmRNA:DNA複合体形成の抑制を通してφ29複製の阻害を防ぐという作業仮説を支持した。rnhCとrnhBに加え、同じくRNaseH 活性を持つpolA (DNA polymeraseI)を欠失させた場合についても解析を進めている。

RNA:DNA hybrid, DNA replication, bacteriophage

講演番号：3C21a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎21会場

生育条件の変化に応答したLpp-ペプチドグリカントランスペプチダーゼ遺伝子の発現調節
Regulatory expression of Lpp-peptidoglycan transpeptidase genes in response to changes in the growth conditions

○青木　将、福本　玲、徳田　元[1]、松山伸一　（立教大・理、[1]盛岡大・栄養科学）
○ Masaru Aoki, Rei Fukumoto, Hajime Tokuda, Shin-ichi Matsuyama (Rikkyodai, [1]Moriokadai)

【目的】大腸菌の主要外膜リポタンパク質 Lpp は、ペプチドグリカンと共有結合して細胞表層の構造維持に寄与している。その共有結合反応を触媒しているのがトランスペプチダーゼ（TPase）YbiS であり、さらにそのパラログとして YcfS と ErfK が存在している。これら３つの TPase の役割分担を明らかにするため、これまでに各々の遺伝子発現が培地の pH 変化にどのように応答するのかを調べてきた。その結果、YbiS は酸性・中性条件下で、YcfS はアルカリ条件下で、ErfK はバックアップとして、それぞれ機能する TPase であると考えられた。今回、*erfK* の遺伝子発現が増殖定常期に上昇することを見いだしたので報告する。
【方法・結果】TPase 遺伝子と *lacZ* との融合遺伝子を保持する大腸菌 MC4100（*Δ lacZ*）を種々の条件下で培養してβガラクトシダーゼ活性を測定した。定常期の MC4100 /*ybiS - lacZ* 株のβガラクトシダーゼ活性は対数増殖期に比べて低下したが、MC4100 /*erfK - lacZ* 株のβガラクトシダーゼ活性は定常期に上昇した。MC4100 /*ycfS - lacZ* 株では有意な差は見られなかった。*erfK* が定常期に特異的に発現する遺伝子であることを確認するために、定常期の転写を制御するシグマ因子 σ^{38} をコードする *rpoS* 遺伝子の欠失変異株（*Δ rpoS*）を構築して融合遺伝子のβガラクトシダーゼ活性を測定した。定常期の MC4100 /*ybiS - lacZ* 株のβガラクトシダーゼ活性は σ^{38} の有無によって影響を受けなかったが、MC4100 *Δ rpoS* /*erfK - lacZ* 株のβガラクトシダーゼ活性は著しく低下した。これらの結果から、ErfK は定常期で働く TPase であることが強く示唆された。定常期におけるペプチドグリカンのリサイクリングと関係しているのかもしれない。
　現在までの私たちの知見から、下記のように大腸菌は生育条件の変化に応答して３種の TPase を使い分けていると考えられる。
　①YbiS は主要な TPase として通常の環境下で機能している。
　②アルカリ条件下では活性が低下する YbiS に代わって YcfS が優勢に働く。事実、YcfS の TPase 活性はアルカリ条件下で上昇する。
　③σ^{38} が増加する定常期では YbiS の発現が低下するとともに ErfK の合成が誘導されて、生育停止状態の細胞表層の保守を担っている。

peptidoglycan, lipoprotein, transpeptidase

講演番号：3C21a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ C校舎21会場

枯草菌の緊縮制御による胞子形成誘導機構の解明

The elucidation of the spore formation induction mechanism by stringent control of *Bacillus subtilis*

○東條　繁郎、広岡　和丈、藤田　泰太郎（福山大・生命工）
○Shigeo Tojo, Kazutake Hirooka, Yasutaro Fujita (Fukuyamadai)

これまでに、枯草菌の緊縮制御機構には、2つの機構があることを明らかにした。一つは、緊縮制御によってGTP濃度の低下が引き起こされ、窒素代謝制御因子CodYの不活化が起こり、CodYの制御が外れる機構と、もう一つは、転写開始点の塩基種とATP濃度の上昇とGTP濃度の減少に依存した転写制御である。後者のヌクレオチド濃度依存型の制御機構は、転写開始点近傍(+1,+2)の塩基種にAが有りGが無ければ転写の活性化、Aが無くGが有れば不活性化する。

枯草菌のデコイニン(GMP合成阻害剤)添加での緊縮制御による胞子形成誘導は古くから分かっていたが、その誘導機構については解析されていない。この緊縮制御条件でのDNAマイクロアレイ解析の結果からSigH依存の遺伝子群として（*kinA*, *spo0A*, *spo0F*等）の誘導が示唆された。そこで、特にリン酸リレー系の *kinA* の発現量に依存して胞子形成が誘導されるという報告があったので、*kinA*に注目して解析を開始した。

まず、*kinA* のLacZレポーター解析を行い、デコイニン添加での緊縮制御による *kinA* 誘導の確認と転写開始点A(+1)をGに変換して誘導能の変化を検証した。その結果、この緊縮制御による誘導は+1G変異によって起こらなくなった。さらに、SigH破壊株を用いた場合、この緊縮制御による誘導が起こらないことから、SigHがデコイニン添加での緊縮制御により *kinA* の誘導を引き起こすこと。また、このSigHによる誘導が、転写開始点の塩基種の影響を受けていることが分かった。次に、*kinA* のゲノム上の転写開始点のAをGに変換した *kinA* A+1G株を作成し、*kinB* や *codY* 破壊株と組み合わせて緊縮制御での胞子形成能を検証した。その結果、*kinA* の転写開始点であるAが胞子形成に重要であることが分かり、CodYについては、緊縮制御での胞子形成には関与していないことが分かった。さらに、このデコイニン添加による胞子形成ではSigA依存の *kinB* の欠失も *kinA* 欠失とほぼ同様に胞子形成率が低下したことからこの緊縮制御による胞子形成では *kinB* も重要な機能を持つと考え、*kinB* の転写開始点AをGに変換した *kinB* A+1G株を作成し、解析を行った。その結果 *kinB* A+1G株は *kinA* A+1G株とほぼ同様の結果を示した。さらに、*kinA*、*kinB* 両破壊株では、まったく胞子形成が起こらなかった。

以上の結果より、デコイニン添加による緊縮制御での胞子形成の誘導の引き金は、生体内のATP濃度の上昇による *kinA* と *kinB* の転写の活性化であることが示唆された。

Sporulation, Stringent control, B. subtilis,

講演番号：3C21a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎21会場

枯草菌において銅イオンに応答するYcnKおよびCsoR制御因子による*ycnKJI*オペロンおよび*ycnL*遺伝子の発現制御機構の解析

Regulation mechanism of *ycnKJI* operon and *ycnL* gene by two copper-responsive transcriptional regulators, YcnK and CsoR, in *Bacillus subtilis*

広岡 和丈、○枝廣 貴成、木村 晃輔、藤田 泰太郎（福山大生命工・生物工）
Kazutake Hirooka, ○Takayoshi Edahiro, Kosuke Kimura, Yasutaro Fujita (Fukuyama Univ.)

【目的】銅イオンは各種酵素の活性部位に利用される必須元素であるが、高濃度では細胞に有害作用を及ぼすので、細胞内銅イオンのホメオスタシスは極めて重要な機能である。枯草菌では、CsoR 制御因子が *copZA* オペロンを制御しており、銅イオン過剰条件でオペロンを脱抑制し、銅イオンを排出する CopZA タンパク質が生産される。一方、銅イオン飢餓条件では銅イオン取り込みに関わる YcnJ の発現が誘導され、その制御には YcnK 制御因子が関与することが知られている。また、YcnJ 発現には CsoR も関与することが示唆されている [1)]。本研究では、YcnK と CsoR による *ycnJ* を含めた近傍遺伝子群の発現制御機構の解析を行った。
【実験および結果】ノザンブロット解析によって、*ycnK*、*ycnJ*、*ycnI* の遺伝子群がオペロンを構成し、*ycnK* 上流に近接して逆向きで存在する *ycnL* は単独で転写されることが示された。また、プライマーエクステンション解析によって *ycnKJI* および *ycnL* の転写開始点を決定した。次に、YcnK と CsoR の組換えタンパク質と *ycnKJI* および *ycnL* の制御領域をプローブに用いてゲルシフト解析および DNaseI フットプリント解析を行い、両プロモーター近傍の 16 bp のダイレクトリピート配列を YcnK が認識して結合するが、CsoR はプローブ領域には直接結合しないことを明らかにした。また、銅イオン特異的キレート剤である bathocuproine disulfonate の存在下では YcnK の DNA 親和性は低下し、銅イオン添加条件では上昇することがわかった。さらに、*ycnK* プロモーターと *lacZ* 遺伝子を連結した構築と、*ycnK* 破壊、*csoR* 破壊、および *copZA* 破壊を様々な組み合わせで有する枯草菌株を用いてレポーター解析を行った結果、銅イオン存在下では YcnK が活性化して *ycnKJI* オペロンの抑制に働き、また直接プロモーター領域に結合しないが CsoR も *copZA* 発現を介してこのオペロンを制御していることがわかった。*ycnL* プロモーターと *lacZ* 遺伝子を連結した構築を用いた同様のレポーター解析の結果から、YcnK は *ycnL* 発現の抑制にも寄与することが示された。

1) Chillappagari, S., *et al.*, J. Bacteriol., **191**, 2362-2370 (2009).

Bacillus subtilis, copper homeostasis, transcriptional regulation

講演番号：3C21a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ C校舎21会場

シアノバクテリア*Synechococcus elongatus* PCC 7942のシグマ因子SigF2による概日時計に依存した転写制御

Circadian clock-dependent transcription is regulated by SigF2 in *Synechococcus elongatus* PCC 7942

小堀 奈美、秋元 勇輝、田中 寛[1]、○華岡 光正（千葉大院・園芸、[1]東工大・資源研）
Nami Kobori, Yuki Akimoto, Kan Tanaka[1], ○Mitsumasa Hanaoka (Grad. Sch. Horticul., Chiba Univ., [1]Tokyo Inst. Tech.)

【目的】概日時計は生体内で約24時間周期のリズムを生み出すシステムであり、その働きにより昼夜の光環境変化に備えた効率的な生命活動を行うことが可能である。シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行う原核生物であり、最も単純な概日時計機構を持つことが知られている。これまでに、KaiA, KaiB, KaiCと呼ばれる3種のタンパク質により構成される中心振動体からの時間情報が、二成分制御系を介して700前後の遺伝子発現リズムに伝達されることが示されている。しかしながら、二成分制御系が受け取る時間情報が、どのような仕組みでゲノムワイドな遺伝子発現に伝わるかは不明であった。高振幅の発現パターンを示す遺伝子には、RNAポリメラーゼのプロモーター認識サブユニットであるシグマ因子のうち、*rpoD5*, *rpoD6*, *sigF2*も含まれていた。そこで、これら高振幅シグマ因子が二成分制御系の下流で機能すると考え、概日時計に依存した転写制御におけるシグマ因子群の役割を明らかにすることを本研究の目的とした。
【方法・結果】3種の高振幅シグマ因子がどのように下流遺伝子群の転写制御に関わっているかを調べるため、野生株と各シグマ因子欠損株を12時間／12時間の明暗条件下で培養することで概日時計を同調させ、その後、恒明条件下に移し4時間おきに48時間連続でサンプリングを行った。ノザン解析により3種の高振幅シグマ因子遺伝子の発現変化を調べた結果、*sigF2*欠損株において*rpoD5*の周期的な発現パターンが特異的に消失することを見出した。このことから、*rpoD5*の転写リズムはSigF2により制御されていることが示唆された。また、最近報告されたマイクロアレイ解析により、糖異化関連遺伝子の中には高振幅な発現パターンを示すものが多数存在することが明らかにされている。そこで、代表的ないくつかの遺伝子について発現変化を調べたところ、*sigF2*欠損株において*gap1*の転写リズムが同様に消失することが分かった。以上の結果から、SigF2がゲノムワイドな遺伝子発現制御の一端を担っていることが示唆された。並行して進めているウエスタン解析やクロマチン免疫沈降（ChIP）解析の結果も総合して、3種の高振幅シグマ因子による概日時計に依存した転写制御系について議論する。

cyanobacteria、circadian clock、sigma factor

講演番号:3C21a11
講演日時、会場:3月24日11:10～ C校舎21会場

*Thermus thermophilus*におけるプロリン分解系酵素遺伝子群の発現制御機構に関する研究

Studies on transcriptional regulation of the genes for proline utilization in *Thermus thermophilus*

○志水 正敏、岩永 直樹、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大・生物工学セ）
○Masatoshi Shimizu, Naoki Iwanaga, Takeo Tomita, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama (Biotechnol. Res. Ctr, Univ. Tokyo)

【目的】細菌においてプロリンは二つの酵素、プロリン脱水素酵素(PRODH)と1-ピロリン-5-カルボン酸脱水素酵素(RocA)によってグルタミン酸へと代謝される。また、グルタミン酸はアミノ酸合成に利用される一方で、グルタミン酸脱水素酵素(GDH)により2-オキソグルタル酸へと代謝され、TCAサイクルに取り込まれる。プロリンを分解する酵素群は種を超えて比較的良く保存されている一方、これらの酵素群の発現を制御する機構は多岐に渡ることが知られており、非常に興味深い。高度好熱菌*Thermus thermophilus*のゲノム上において、プロリン分解酵素遺伝子はクラスターを形成している。そのクラスターの先頭にはGntRファミリーに属する機能未知の転写因子が存在し、我々はこれをPutR（Proline utilization regulator）と命名した。本研究ではPutRによる遺伝子発現制御機構を研究することで、プロリン代謝系の新たな制御機構を明らかにすることを目的としている。
【方法・結果】まず、*Thermus thermophilus* HB27株を最少培地で培養し、1 mMのプロリンを添加した際の転写プロファイルの変化を、DNAマイクロアレイを用いて解析した。その結果、プロリンの添加により*prodh*と*rocA*の転写量が約20倍に、*gdh*の転写量は約2倍に増大した。我々はこの発現量の変化は転写因子PutRを介したものである、と推測した。次に、*putR*遺伝子の上流135 bpをDNAプローブとしたゲルシフトアッセイを行ったところ、PutRがDNAプローブに濃度依存的に結合する様子が観察された。また、同じ領域に対してDNase I フットプリンティングを行ったところ、PutRが9塩基対からなる回文配列を認識していることが示された。さらに、*putR*遺伝子の転写開始点をS1 ヌクレアーゼマッピングによって決定し、RNAポリメラーゼが結合する位置とPutRが結合する位置が重なることを明らかにした。以上の結果からPutRはプロリン分解酵素遺伝子群の上流においてRNAポリメラーゼの結合を阻害するリプレッサーであることが推測され、PutRが直接プロリン分解酵素遺伝子群の発現を制御していることが示唆された。またDNAマイクロアレイ解析の結果から、PutRはプロリンまたはプロリンの代謝物をエフェクターとし、DNA結合能を変化させることが予想されたため、エフェクター分子の探索を行っているところである。本発表では、細胞内でPutRの制御化にある遺伝子を明らかにするために行っているChIP-chip解析についても併せて報告する予定である。

Keyword1, Keyword2, Keyword3 transcriptional regulator, *Thermus thermophilus*, proline utilization

講演番号:3C21a12
講演日時、会場:3月24日11:21～ C校舎21会場

超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* の低温誘導型RNAヘリカーゼの系統学的及び遺伝学的解析

Phylogenetic and genetic analysis of cold-inducible RNA helicase in hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○長岡英里子[1,3]、島田陽子[1]、福田青朗[2]、今中忠行[2]、藤原伸介[1,3]
([1] 関西学院大・理工、[2] 立命館大・生命科学、[3] 関西学院大院・生命環境センター)
○Eriko Nagaoka[(1)], Yoko Shimada[(1)], Wakao Fukuda[(2)], Tadayuki Imanaka[(2)], Shinsuke Fujiwara[(3)].
([(1)] Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Kwansei-Gakuin University, [(2)] Department of Biotechnology, College of Life Sciences, Ritsumeikan University, [(3)] Research Center for Environmental Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Kwansei-Gakuin University)

【目的】*Thermococcus kodakarensis* は *Pyrococcus* 属超好熱菌にはない低温誘導型RNAヘリカーゼ(TK0306)を有する。好熱性始原菌間で生育温度範囲を比較すると、TK0306オルソログを持つ好熱菌はTK0306オルソログを持たない好熱菌に比べ生育下限温度が低い傾向がみられる。つまり好熱菌においては、TK0306ホモログはより低温環境での生育に関与していると考えられた。本研究ではTK0306の生理学的役割を明らかにするため破壊株を作製し生育に及ぼす影響を調べると共に、遺伝子の誘導機構を調べることを目的とした。
【方法】まずTK0306に関して系統樹を作製し、TK0306の系統学的位置づけを明確化するとともにTK0306のコドン利用性を*T. kodakarensis*が持つ他のヘリカーゼと比較した。次にTK0306遺伝子破壊株を作製し、温度依存的な生育特性を見た。また、様々な温度で培養した細胞からmRNAを抽出し、プライマーエクステンション法とRT-PCRによりTK0306の転写の温度依存性を解析した。さらにカタラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子とするレポーターアッセイ系を構築し、誘導特性を詳細に調べた。
【結果】まず系統学的位置づけとコドン利用性について調べたところ、TK0306はロイシンとイソロイシン、アスパラギン酸においてコドンの利用性が明らかに異なることが分かった。これはTK0306が他の微生物から水平移動により獲得されたものであることを示唆している。次にTK0306破壊株の生育を調べると、野生株と比較してTK0306破壊株は60℃で比増殖速度は速いが、最終的な細胞密度が低く、培養を続けると溶菌するという特徴が見られた。このことから、TK0306は低温での生育に必要であると考えられる。また、転写開始点の決定からTK0306は非常に長い5’UTRを有していることが分かった。RT-PCRにより60℃では転写が確認されたが、85℃及び93℃では確認されなかった。このことからTK0306は*T. kodakarensis*の細胞内で至適生育温度よりも低温で機能することが分かった。さらに5’UTRを含むプロモーター領域をカタラーゼ遺伝子と融合し、レポータープラスミドを構築した。このプラスミドを用いて制御に必要な領域の絞り込みを行っている。

講演番号：3C21a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ C校舎21会場

超好熱菌*Thermococcus kodakarensis*の水素・硫化水素発生を調節する転写因子の機能解析

Study on transcriptional regulator to control hydrogen/hydrogen sulfide production in *Thermococcus kodakarensis*

○山下 敬太[1,2]、秀瀬 涼太[1,2]、金井 保[3]、跡見 晴幸[3]、今中 忠行[4]、藤原 伸介[1,2]
([1]関西学院大院・理工、[2]関西学院大院・生命環境セ、[3]京大院・工、[4]立命館大・生命)
○Keita Yamashita[1], Ryota Hidese[1], Tamotsu Kanai[3], Haruyuki Atomi[3], Tadayuki Imanaka[4], Shinsuke Fujiwara[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci and Tech., Kwansei-Gakuin Univ. [2]Res. Cen. Environ Biosci., Kwansei-Gakuin Univ. [3]Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ. [4]Col. Lifsci., Ritsumeikan Univ)

【目的】超好熱菌*Thermococcus kodakarensis*のゲノム解析から、硫黄代謝に関わると推定された転写因子(TK1086)の機能を解明することを目的とした。
【方法】TK1086を破壊した株（ΔTK1086株）の生育特性、及びマイクロアレイ解析からTK1086の生理的役割、被調節遺伝子を推定した。推定被調節遺伝子群のうち、特にΔTK1086株で転写量が顕著に上がることが確認されたTK1326(ferredoxin NADP oxidoreductase）遺伝子は、上流領域にTATA配列を挟む形で２つの推定TK1086結合配列（GTTn$_3$AAC）を有する。そこでTK1326遺伝子に注目し、転写開始点の決定を行った。さらに組み換えTK1086タンパクを用いてそれぞれの推定結合配列に対するTK1086結合能の解析、及び転写活性測定を行った。
【結果】ΔTK1086株は硫黄を含む培地では生育したが、硫黄を含まない培地では生育しなかった。マイクロアレイ解析から、破壊株では水素発生及び硫化水素発生に関与する遺伝子の転写量が顕著に変化することがわかった。中でも注目したTK1326（ferredoxin NADP oxidoreductase）遺伝子の転写開始点は２つのTK1086推定結合配列（GTTn$_3$AAC）の下流に存在し、またTK1086が両方の配列にそれぞれ結合することが確認された。さらにTK1086タンパク質がTK1326遺伝子の転写に及ぼす影響を*in vitro* で調べたところ、TK1086の添加により転写が抑制された。しかしTK1086の濃度をあげるにつれて、転写抑制は解除され、反対に促進効果も認められた。このことからTK1086は、濃度依存的に2つの結合配列に結合し、TK1326 遺伝子の発現を調節していると考えられた。

Keyword1, transcriptional regulator Keyword2, sulfur metabolism Keyword3, H_2 generation

講演番号：3C21a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ C校舎21会場

超好熱始原菌*Thermococcus kodakarensis*の二つの転写開始因子TK1280とTK2287の生理機能解析

○秀瀬 涼太、牛村 友一、高 楽、跡見 晴幸[1]、今中 忠行[2]、藤原 伸介（関学大院･理工･生命科学、[1]京大院･工･合成、[2]立命大院･生命･生物工）

Analysis of physiological functions of two transcriptional initiation factors, TK1280 and TK2287, in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis.*

○Ryota Hidese, Yuichi Ushimura, Le Gao, Haruyuki Atomi[1], Tadayuki Imanaka[2], and Shinsuke Fujiwara (Res. Cent. for Environ. Biosci., Grad. Sch. of Sci. and Tech., Kwansei-Gakuin univ., [1]Dept. of Syn. Chem. and Biol. Chem., Grad. Sch. of Eng., Kyoto univ., [2]Dept. of Biotech., Col. of Life Sci., Ritsumeikan univ.

【目的】アーキアのRNAポリメラーゼはユーカリアのRNAポリメラーゼの一つであるPolIIに類似している。ユーカリアの転写には多くの因子が関与する一方で、アーキアの転写に関わる因子はTATA-Box結合タンパクであるTBPと転写開始因子であるTFBのみである。興味深いことに、多くのアーキアのゲノムには、TBPやTFBをコードする遺伝子が複数存在している。これは、様々なTFBとTBPの因子の組み合わせがRNAポリメラーゼを様々なプロモーターに誘導することで正常な転写が成されていると考えられる。超好熱菌*Thermococcus kodakarensis*はTFBホモログであるTK1280とTK2287を有している。それらは転写開始因子として機能することが明らかにされているが、それらの生理的な役割の違いは未だ不分明である。本研究では、*T. kodakarensis*の２つ転写開始因子TK1280、TK2287の生理意義を解明することを目的とし、TK1280、TK2287遺伝子破壊株を作成し、培養温度による生育の違いを調べた。また、TK1280、TK2287の温度依存的な転写動態を解析した。【結果】TK1280、TK2287遺伝子をそれぞれ破壊し、それら破壊株の培養温度60℃、85℃、93℃での生育を野生株と比較した。その結果、60℃ではいずれの株も生育に違いは見られなかった一方で、85℃ではTK2287破壊株のみが定常期において早い段階での溶菌が認められた。さらに、93℃ではTK2287、TK1280破壊株の両方で生育遅延が生じた。次に、60℃、85℃、93℃の各温度で培養した*T. kodakarensis*の対数期後期の細胞からRNAを抽出し、TK1280、TK2287遺伝子の転写量をqRT-PCRで解析した結果、TK2287は温度に依存せず構成的に発現していた一方で、TK1280は60℃、85℃に比べて93℃で転写量が増大した。これらの結果から、TK2287は恒常的に必須なTFBであり、TK1280は特に高温（93℃）において必須なTFBであることが予想された。TK1280、TK2287依存的に発現する遺伝子のDNAマイクロアレイを用いた網羅的な転写量解析の結果も合わせて報告する。

Keyword1, Keyword2, Keyword3 ：Transcriptional initiation factor, hyperthermophilic archaeon, RNA polymerase

講演番号：3C21a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ C校舎21会場

大腸菌における全リボソームタンパク質遺伝子オペロンの発現解析

Analysis of expression of ribosomal protein operons in *Escherichia coli*.

○笹生 春菜、梅林 章、石浜 明[1]、前田 理久（明治大農・農化、[1]法政大生命・生命）
○Haruna Sasao, Akira Umebayashi, Akira ishihama[1], Michihisa Maeda (Meiji Univ., [1]Hosei Univ.)

細菌の増殖速度とタンパク質合成量は密接に関係している。したがって、タンパク質合成装置であるリボソームの細胞当たりの数も増殖速度に相関していると考えられる。大腸菌のリボソームは 3 種の rRNA と 55 種のリボソームタンパク質(r-Protein)が各々1 分子ずつ会合することで構成されている。これまで、rRNA の発現制御には多くの研究が報告されているが、r-Protein の転写制御機構に関する統合的な研究はほとんどされていない。そこで当研究室では、各 r-Protein の発現プロファイルを決定し解析することでリボソーム生合成制御の解明にアプローチしている。

転写プロファイルは 2 色蛍光ベクターによる *in vivo* プロモーター活性測定システム(*i* PAS)を用いて解析した。55 の r-Protein 遺伝子は 31 オペロン(転写単位)を構成し、これまでに標準的な生育条件におけるプロファイルを決定した。その結果、全てのオペロンで対数増殖期に最大の転写活性を示した。しかしながら最大活性値は、各オペロン間で最も活性値の大きいものと最も小さいもので、10 倍を超える差異を示した。通常リボソームにはそれぞれ 1 分子ずつの r-Protein が会合しているため各 r-Protein の細胞内濃度もほぼ同等であることが予想される。しかし転写活性はそれと矛盾するため、別の機構がはたらいて制御されていると考えられる。

その機構としては、rRNAに対して過剰に合成された遊離のr-Proteinが、自身をコードするmRNAの5’端付近に結合することでそれ以降の翻訳を阻害するというフィードバック制御が知られている。この制御機構は約半数のr-Proteinオペロンで報告されており、その多くは比較的高い転写活性を示す。これらのオペロンでは、必要以上の転写が行われたとしても、フィードバック制御により翻訳の調節が行われていると考えられるが、フィードバック制御が報告されていないにもかかわらず高い転写活性を持つオペロンもいくつか存在している。現在われわれはこれらのオペロンの制御機構を明らかにするために、転写後調節を解析している。

E. coli, Ribosomal protein, Post-transcriptional regulation

講演番号:3C21p02
講演日時、会場:3月24日14:00～ C校舎21会場

コリネ型細菌RNase E/Gファミリー酵素の酢酸代謝における役割

Role of the RNase E/G family endoribonulease of *Corynebactrium glutamicum* in acetate metabolism

○前田　智也、和地　正明（東工大院生命理工・生物プロセス）
○Tomoya Maeda, and Masaaki Wachi (Dept. Bioeng. Tokyo Tech.)

【目的】*C. glutamicum*はグルタミン酸の生産菌として分離され、多くのアミノ酸や核酸、有機酸などの工業的発酵生産に利用されている。遺伝子発現制御は転写段階だけではなく、mRNAの安定性などの転写後段階においても複雑に制御されている。RNase E/Gファミリー酵素は多くの細菌に広く保存されているエンド型のRNA分解酵素で、大腸菌はRNase EとRNase Gの2つのホモログを有している。*C. glutamicum*ではNCgl2281遺伝子にコードされている1つのホモログを有している。大腸菌においてRNase Eは、生育に必須で多くのmRNAの分解に関与する。一方、大腸菌のRNase Gは生育に必須ではないが、解糖系酵素をmRNAレベルで制御している。近年、mRNAレベルでの遺伝子発現制御が細菌においても注目されており、mRNAの安定性を変えることで細菌の更なる有効利用が可能になると思われる。これまでの研究により、NCgl2281は大腸菌RNase E変異は相補しないものの、RNase G変異は相補できることが明らかになっている。本研究ではRNase E/Gの機能解析を行うことで、有用物質生産菌におけるmRNAレベルの遺伝子発現制御機構の解明を目指した。RNase E/GによるmRNAの安定性制御機構を解明することで、転写レベルでの制御では難しい、微妙な発現制御が可能になると思われる。このことは、微生物を用いた有用物質生産や環境浄化等の実現において、宿主細胞内に必要な酵素を高濃度蓄積させたり、代謝フラックスを最適化させたりする際に重要な技術となると考えられる。
【方法】二回相同組換え法により*C. glutamicum*におけるNCgl2281遺伝子の欠損株を構築した。続いてノーザン解析、マイクロアレイ解析、プライマー伸長法、3’RACE法などを用いて、rRNAの成熟やターゲットmRNAの同定を試みた。
【結果および考察】ノーザン解析からRNase E/Gは5S rRNAの成熟に関与していることがわかった。また、プライマー伸長法により、RNase E/Gは5S rRNAの5’側成熟末端から1塩基上流のUと2塩基上流のGの間の一本鎖領域を切断していることが明らかになった。マイクロアレイ解析からRNase E/GはmRNAの安定性にグローバルな影響を与えないことがわかった。またRNase E/Gの基質の一つとして、イソクエン酸リアーゼをコードしている*aceA* mRNAを見出した。酢酸を唯一の炭素源として増殖させた場合、RNase E/G欠損株では*aceA* mRNAの安定性が増加し、イソクエン酸リアーゼの過剰発現が確認された。現在、RNase E/Gによる*aceA* mRNの分解制御機構および、酢酸代謝制御について解析中である。

Corynebacterium glutamicum, RNase E/G, isocitrate lyase

講演番号:3C21p03
講演日時、会場:3月24日14:11～ C校舎21会場

コリネ型細菌のグローバルレギュレーターGlxRの転写制御システムの解析

Transcriptional regulation of GlxR regulon genes in *Corynebacterium glutamicum*

○豊田晃一、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明 (RITE)
○Koichi Toyoda, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa (RITE)

【目的】我々は有用工業微生物である*Corynebacterium glutamicum*における中央代謝系の調節機構の解明を目的として、関連酵素遺伝子の発現制御機構の解析を進めている。大腸菌の糖代謝制御において重要な役割を担うグローバルレギュレーター、cAMP receptor protein (CRP)のホモログであるGlxRは、解糖系、TCA回路を含めた様々な細胞機能に関与する遺伝子のプロモーター領域に結合することが、*in vitro* DNA結合実験により示されている。しかし、*glxR*遺伝子破壊株が顕著な生育低下を示すためGlxRの*in vivo*での機能の評価は困難である。我々は、ChIP-chip解析により*in vivo*におけるGlxR結合領域として209個所を同定し、複数の新規結合サイトを見出した[1]。本研究では炭素源に応じた遺伝子発現制御におけるGlxRの役割について解析を行った。
【方法と結果】GlxRレギュロンとして同定された解糖系酵素遺伝子*gapA* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseをコード)、*pfk* (phosphofructokinase)、*aceE* (pyruvate dehydrogenase E1 subunit)はグルコースによってプロモーター活性が上昇するが、各プロモーター領域のGlxR結合サイトへ変異を導入することにより、そのグルコース応答が抑制された。*C. glutamicum*の細胞内のcAMP濃度は酢酸条件と比較しグルコース条件下で高いことから、GlxRはcAMPに応答して解糖系酵素遺伝子の発現を活性化していることが示唆された。一方、cytochrome *c* oxidaseやH^+-ATPaseをコードする遺伝子は培養条件にかかわらず構成的にGlxRによって活性化されていることが示された。さらに、細胞分裂の際に働くcell wall hydrolaseの発現にはGlxRが必須であることが明らかになった。cAMP合成酵素adenylate cyclaseをコードする遺伝子(*cyaB*)の破壊株を用いたChIP-chip解析により、野生株とほぼ同様のGlxR結合領域が検出されたことから、GlxRの結合サイトへの相互作用にCyaBは必須ではないことが示された。
本研究の一部はNEDOの委託研究の一環として行われたものである。
1) J Bacteriol (2011) 193, 4123

Corynebacterium glutamicum, transcriptional regulation, global regulator

講演番号：3C21p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎21会場

コリネ型細菌の嫌気硝酸呼吸条件下におけるSOS応答の役割

Role of the SOS response during anaerobic nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*

○西村 拓、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明（RITE）
○Taku Nishimura, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa (RITE)

【目的】我々は有用工業微生物である*Corynebacterium glutamicum*の嫌気条件下における物質代謝調節機構について解析を進めてきた。これまでに本菌が嫌気条件下において硝酸呼吸により生育が可能であること、トランスクリプトーム解析から嫌気硝酸呼吸時に様々な細胞機能に関与する多数の遺伝子の発現が変動することを報告している。今回はその中でも特にDNA損傷に対する修復系であるSOS応答に関与する遺伝子群の発現誘導に注目し、硝酸呼吸時におけるSOS応答の役割について検討を行ったので報告する。
【方法と結果】嫌気硝酸呼吸条件下において、DNA損傷に対する細胞分裂抑制、ヌクレオチド除去・組換え修復等に関与するSOS応答遺伝子群の転写活性化とともに、SOS応答に特徴的な異常な細胞伸長が観察された。これらの転写および形態レベルの変化は、センサータンパク質としてSOS応答遺伝子群の転写活性化に関与する*recA*遺伝子の破壊株では観察されなかった。また、同条件下における*recA*遺伝子破壊株の生存率が、野生株と比較して著しく低下することを確認した。以上の結果から、RecA依存的なSOS応答が、嫌気硝酸呼吸条件下におけるコリネ型細菌の生存に重要な役割を果たしていることが明らかとなった[1]。
本研究の一部はNEDOの委託研究の一環として行われたものである。
1) J Bacteriol (2011) 193, 1327

Corynebacterium glutamicum, nitrate respiration, SOS response

講演番号:3C21p05
講演日時、会場:3月24日14:33～ C校舎21会場

コリネ型細菌におけるNAD *de novo*生合成オペロンの転写制御因子

Transcriptional regulation of NAD *de novo* biosynthesis operon in *Corynebacterium glutamicum*

○寺本陽彦、乾 将行、湯川英明 (RITE)
○Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa (RITE)

【目的】NADは細胞代謝における様々な酸化還元反応の補酵素として働く。多くの細菌は、アスパラギン酸からのNAD *de novo*生合成経路と、細胞内外に存在するNAD誘導体の再利用・サルベージ経路を持ち、これらの経路の協調的制御が細胞内NAD補酵素レベルの維持のために重要である。我々は有用工業微生物である*Corynebacterium glutamicum*の代謝調節機構を解明するため、様々な物質代謝遺伝子の発現制御機構の解析を進めている。本研究では、*C. glutamicum*ゲノム上に存在するNAD *de novo*生合成オペロン（*ndnR-nadA-nadC-nadS*）の先頭の遺伝子にコードされる新規転写因子NdnRの機能解析を行った。
【方法と結果】RT-PCR解析により、*C. glutamicum*におけるNAD *de novo*生合成に必須な*nadA*、*nadC*、*nadS*は、NrtRタイプの転写因子をコードする*ndnR*とともに、NAD生合成前駆体として利用されるニコチン酸存在下で発現レベルが著しく抑制されることが示された[1]。*ndnR*遺伝子の欠損により、*nadA*、*nadC*、*nadS*のmRNAレベルが上昇し、ニコチン酸に対する応答が消失した。また、*ndnR*プロモーター-*lacZ*レポーター融合遺伝子の発現解析においても同様に、NdnRを介したニコチン酸応答制御が示された。さらに、*in vitro* DNA結合解析により、NdnRが*ndnR*プロモーターに結合することを確認した。これらの結果から、NdnRが自身の遺伝子を含むNAD *de novo*生合成オペロン（*ndnR-nadA-nadC-nadS*）の転写抑制因子として働くことが明らかとなった。
本研究の一部はNEDOの委託研究の一環として行われたものである。
1) Appl Environ Microbiol (2010) 76, 5488

Corynebacterium glutamicum, NAD biosynthesis, transcriptional regulation

講演番号：3C21p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ C校舎21会場

LplRによるL-パントイルラクトン脱水素酵素遺伝子発現調節機構の解明

Regulation mechanism of L-pantoyl lactone dehydrogenase gene expression by LplR

○斯 大勇[1]、浦野 信行[1,2]、清水 昌[1]、片岡 道彦[1,2]（[1]京大院農・応用生命、[2]阪府大院・生命環境）
○Dayong Si[1], Nobuyuki Urano[1,2], Sakayu Shimizu[1], Michihiko Kataoka[1,2]（[1]Appl. Life Sci., Agric., Kyoto Univ., [2]Appl. Life Sci., Life & Environ., Osaka Pref. Univ.）

【目的】L-Pantoyl lactone (L-PL) dehydrogenase (LPLDH) of *Rhodococcus erythropolis* AKU2103 is one of the important enzyme in stereoinversion of L-PL to D-PL. The LPLDH activity of *R. erythropolis* AKU2103 is not sufficient for practical use. Although LPLDH gene (*lpldh*) could be overepressed, introduction of the gene along with 1940 bp upstream region and 1,2-propanediol (1,2-PD) induction were required for higher level expression of *lpldh* in recombinant *R. erythropolis* AKU2103. To clarify the expression mechanism of *lpldh*, and to obtain more effective catalyst for L-PL oxidation for D-PL production, genetic analysis around *lpldh* in *R. erythropolis* AKU2103 was performed.

【結果】The ORFs around *lpldh* was explored and the map is shown in Figure. A TetR-like regulator gene, named *lplR*, was found in upstream of *lpldh*. A disruption mutant of *lplR* was constructed via two-time homologous recombination. The un-induced Δ*lplR* mutant showed higher activity than induced wild type *R. erythropolis* AKU2103. The expression level of *lpldh* in wild type and Δ*lplR* strains was quantified with qRT-PCR. Disruption of *lplR* leaded to 22.8 times higher expression of *lpldh* than wild type strain without 1,2-PD induction, while the addition of 1,2-PD rendered 6.6 times higher expression in wild type strain. On the other hand, introduction of *lplR* gene into wild type and Δ*lplR* strains of *R. erythropolis* AKU2103 leaded to almost no L-PL oxidation activity in both recombinant strains. These results indicated that LplR protein is a negative regulator in *lpldh* expression. Through reverse transcription PCR, *lplR* was proved to be in different operon with downstream ORFs D-F, *lpldh*, G-I, while *lpldh* is in the same operon with upstream ORFs D−F. The transcription start site of this operon was determined to be a G, which is 22 bp upstream of the start codon of *orfD*, by 5'-rapid amplification of cDNA end. Result of EMSA demonstrated that LplR protein repressed *lpldh* expression by binding to a 6 bp inverted repeated sequence locating in the promoter/operator region of operon containing *lpldh*. Recombinant Δ*lplR* strain harboring pKLPLDH (a *lpldh* overxpression plasmid) showed almost the same oxidation activity regardless of 1,2-PD induction. Stereoinversion of L-PL to D-PL was carried out by combination of this recombinant Δ*lplR* strain and recombinant *E. coli* (pETSmKPR/pACGD) constructed previously (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press). As a result, 0.768 M DL-PL was completely converted to D-PL in 96 h.

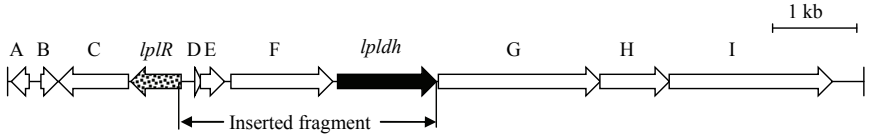


Fig. Map of ORFs around *lpldh* of *R. erythropolis* AKU2103.

expression mechanism, regulation, stereoinversion

講演番号:3C21p07
講演日時、会場:3月24日15:05～ C校舎21会場

乳酸球菌*Lactococcus lactis* IO-1株におけるキシロースオペロンの転写調節

Transcriptional regulation of the xylose operon in *Lactococcus lactis* IO-1

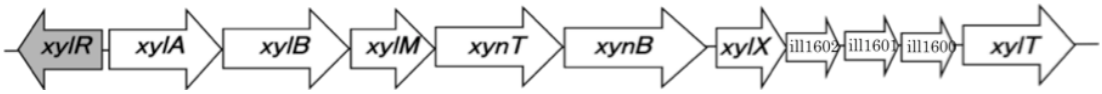
○上原彰浩[1], 簗瀬弘明[1], 森下英治[1], 東崎正[1], 善藤威史[2], 千葉櫻拓[1], 門多真理子[3], 園元謙二[2], 吉川博文[1] ([1]東農大・バイオ　[2]九大院・農　[3]武蔵野大・環境)

○Akihiro Uehara[1], Hiroaki Yanase[1], Eiji Morishita[1], Tadashi Tozaki[1], Takeshi zendo[2], Taku Chibazakura[1], Mariko Shimizu-Kadota[3], Kenji Sonomoto[2], Hirofumi Yoshikawa[1]

([1]Dept.Biosci,Tokyo Univ.Agric.,[2]Dept.Biosci and Biotech,Kyusyu Univ.,[3]Dept.Env Sci, Musashino Univ.)

【目的】

光学活性のある乳酸はポリ乳酸プラスチックの原料となる。木質三大成分の１つであり、現在あまり有効に利用されていないキシランをバイオマス原料として利用し、光学活性乳酸を生産することを試みている。本研究に用いる *Lactcoccus lactis* IO-1 株(以下 IO-1 株)はキシランの主成分であるキシロースから高効率で L 型乳酸生産ができる。また、キシロース代謝初期の酵素をコードする遺伝子群は染色体上で下図のような構造をとっている。IO-1 株におけるキシロース資化能向上を目指し、キシロースオペロンの転写調節機構を解析した。



【方法・結果】

(1) キシロースオペロンの転写単位の解析:*xylA, xylB, xylM, xynT, xynB*の各プローブを用いてノーザン解析を行った結果、共通して約7.0kbのmRNAが検出され、これら遺伝子は転写単位を取っていることがわかった。また、プライマー伸長法で転写開始点を決定した。

(2)カタボライト調節およびXylRの機能解析:IO-1株をグルコース(C6)とキシロース(C5)の混合培地で培養すると、キシロースオペロンは転写されず、グルコースが消費され尽くすと転写が始まることがノーザン解析からわかった。この現象は二つの転写制御機構によってなされていると考えられた。一つ目はグラム陽性菌共通のカタボライト調節因子であるCcpAによるものである。His-tagを融合させ精製したCcpAを用いたゲルシフトアッセイにより、*xylA*の-10領域付近に結合配列*cre*(catabolite responsive element)と思われる領域を見いだした。グルコース存在下では、CcpAが*xylA*の*cre*配列に結合することで転写を負に制御すると考えられた。二つ目はXylRによる調節である。構造予測および欠失変異を用いた機能解析の結果、XylRはAraCファミリーに属し、正にキシロースオペロンを転写調節していることが明らかになった。グルコース非存在下ではCcpAによる負の制御が外れ、XylRの正の制御によってキシロースオペロンが転写され、キシロースの資化が可能となると考えられた。現在、大腸菌シャペロンの一種であるTrigger FactorをXylRに融合し、精製を試みている。これら二つの制御系によるキシロースオペロンの転写モデル図を提唱する。

Lactococcus lactis , catabolite regulation , xylose metabolism

講演番号：3C21p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎21会場

ウェルシュ菌バイオフィルム形成におけるSpo0A及びAbrBの機能解析

Functional analysis of Spo0A and AbrB on biofilm formation in *Clostridium perfringens*

○尾花 望、野村暢彦、中村幸治（筑波大・生命環境）
○Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura, Kouji Nakamura (Tsukuba Univ.)

【背景】実環境中において多くの細菌は浮遊状態ではなく、集団でバイオフィルムと呼ばれる構造体を形成して生育している。バイオフィルム内の細菌は外界のストレスや抗生物質に対する高い耐性を獲得することが知られており、また、バイオフィルム形成段階においては、浮遊状態の細菌と比較して劇的な遺伝子発現の変化が起こっている。実環境中における細菌の挙動の理解には、バイオフィルム形成がどのように制御されているかを解析する必要がある。

ウェルシュ菌はグラム陽性の芽胞形成性偏性嫌気性桿菌であり、多くの細胞外酵素や毒素を産生する病原細菌である。近年、ウェルシュ菌もバイオフィルムを形成することが報告されており、バイオフィルム中においては抗生物質耐性や酸化ストレス耐性が劇的に上昇する。しかし、その形成段階においてどのような制御因子が関与しているかについては不明な点が多い。そこで我々はウェルシュ菌におけるバイオフィルム形成制御因子を探索した。

【方法】ウェルシュ菌13株を供試菌株とし、24ウェルマイクロタイタープレート上で培養後、底面に付着している菌体（バイオフィルム）をクリスタルバイオレットで染色し、定量を行った。菌液を1.0％BHI（Brain Heart Infusion）寒天培地上にスポットし、培養することによってGliding motilityの解析を行った。また、Northern解析によって遺伝子発現量を定量した。

【結果･考察】グラム陽性の芽胞形成性好気性桿菌である枯草菌においては、胞子形成誘導のマスターレギュレーターのSpo0A及びリプレッサータンパク質AbrBがバイオフィルム形成を正及び負に制御することが知られている。そこで、ウェルシュ菌*spo0A*及び*abrB* ホモログ遺伝子破壊株を作製した。野生株と比較して、*spo0A* 変異株ではマイクロタイタープレート底面に付着したバイオフィルム量の増加が見られた。一方で、*abrB* 変異株においては著しい細胞伸長と菌体の凝集が見られたが、マイクロタイタープレートへの付着はほとんど見られなかった。ウェルシュ菌のバイオフィルム形成効率にはタイプIV型の繊毛の関与が知られていることから、それぞれの株におけるGliding motilityを測定したところ、野生株と比較して*spo0A* 変異株では運動性の上昇が見られた一方で、*abrB* mutantではmotilityの減少が見られた。以上の結果から、ウェルシュ菌において*spo0A* 及び*abrB* はそれぞれGliding motilityを負及び正に制御しており、これらのレギュレーターが繊毛を介した基質表面への菌体の付着を制御していることが示唆された。

【謝辞】本研究はJST-ALCAの支援を受けて行われた。

Clostridium perfringens, biofilm, gliding motility

講演番号:3C21p09
講演日時、会場:3月24日15:27～ C校舎21会場

大腸菌におけるGGDEF/EALドメインタンパク質の機能解析

Functional analysis of GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*

○塚田海斗[1]、渡部大樹[2]、杉本華幸[1,2]、渡邉剛志[1,2]、鈴木一史[1,2]（[1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大農・応生化）

○Kaito Tsukada[1], Daiki Watanabe[2], Hayuki Sugimoto[1, 2], Takeshi Watanabe[1,2], Kazushi Suzuki[1,2]（[1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Niigata Univ., [2]Dept. of Appl. Biol. Chem., Facul. of Agric., Niigata Univ.）

【目的】c-di-GMPは細菌に特異的なセカンドメッセンジャーであり、バイオフィルム形成や運動性、毒性など多様な細胞プロセスを制御する。c-di-GMPの合成と分解はそれぞれGGDEFドメインを持つDiguanylate cyclaseと、EALドメインを持つPhosphodiesteraseによって行われ、細胞内のc-di-GMP量が調節される。大腸菌K-12株は29個のGGDEF/EALドメインタンパク質を持つことが報告されているが、大部分のタンパク質の機能は明らかになっていない。今回、機能未知のGGDEF/EALドメインタンパク質の機能解明を目的に大腸菌のバイオフィルム形成や運動性に与える影響について調べた。

【方法・結果】大腸菌MG1655株において機能未知のGGDEF/EALドメインタンパク質をコードする10個の遺伝子をクローン化し、過剰発現株でバイオフィルム形成量や運動性を調査した結果、GGDEFタンパク質YliF及びEALタンパク質YliEで顕著な影響が現れた。YliEはバイオフィルム形成量を減少させ、運動性を増加させた一方、YliFはバイオフィルム形成量を増加させ、運動性を減少させた。c-di-GMPはバイオフィルム形成量を増加させ、運動性を減少させることから、YliEとYliFはそれぞれc-di-GMPの分解、合成活性を示していると考えられた。YliEとYliFは遺伝子の配置からオペロンを形成している可能性が示唆され、互いに対となる表現型を示したことから、この2つのタンパク質は複合的に機能していると推測された。CR binding assayによりYliEの過剰発現株で付着性が減少した結果が示され、YliEは付着因子生産を抑制することによりバイオフィルム形成量を減少させる可能性が示唆された。部位特異的変異によりYliEのEAL、YliFのGGDEFモチーフをそれぞれAAL、GGAAFに変化させ、それぞれのc-di-GMP分解・合成活性を欠損させた変異タンパク質を過剰発現した株は、バイオフィルム形成量、運動性、付着因子生産などの表現型が野生型のYliE、YliFと異なる結果を示した。これらの結果から、YliE、YliFのGGDEF/EALドメインはc-di-GMPの分解・合成を行い、バイオフィルム形成、運動性等に影響を与えていると考えられた。

c-di-GMP, GGDEF, EAL

講演番号:3C21p10
講演日時、会場:3月24日15:38～ C校舎21会場

大腸菌におけるGGDEF-EALドメインタンパク質CsrDによるsmall RNA半減期の調節

Regulation of small RNA decay by GGDEF-EAL domain protein CsrD in *Escherichia coli*

高橋優介[1]、岡山明裕[1]、伊藤学[1]、杉本華幸[1,2]、渡邉剛志[1,2]、○鈴木一史[1,2]（[1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大農・応生化）

Yusuke Takahashi[1], Akihiro Okayama[1], Manabu Ito[1], Hayuki Sugimoto[1,2], Takeshi Watanabe[1,2], ○Kazushi Suzuki[1,2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Niigata Univ., [2]Dept. of Appl. Biol. Chem. Facul. of Agric., Niigata Univ.)

【目的】Csr (carbon storage regulator)システムは多くの真正細菌に存在し、グローバルな遺伝子発現調節を行っている。大腸菌Csrシステムは２つのタンパク質と２つのsmall RNAから構成されている。活性の中心となるRNA結合タンパク質CsrAは、*glgCAP, pgaABCD*や*flhDC*など、ターゲットとなるmRNAの5’-UTRに結合し、翻訳や安定性を変化させることで遺伝子の発現を調節している。２つのsmall RNA・CsrB及びCsrCは複数のCsrA結合部位を含むステムループ構造からなり、CsrAを捕捉することで細胞内でのCsrAの働きを阻害する。GGDEF-EALドメインタンパク質であるCsrDは、これらCsrB/C RNAのDegradosome依存的な分解を調節することでCsrAの細胞内での働きを制御している。CsrDは一般的なGGDEF-EALドメインタンパク質とは異なり、c-di-GMPの合成分解には関与せず、そのメカニズムは明らかになっていない。今回、CsrDのsmall RNA安定性制御のメカニズムを明らかにすることを目的に、CsrB RNA分解過程と部位特異的変異導入によるCsrD変異体がCsrB RNA半減期に与える影響について調べた。

【方法・結果】各種RNase変異株におけるCsrB RNAの半減期をノーザンブロットによって調べた結果、CsrB RNAの分解にはRNase Eが必須であり、完全分解にはPNPaseが必要であることがわかった。PNPase及びRNase II遺伝子の二重変異株の解析から、RNase IIはCsrB分解に関与するが、必須ではないと考えられた。CsrB RNAに複数存在するステムループ構造を削除した変異*csrB*遺伝子をプラスミドにクローン化して*csrB*欠損株で発現させ、その半減期を測定した。その結果、ターミネーターのステムループ構造直前の一本鎖領域が存在しない場合、その変異CsrBの半減期が極端に長くなることが明らかとなった。よって、この領域がCsrB分解に重要であり、RNase EによるCsrB分解の開始に関与している可能性が示唆された。一方、部位特異的変異を導入し、各種アミノ酸残基をアラニン残基に置換したCsrD変異体のうち、*csrB-lacZ*による*csrB*発現量とバイオフィルム形成量の測定結果からCsrDの活性が低下した１５のCsrD変異体を選択し、CsrB RNAの半減期に与える影響を調べた。その結果、予測通りCsrB RNAの半減期は長くなったものの、変異体によって差がみられた。さらに、対数増殖期、移行期、定常期におけるCsrB RNAの半減期を調べた結果、各増殖段階におけるCsrB RNAの半減期のパターンが、変異体によって異なることが明らかとなった。このような増殖段階における半減期の違いを示した変異体は、CsrDの膜貫通領域とGGDEFドメインの間に存在するHAMP-likeドメインのアミノ酸残基を置換したものであり、この領域がCsrB RNAの分解調節に重要な役割を果たしていると考えられた。

Csr system, small RNA, GGDEF-EAL domain protein

講演番号:3C21p11
講演日時、会場:3月24日15:49～ C校舎21会場

Post-transcriptional regulation of GcvB, a conserved small RNA regulator of amino acid metabolism

Post-transcriptional regulation of GcvB, a conserved small RNA regulator of amino acid metabolism

○宮腰　昌利、Chao Yanjie、Papenfort Kai、Sharma Cynthia M.[1]、Vogel Jörg (IMIB・ヴュルツブルク大、[1]ZINF・ヴュルツブルク大)

○Masatoshi Miyakoshi, Yanjie Chao, Kai Papenfort, Cynthia M. Sharma[1], Jörg Vogel (IMIB, Uni.Würzburg, [1]ZINF, Uni.Würzburg)

GcvB is one of the most widely conserved Hfq-dependent small RNAs (sRNAs). GcvB has emerged as a global post-transcriptional regulator of amino acid metabolism and in *Salmonella*, may target ~1% of all mRNAs by direct base pairing. GcvB is abundant in nutrient-rich medium at exponential phase, and its expression is transcriptionally controlled by the GcvA/GcvR transcriptional regulators in response to glycine. Here, we show that GcvB is also subject to post-transcriptional repression, by the distantly encoded SroC sRNA. SroC is processed from one of the targets of GcvB, namely the *gltI-sroC-gltJKL* operon mRNA encoding a glutamate/aspartate ABC transporter. The half-life of GcvB in *Salmonella* is greatly increased in the absence of SroC, whereas the steady-state levels of GcvB were reduced by pulse-expression of SroC. Hfq and RNase E are required for the SroC-induced degradation of GcvB *in vivo*. Both GcvB and SroC bind with Hfq and form a ternary complex with each other *in vitro*. GcvB has at least two Hfq-binding sites, the 5'-end stem-loop and the terminator, both of which are also crucial for the direct binding with SroC. Altogether, our results suggest a possible sRNA-sRNA negative feedback loop mechanism that impacts the kinetics of GcvB-mediated control of amino acid metabolism.

small RNA, Hfq, amino acid metabolism

講演番号：3C21p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ C校舎21会場

Rhodococcus jostii RHA1 における PCB 分解遺伝子群の転写に対するカテコールの影響

Evaluation of accumulated catechol toward the transcription of PCB-degrading genes in *Rhodococcus jostii* RHA1

○伊藤拓[1]、遠藤銀朗[2]、福田雅夫[3]、宮内啓介[2] ([1]東北学院大院・工、[2]東北学院大・工、[3]長岡技大・生物)

○Taku Ito[1], Ginro Endo[2], Masao Fukuda[3], Keisuke Miyauchi[2] ([1]Graduate School of Tohoku Gakuin Univ. , [2]Tohoku Gakuin Univ. , [3]Nagaoka Univ. Tech.)

【目的】ポリ塩化ビフェニル分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 のビフェニル分解に関与する遺伝子群の転写は、ビフェニル存在下でセンサーキナーゼ BphS1 およびレスポンスレギュレーター BphT1 / BphT2 を介して活性化される。これまでの研究で、ビフェニルの分解産物であるカテコールが蓄積することによってビフェニル初発分解酵素遺伝子 *bphAa* のビフェニルによる転写活性化が抑制されることが示されている。この転写抑制機構の全容を明らかにするために、本研究ではカテコールの蓄積による転写活性化の抑制が *bphAa* 遺伝子以外の BphS1 および BphT1 / BphT2 制御下にある遺伝子でも観察されるかどうか解析を試みた。

【方法】菌株として、RHA1 株とカテコール分解遺伝子を破壊した RHA1Δ*catA* 株を用いた。レポータープラスミドとして、*bphAa* プロモーター領域、および *bphAa* と同様に BphS / BphT による転写制御を受けている遺伝子 *etbD1*、*etbAd*、*etbAa1*、*etbAa2* のプロモーター領域をそれぞれルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだ 5 種のレポータープラスミドを用い、ビフェニル存在下での転写活性を比較した。

【結果】培地にビフェニルを加えた場合、RHA1株では*bphAa*プロモーター活性は上昇するが、Δ*catA*株においては活性化の抑制が見られる。*bphAa*以外のBphS / BphT転写制御下にある4種のプロモーター活性に関しても、カテコールの蓄積によると考えられる抑制が観察された。これらの結果から、カテコールの蓄積はBphS / BphTによる転写活性化機構そのものに対して影響を及ぼすことが示唆された。

PCB, Rhodococcus, catabolite repression

講演番号：3C21p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎21会場

各宿主特異的なプラスミドpCAR1上の分解遺伝子群の発現を調節する因子の解析

Does each host regulate carbazole degradative genes on pCAR1 equally?

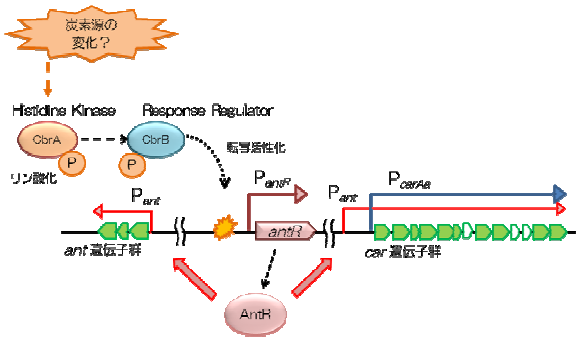
○岩田 修、松本 貴嗣[1]、新谷 政己[2]、高妻 篤史[3]、山根 久和、野尻 秀昭（東大・生物工学セ、[1]東農大・ゲノム解析セ、[2]理研 BRC-JCM, [3]東大・先端研）

○Osamu Iwata, Takashi Matsumoto[1], Masaki Shintani[2], Atsushi Kouzuma[3], Hisakazu Yamane, Hideaki Nojiri (Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [1]Tokyo University of Agriculture, [2]RIKEN BRC-JCM, [3]Research Center for Advanced Science and Technology)

【目的】接合伝達性プラスミドpCAR1は主に*Pseudomonas* 属を宿主とし，カルバゾール分解能を宿主に付与する．分解能の発現は，pCAR1上にコードされる転写因子AntRが分解遺伝子群（*car*遺伝子群，*ant*遺伝子群）の発現を誘導することで起きる．これまでに*antR* の転写制御には宿主染色体上のCbrA-CbrB二成分制御系のCbrBが宿主共通で必須である可能性が高いことが明らかになっており，基本的な*antR*の予想制御モデルが明らかになりつつある（下図参照）．

ここで，pCAR1が接合伝達性であることを考えると，様々な細菌にpCAR1が保持された際にpCAR1上の遺伝子は等しく発現して，“同等の分解能力”を宿主に与えるのか，ということに興味が持たれる．種々の宿主においてpCAR1上の遺伝子発現を個々に調節する因子の解明は，プラスミドを介した各宿主の環境適応能力やそれに伴うプラスミド進化の違い（プラスミドの振る舞い）といった基礎的な知見だけでなく，微生物による環境浄化を考慮する上で応用的に有用な知見が得られると予想される．本研究では，pCAR1とモデル宿主である*Pseudomonas putida* KT2440株，*Pseudomonas aeruginosa* PAO1株等を材料に，分解遺伝子群の発現を比較検討した．

【方法と結果】分解遺伝子群の発現をみるにあたって，関連するプロモーターの活性を指標とすることにした．はじめにP_{ant}の活性についてPAO1株を用いてレポーターアッセイで解析したところ，pCAR1の有無に関わらず活性がみられたことから，PAO1株が固有に持つ*antR* ホモログの関与が予想された．実際，そのホモログを破壊した株では活性がなくなることから，PAO1株ではデュアルな*antR*の発現制御機構が存在し，KT2440株とはその発現誘導条件および発現量において差がある可能性が示唆された．本大会においては，ODや炭素源等の培養条件を変化させることで，実際にPAO1株とKT2440株における分解遺伝子群の発現にどのような差が表れるかについて報告する．



図．pCAR1における*antR* の基本的な制御モデル

宿主共通でCbrA-CbrB二成分制御系がpCAR1上の*antR*の発現制御に関与している．発現したAntRはさらに下流の分解遺伝子群の発現をP_{ant}を介して制御している．本研究では分解遺伝子群の発現制御につながるP_{antR}あるいはP_{ant}の発現に着目している．

two-component system, plasmid, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

講演番号：3C21p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎21会場

プラスミドを保持した際の宿主の反応の網羅的検出と異なる宿主での反応の比較

Detection of the host responses to plasmid occurrences in three different hosts

○高橋 裕里香[1]、新谷 政己[1,2]、山根 久和[1]、野尻 秀昭[1]（[1]東大生物工学セ、[2]理研BRC-JCM）
○Yurika Takahashi[1], Masaki Shintani[1,2], Hisakazu Yamane[1], Hideaki Nojiri[1] ([1]Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [2]BRC-JCM, RIKEN)

【目的・方法】プラスミドは宿主細菌に新規形質を与えるだけでなく、宿主染色体の転写ネットワークを変化させて宿主自体に由来する形質を変化させることがある。このような変化も含めて、プラスミドを保持することが宿主細胞にどのような変化を与えるのかについて、網羅的解析はこれまでほとんど報告されていない。我々は、カルバゾール分解プラスミドpCAR1（約200 kb）と3種のゲノム既知な宿主*Pseudomonas*属細菌（*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1）を用いて、pCAR1保持株・非保持株のトランスクリプトームと表現型の比較を行うことでプラスミドが宿主に与える影響を網羅的な検出し，比較・分類した.

【結果】タイリングアレイを用いたトランスクリプトーム解析において、pCAR1を保持する際に転写変動する染色体上の遺伝子の数、プラスミド非保持株との混合培養実験におけるpCAR1保持株の割合の減少速度(高瀬ら，2010年本大会)、Phenotype MicroArray (Biolog社)において宿主の呼吸量が変化する培養条件の数はいずれも，pCAR1プラスミドによる変化(負荷)の大きさがKT2440株＞PAO1株＞Pf0-1株の順に大きいことが明らかになった。検出できたプラスミドの影響は，影響を与える因子と宿主の変化によって以下の表のように分類できることが示された.

		Changes in	
		(I) transcriptional network of host cell	**(II) concentration of host materials**
Effects by	**(i) plasmid gene expression**	・ *parA* expression induced *parI* (PP_3700). ・ Expression of NAPs genes (*pmr*, *phu*, *pnd*) on pCAR1 altered host transcriptome. ・	・ **C, H, O, N, S, P** (mRNAs, amino acids, proteins) [plasmid gene expression needs various materials in the host cell] ・ **Fe** [carbazole degrading proteins (*car*) require iron]. ・ **Mg** [Transposases (*tnpAc*, *tnpA1-A4*) require magnesium]
	(ii) chromosome gene expression	・ Alteration of *rpoS* expression changed its regulons.	・ **H^+** [F-type ATP synthase expression (*atp*) may use proton gradients between cell membrane] ・ **Antibiotics, metals** [*mexEF* products and other transporters]
	(iii) changes in the DNA concentration	・ pCAR1 presence required and DNA and RNA polymerase (*pol*, *rpo*), ribosomal proteins (*rps*, *rpl*) and changed their expression. ・ pCAR1 presence may affect amount of NAPs expressed from plasmid and host chromosome resulting in alteration of their regulons. ・ Plasmid presence as a foreign DNA may induce SOS response and transcription of prophage or others?	・ **C, N, O** (nucleotide, phosphate), **Mg** [pCAR1 replication requires nucleotide, phosphate, magnesium, and so on]

plasmid, pCAR1, *Pseudomonas*

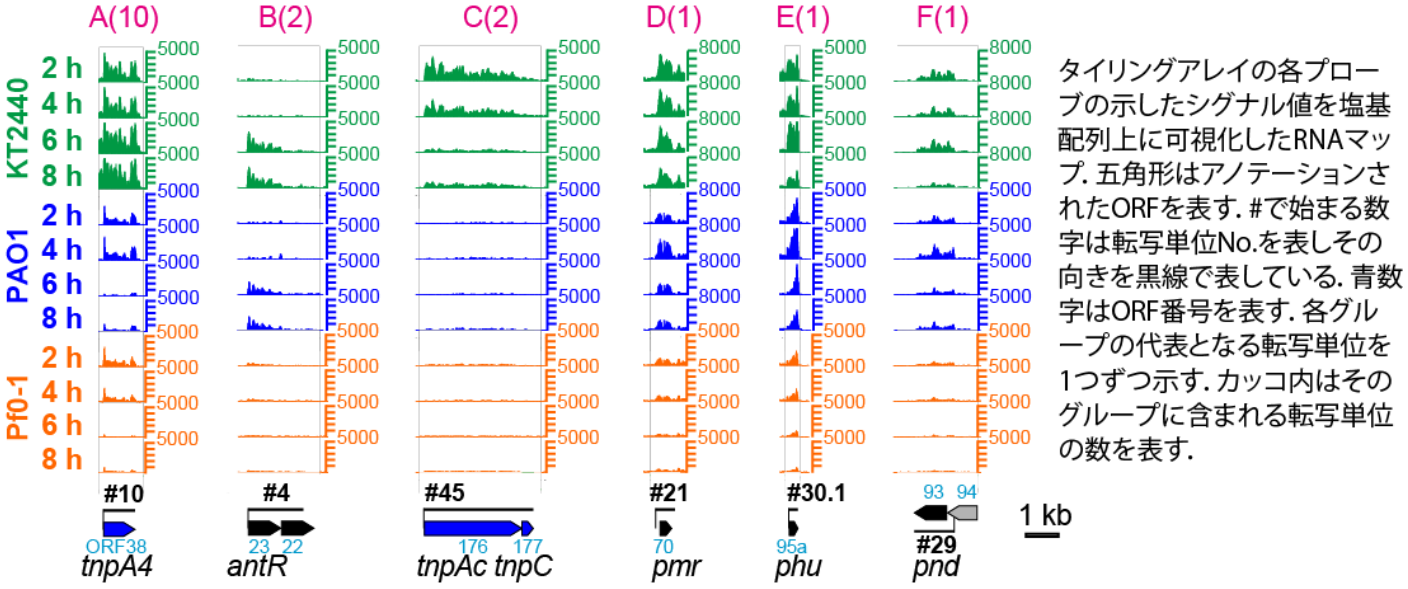
講演番号：3C21p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎21会場

宿主によって異なる転写プロファイルを示すプラスミド上の遺伝子の網羅的検出

Comprehensive detection of the different transcriptional profiles of the genes on pCAR1 among different hosts

高橋 裕里香[1]、新谷 政己[1,2]、山根 久和[1]、○野尻 秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ、[2]理研BRC-JCM）
Yurika Takahashi[1], Masaki Shintani[1,2], Hisakazu Yamane[1], ○Hideaki Nojiri[1] ([1]Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [2]BRC-JCM, RIKEN)

【目的】カルバゾール分解プラスミドpCAR1を保持することによる宿主の変化(負荷)の大きさを3種の*Pseudomonas*属細菌を宿主として比較したところ、*P. putida* KT2440株、*P. aeruginosa* PAO1株、*P. fluorescens* Pf0-1株の順に大きいことが示されている（高橋ら、本大会)。この原因を探る一環として、pCAR1のトランスクリプトームを上記3つの宿主間で比較した。
【方法・結果】コハク酸を唯一の炭素源として各宿主を培養した際の対数期から定常期初期までの4経時点でのpCAR1トランスクリプトームデータを、タイリングアレイ(Affymetrix社)によって取得した。pCAR1上の全74個の転写単位の中で、54個の転写プロファイルは3宿主で共通だったが、17個は宿主によって異なる転写プロファイルを示した。17個の転写単位はプロファイルのパターンによって、 (A)PAO1株とPf0-1株では対数期特異的だがKT2440株では恒常的に転写される、(B)KT2440株とPAO1株では定常期に誘導されるがPf0-1株では誘導が見られない、(C)KT2440株のみで転写が認められる、(D)～(F)宿主ごとに転写が最大となる時期が異なる、の6つのグループに分類された。(D)～(F)は核様体タンパク質をコードする遺伝子であった一方，(A)～(C)にはトランスポゾンや挿入配列のtransposaseやresolvaseが多く含まれており，これらの転写プロファイルの傾向から、KT2440株では転写される転写単位の数が多く転写される時期も長いことがpCAR1を保持した際の負荷が他の株より大きい原因の一つなのではないかと推測された。



タイリングアレイの各プローブの示したシグナル値を塩基配列上に可視化したRNAマップ. 五角形はアノテーションされたORFを表す. #で始まる数字は転写単位No.を表しその向きを黒線で表している. 青数字はORF番号を表す. 各グループの代表となる転写単位を1つずつ示す. カッコ内はそのグループに含まれる転写単位の数を表す.

plasmid, pCAR1, *Pseudomonas*

講演番号：3C21p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎21会場

ナフタレン分解プラスミドNAH7の接合伝達関連遺伝子群のsingle-cellレベルでの発現解析

Single-cell level analysis for expression of conjugation related gene cluster in Naphthalene-catabolic plasmid NAH7

○井上慧、宮崎亮[1]、大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝(東北大院・生命科、[1]ローザンヌ大学)

○Kei Inoue, Ryo Miyazaki[1], Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, and Masataka Tsuda.(Tohoku university, [1]University of Lausanne)

プラスミドの接合伝達は細菌の進化や環境適応に大きく貢献している。ナフタレン分解プラスミドNAH7は主にγ-プロテオバクテリアを宿主とするInc P-9プラスミドである。NAH7は、タイプⅣ分泌装置を介して供与菌から受容菌に伝達されることが知られているが、接合伝達関連遺伝子群の発現制御に関する知見は非常に少ない。細菌の遺伝子発現量を測定する方法として、GFPやLacZを用いたレポーターアッセイ系や、qRT-PCRなどの手法が一般的である。しかしこれらの手法は基本的に細菌集団全体の遺伝子発現量をその平均として測定する手法であり、個々の細胞の発現量を測定することはできない。細菌集団中の個々の細胞の発現量を測定する手法として蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーを用いる方法が有効である。本研究では、NAH7の接合伝達に関連する遺伝子群の発現がいつどの様に励起されるのかを明らかにすることを目的とし、single-cell レベルでの発現解析をおこなった。我々は、以下３つの接合伝達関連遺伝子群のプロモーターに着目した。すなわちPtraD (NAH7の*oriT*近傍に存在し、効率的な接合伝達に必要であることが示唆されている遺伝子群*traDEF*のプロモーター)、Pdtr （接合伝達において中心的役割を担うrelaxaseやcoupling proteinをコードする遺伝子群のプロモーター)、Pmpf (タイプⅣ分泌装置をコードする遺伝子群のプロモーター)の３つである。まず、それぞれに*gfp*遺伝子、もしくは*lacZ*遺伝子を連結したレポーター株を作製し、プロモーター活性を測定した。GFP活性については、上記３種のプロモーターいずれもバックグラウンドレベルの活性であった。一方、LacZ活性については、どのプロモーターも非常に微弱な活性を有しており、中でもPtraDの活性は他のプロモーターと比べると比較的強いことが示唆された。接合時には集団中の一部の細胞でのみプロモーターが強く発現することが考えられたため、次に顕微鏡を用いてsingle-cell レベルでの解析を行った。顕微鏡を用いて、1000～3000 cellsを解析したところ、発現量はおよそ正規分布に近い分布を示し、接合伝達関連遺伝子群の発現量が他の細胞と比べて著しく上昇している細胞を検出することはできなかった。さらに、FACSをもちいて、より多くの細胞（50万cells）を対象として発現が著しく上昇した細胞の検出を試みたが、そのような細胞の検出には至らなかった。以上の結果から、接合伝達関連遺伝子群は、細菌集団中において一部の細胞でのみ発現量が著しく上昇するということはなく、集団中で比較的高いレベルで発現している細胞が接合に預かり、接合伝達関連遺伝子群は接合伝達において微量に発現すれば充分である可能性が考えられた。現在、このような可能性について接合伝達関連遺伝子群の発現調節株を作製し検討中である。

Plasmid, Single-cell, Conjugation

講演番号:3C21p17
講演日時、会場:3月24日17:15～ C校舎21会場

*Pseudomonas*に存在する新しい光センシング機構

A novel photo-sensing mechanism distributed in *Pseudomonas*

○高野 英晃、江淵 鉄平、牟田口 尚敬、新谷 政己[1]、野尻 秀昭[1]、上田 賢志
(日大生資科・生命セ、[1]東大・生物工学セ)
○Hideaki Takano, Teppei Ebuchi, Naotaka Mutaguchi, Masaki Shintani[1], Hideaki Nojiri[1], Kenji Ueda (Nihon Univ., [1]Univ. of Tokyo)

【目的】光センサー型転写調節蛋白質LitRは、ビタミンB_{12}(VB_{12})を光受容分子とする新規なタイプの光センサーであり、それに相同な遺伝子は種を超えて広範な一般細菌群に分布している。高い環境浄化能力で知られるグラム陰性細菌*Pseudomonas putida*は、他の細菌で観察されるようなカロテノイド色素の生産能は示さないが、３つの*litR*様遺伝子(*litR1*・*R2*・*R3*)を有している。このうちの２つにはフラビンを光受容分子とするLOV型光受容体（*sbp1*・*2*）が隣接してコードされている。我々はこれまでに高精度トランスクリプトーム解析によりゲノム上に散在する２１個の遺伝子群（葉酸合成・脂肪酸合成・細胞凝集因子・光回復酵素・ヘム合成など）の発現が光照射によって顕著に誘導されることを明らかにしてきた。本研究では、光誘導性遺伝子群の発現制御におけるLitRホモログ群およびSbp群の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】LitRホモログ群の役割を調べるために、各単独および多重遺伝子破壊株における光誘導性遺伝子群の転写レベルを解析した。単独破壊株と二重破壊株における転写様式は、野生株と同様であった。その一方で、すべてのLitRを欠失させた三重破壊株では、各遺伝子の転写は明・暗の両条件下において構成的であった。この結果は、LitRホモログ群は転写を負に調節するリプレッサー機能を有し、互いの機能を補完し合っていることを示している。

LitRの光感知は、他の細菌と同じくVB_{12}を介して行われることを予想していたが、VB_{12}合成欠損株においても光依存的な転写誘導が認められたことから、本菌のLitRによる光センシングにはVB_{12}以外の因子の関与が示唆された。そこで、Sbp蛋白質群が光センサーとしての機能を担うと予想し解析を進めたところ、各*sbp*遺伝子の単独破壊株は、野生株と同じ程度の光依存的な転写レベルを有していた。その一方で、*sbp1*・*sbp2*二重遺伝子破壊株においては、明・暗両条件下で転写がまったく認められなかった。この結果は、２つのSbp蛋白質が互いに補完しあう機能を有すること、そしてSbp蛋白質が光に応答してLitRの負の転写調節機能を解除するアンチリプレッサーとして作用することを想起させる。

同様の機能をもつLitRおよびSbpホモログが一つのゲノムに複数存在することは、本菌における光応答が多様であること、ならびにそれが菌の生理に大きな影響を及ぼす要因になっていることを暗示している。*litR-sbp*の遺伝子セットは*Pseudomonas*属およびその類縁菌に広く分布していることから、新たな光応答メカニズムが広く関連の細菌群において作動しているものと推測される。

Pseudomonas putida, LitR, photosensor

講演番号：3C21p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ C校舎21会場

H-NS様因子を介したプラスミド-宿主染色体間相互作用の解明

H-NS family proteins mediate interaction between plasmid and host chromosome

○鈴木 千穂[1]、尹 忠鉄[1,2]、堀田 彰一朗[3]、寺田 透[2]、田之倉 優[3]、山根 久和[1]、野尻 秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ、[2]東大院農生科・アグリバイオ、[3]東大院農生科・応生化）

○Chiho Suzuki[1], Choong-Soo Yun[1,2], Shoichiro Horita[3], Tohru Terada[2], Masaru Tanokura[3], Hisakazu Yamane[1], Hideaki Nojiri[1,2] ([1]Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [2]Agricultural Bioinformatics Research Unit, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, [3]Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

【目的】従来、プラスミドは宿主に難分解性物質分解能などの付加的な形質を付与するだけの因子と捉えられてきたが、実際には宿主染色体の遺伝子発現様式を変化させると同時に、プラスミド自身の遺伝子発現様式も宿主ごとに変化し、付与する機能も宿主ごとに変わることが明らかになりつつある。これは、プラスミド由来の因子と宿主染色体由来の因子が協調的に双方の遺伝子発現制御を行うこと、この協調的作用が宿主ごとに変化することで説明できる。近年、この過程にH-NS様因子などの核様体タンパク質が関与することが示唆されている。プラスミドpCAR1上にコードされるPmrと、モデル宿主*Pseudomonas putida* KT2440株の染色体にコードされるTurA、TurBの3つのH-NS様因子は、C末端側で標的遺伝子配列に結合した後、N末端側のタンパク質間相互作用ドメインによりDNA上で多量体化することで遺伝子の転写制御を行うと予想されるため（右図）、これらの因子の機能の仕方や違いを明らかにするためにはDNA結合と多量体化の機構の解明が必要である。本研究ではPmrのホモ多量体形成機構に焦点を当てて解析した。

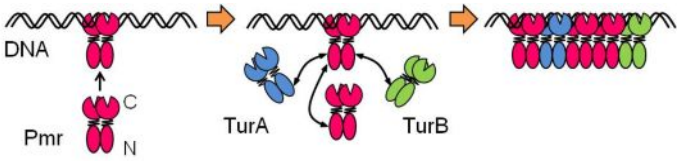


図. 予想される Pmr, TurA, TurB の機能様式

【方法・結果】PmrのN末端側61残基から成るタンパク質間相互作用ドメイン（Pmr_nt）を用いて、モデル構造から多量体形成に関与し得ると予想された分子表面の22残基のアラニン置換体を作製し、各々の多量体形成能をタンパク質間クロスリンク法で評価したところ、7残基が多量体形成に重要であることが明らかとなった。またPmr_ntをさらに削ったPmr_{1-55}がPmr_ntと同様に多量体化すること、DNA結合ドメインへと続くリンカー領域を含むPmr_{1-73}でもPmr_ntで多量体形成能が低下する置換が有効であったことから、Pmrの多量体化にリンカー領域は重要でないことが明らかとなり、Pmrは既知のH-NS様因子とは異なる多量体形成機構を持つことが示唆された。一方、先の7残基の保存性をTurAとTurBで比較したところ、TurAでは6残基が保存されていたのに対し、TurBでは3残基しか保存されていなかったことから、pCAR1と宿主染色体にコードされる両因子間で多量体形成の機構や親和性が異なる可能性が示唆された。表面プラズモン共鳴分析法によってPmr-TurA間、Pmr-TurB間相互作用の親和性と最大結合量を定量した結果もあわせて報告する。

H-NS, nucleoid-associated proteins, plasmid

講演番号:3C21p19
講演日時、会場:3月24日17:37～ C校舎21会場

カルバゾール分解プラスミドpCAR1にコードされる核様体タンパク質のpCAR1の安定性への寄与
Involvement of nucleoide-associated proteins in the stability of pCAR1

○廣谷 龍輔[1]、高瀬 誠之[1]、武田 俊春[1]、鈴木 千穂[1]、尹 忠鉄[1,2]、新谷 政己[1,3]、山根 久和[1]、野尻 秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ、[2]東大院・農生科・アグリバイオ、[3]理研 BRC-JCM）
○Ryusuke Hirotani[1], Noriyuki Takase[1], Toshiharu Takeda[1], Chiho Suzuki[1], Choong-Soo Yun[1,2], Masaki Shintani[1,3], Hisakazu Yamane[1], Hideaki Nojiri[1,2] ([1]Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [2]Agricultural Bioinformatics Research Unit, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, [3]RIKEN, BRC-JCM)

【目的】大腸菌における H-NS に代表される核様体タンパク質(NAPs)は、DNA に結合して核様体という高次構造を作るという性格から、多数の遺伝子の転写を制御する global regulator として働くことが知られている。我々が研究対象とする IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 上には 3 つの NAPs(H-NS 様因子[Pmr]、HU ホモログ[Phu]、NdpA ホモログ[Pnd])がコードされており、プラスミド機能の発現に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。本研究では pCAR1 とその宿主である *Pseudomonas putida* KT2440 株をモデルとして、プラスミドの安定性に関わる機構の解析を行った。

【方法と結果】上記3つのNAPs遺伝子の単独、あるいは二重破壊を施したpCAR1を保持させた*P. putida* KT2440株を、コハク酸を唯一の炭素源とする液体培地で継代培養したところ、対照とした野生型株と単独破壊株では顕著な変化が見られなかったのに対し、*pmr*と*phu*、*pmr*と*pnd*の各二重破壊株では継代培養の日数が経過するにつれてpCAR1の全体、またはカルバゾール資化能に関与する*car*遺伝子群を含む領域が脱落しやすいことが明らかとなった（図参照）。この形質は各二重破壊株に*pmr*を導入することによって相補された。

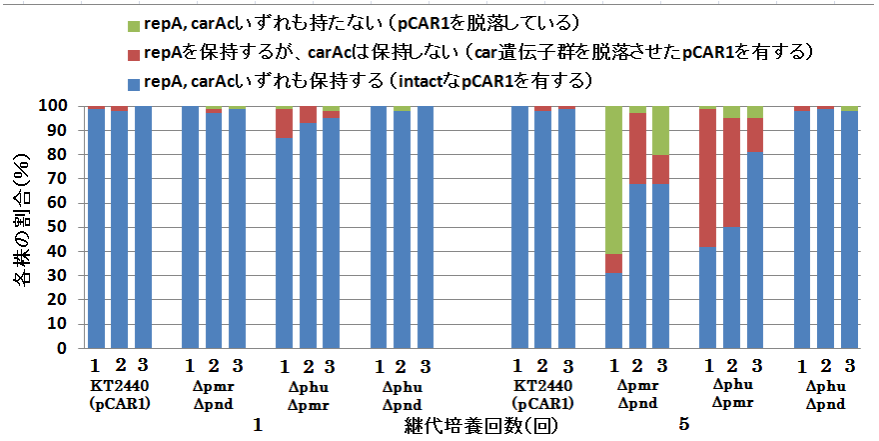


図. pCAR1 安定性試験の結果

一方、上記同培養条件においてこれら破壊株のトランスクリプトーム解析を行ったところ、*pmr*と*pnd*の二重破壊株において、相同組換えに関与し得る因子のうちpCAR1上の*recT*の転写が*pmr*破壊株の2倍以上に増加していた。今後は、相同組み換え関連因子の関与を検討すると共に、継代培養してもプラスミドを安定に保持する抑制変異株を取得・解析することで、二重破壊株で先の表現型が見られる原因を解明する予定である。

plasmid, nucleoide-associated proteins, *Pseudomonas*

講演番号:3C21p20
講演日時、会場:3月24日17:48～ C校舎21会場

IncP-7群プラスミドpCAR1が宿主のバイオフィルム形成に与える影響の解析

Effects of carbazole degradative plasmid pCAR1 on biofilm formation of three *Pseudomonas* strains

○李　昇昱、高橋 裕里香、大浦 啓[1]、山根 久和、野村 暢彦[1]、野尻 秀昭（東大生物工学セ・[1]筑波大院生命環境）

○Seunguk LEE、Yurika TAKAHASHI、Hiromu OURA[1]、Hisakazu YAMANE、Nobuhiko NOMURA[1]、Hideaki NOJIRI（Biotech. Res. Center、Univ. Tokyo、[1] Grand. Sch. Life Env. Sci. Univ. Tsukuba）

【目的】プラスミドは宿主に難分解性物質分解能や多剤耐性能といった新たな形質を付与するだけでなく、宿主染色体機能を直接・間接に制御することも知られている。これらの解析は主に固体培地や試験管といった実験室環境で行われてきた。しかし細菌は環境中では浮遊状態で存在することは少なく、“バイオフィルム”と呼ばれる立体を作って存在することが知られている。バイオフィルム中での宿主細菌の振る舞いにプラスミドが与える影響を解析することは、実環境中でのプラスミドの挙動を知る基盤情報となるが、報告例は非常に少ない。本研究では、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 と 3 種の *Pseudomonas* 属細菌（*P. putida* KT2440 株、*P. aeruginosa* PAO1 株、*P. fluorescens* Pf0-1 株）を用いて、宿主細菌が pCAR1 を保持することで、形成するバイオフィルムの構造に差異が見られるかどうかを解析した。
【結果】pCAR1 を保持する株と保持しない株の形成するバイオフィルムを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。PAO1 株と Pf0-1 株では構造変化は認められなかった一方で、KT2440 株は pCAR1 を保持するとバイオフィルム中の菌体が糸状になる様子が観察された。pCAR1 上には宿主染色体の転写ネットワークを変えうる因子として 3 種の核様体タンパク質（Pmr、 Phu、 Pnd）がコードされているため、pCAR1 保持による KT2440 株菌体の糸状化へのこれらの関与の可能性を 3 つの遺伝子の単独・二重破壊株を用いて評価した。その結果、単独破壊株では顕著な変化は認められなかったものの、Pmr/Phu、Pmr/Pnd の二つの二重破壊株で糸状化の亢進が観察され、この現象に複数種の核様体タンパク質が協調的に関与している事が示された。現在、pCAR1 保持／非保持や遺伝子破壊株のバイオフィルム条件でのトランスクリプトーム解析を行っているので、その結果についても報告する。

biofilm, plasmid, nucleoid-associated proteins

講演番号:3C22a01
講演日時、会場:3月24日09:00～ C校舎22会場

好熱性細菌*Meiothermus ruber* H328株が生産するケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体の構造解析

Structure analysis of macromolecular keratinolytic protease complex produced by *Meiothermus ruber* H328.

○片岡 真亜知[1]、野村 圭史[1]、川崎 一則[2]、茂里 康[2]、渡部 邦彦[1]（[1]京府大院・生命環境、[2]産総研・健康工学）

○Maachi Kataoka[1], Keiji Nomura[1], Kazunori Kawasaki[2], Yasushi Shigeri[2], Kunihiko Watanabe[1] ([1]Grad. Sch., Kyoto Pref. Univ., [2]AIST)

【目的】好熱性細菌*Meiothermus ruber* H328株は、本研究室で有馬温泉から単離され、難分解性タンパク質であるトリ羽毛ケラチンを強力に分解する*。このケラチン分解性細胞外プロテアーゼは、動的光散乱により分子量1.5×10^8 Daと推定される巨大分子複合体を形成する。さらに界面活性剤、有機溶媒等の変性剤に対して非常に高い耐性を示す。この未だ報告例のない驚異的な安定性には、巨大分子複合体の分子構造が関与している可能性がある。そこで、本研究ではこの巨大分子複合体の精製を進めるとともに、電子顕微鏡による構造の解析、ショ糖密度勾配遠心による分離を行った。

【方法】3% (w/v)羽毛含有YS培地 (0.5% yeast extract, 0.5% sucrose, 0.5% $CaCO_3$)、60°C、37 hr振盪培養後の培養液から遠心分離で上清を回収した後、限外濾過 (分画分子量500 kDa)濃縮、ゲル濾過クロマトグラフィー (Sephacryl S-1000, 分画分子量1.0×10^8 Da) によりプロテアーゼ活性画分を分離した。その後、20-60%ショ糖密度で超遠心を行った。得られたサンプルに対しネガティブ染色 (1% 酢酸ウラニル)を行い、透過型電子顕微鏡 (FEI, Tecnai G2F20)による観察を行った。さらに、フリーズ・フラクチャー・レプリカ電子顕微鏡でも観察を行った。

【結果】限外濾過サンプルでは、分子直径約30-40 nmの粒子を中心に、より小さな微粒子から約200-300 nmの大きな粒子まで様々なサイズの粒子が観察された。また、Sephacryl S-1000では、排除容積に溶出される高分子でケラチン分解活性の強い画分 (Peak 1)と、それより低分子のケラチン分解活性の弱い画分 (Peak 2)の2画分が得られた。Peak 1では分子直径30-40 nmの粒子を中心に、より大きいサイズの直径100-400 nmの粒子が多数確認できた。一方で、Peak 2では直径約10 nm以下の小さい粒子のみが確認できた。また、フリーズフラクチャー法による観察では、直径100-300 nmの粒子凝集体が確認でき、membrane vesicles (MV)であることが示唆された。ショ糖密度勾配遠心により分離されたMV画分には、ケラチン分解活性が見られず、これとは別の35-50%画分にケラチン分解活性が見られた。

*_Appl. Microbiol. Biotechnol._ 82,941-950 (2009)

Thermus, complex, protease

講演番号:3C22a02
講演日時、会場:3月24日09:11～ C校舎22会場

Study on proteolytic *Bacillus subtilis* strains and their extracellular protease genes

○Xujun Han[1], Hiroko Nagano[1,2], Tohru Suzuki[1], Hirofumi Yashikawa[3,4], Yuh Shiwa[4]
([1]United.Grad.Sch.Agr.Sci.Gifu Univ, [2]Fac.Edu. Gifu Univ,
[3]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [4]Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric.)

Many extracellular proteolytic enzymes have been purified from *Bacillus* species, and some of them play an important role in food, agriculture and industrial sectors. We isolated *Bacillus subtilis* from Asian fermented foods, which showed high proteolytic activities to different substrates. Nine strains of *B. subtilis* were used to hydrolyze soybean protein 7S and 11S globulin, and a large amount of free amino acid (FAA) was released from hydrolyzed 7S and 11S globulin, giving characteristic FAA profiles. Proteases of different molecular weights, produced by each *B. subtilis* strains, were separated using gelatin zymograpgy. Aligning with the published extracellular proteases sequences from *B. species*, eight extracellular proteases have been identified in our *B. subtilis* strains. AprE, one of the most widely studied extracellular proteases, was selected and aligned with similar AprE sequences from other *B. species* strains. Based on the alignment result, we also compared the sequence and the structural properties.

Bacillus subtilis, protease, gene

講演番号：3C22a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎22会場

Aeromonas sp. JH1 に存在する特異的フィブリン分解酵素の探索

Detection of a unique fibrinolytic enzyme in *Aeromonas* sp. JH1

○朴　正郁[1]、徐　玫貞[1,2]、姜　秉元[1]、鄭　永基[1,2]（[1]東亜大・メディファーム産業化研究事業団、[2]東亜大・生命工）

○Jeong-Uck Park[1], Min-Jeong Seo[1,2], Byoung-Won Kang[1], Yong-Kee Jeong[1,2] ([1,2]Dong-A University)

【Purpose】This study aimed to detect a unique fibrinolytic enzyme in a newly isolated Gram-negative bacterium, *Aeromonas* sp. JH1.

【Methods】A fibrinolytic enzyme from a Gram-negative bacterium, *Aeromonas* sp. JH1 was purified by chromatographic methods, including DEAE Sephadex A-50 ion exchange column chromatography and Sephadex G-75 gel filtration. The enzyme was also biochemically characterized.

【Results】A fibrinolytic enzyme from a Gram-negative bacterium, *Aeromonas* sp. JH1 was purified by chromatographic methods, including DEAE Sephadex A-50 ion exchange column chromatography and Sephadex G-75 gel filtration. The analysis of the purified enzyme on SDS-PAGE and non-denaturing electrophoresis showed that it was a monomer protein and its molecular weight was 36 kDa in size. The optimum pH and temperature of the enzyme were approximately 8.0 and 40°C, respectively. Of note, the enzyme was highly specific for fibrinogen molecules and the hydrolysis rate of fibrinogen subunits was highest for α, β and γ chains in the order. The first 15 amino acids of the N-terminal sequence were X-D-A-T-G-P-G-G-N-V-X-T-G-K-Y, which was distinguishable from other sequences of known fibrinolytic enzymes. Therefore, these results suggest a fibrinolytic enzyme with a potent thrombolytic agent from the *Aeromonas* genus.

Aeromonas sp. JH1, fibrinolytic enzyme, *N*-terminal amino acid sequence

講演番号：3C22a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎22会場

Aspergillus oryzae KexA の機能解析

Functional analysis of KexA in *Aspergillus oryzae*

○冨田 沙耶子、森田 寛人、前田 浩、竹内 道雄、古崎 利紀[1]、石井 一夫[1]、有江 力[1]、山形 洋平 （東農工大院・応生化、東農工大院・農学系ゲノム科学人材育成プログラム）

○Sayako Tomita, Hiroto Morita, Hiroshi Maeda, Michio Takeuchi, Toshinori Kozaki, Kazuo Ishii, Tsutomu Arie, Youhei Yamagata (Tokyo univ. of Agriculture and Technology)

【目的】

全ゲノム解析の結果から 、*Aspergillus oryzae* RIB40 には serine-type carboxypeptidase をコードすると推定される遺伝子が 12 個存在することが示された。アミノ酸配列の相同性から、このうちの一つが *Sacharomyces cerevisiae* の *KEX1* 遺伝子のホモログであるということが推定され、これを *kexA* と名付けた。 Kex1p は *S. cerevisiae* において、ペプチドの C 末端から Lys, Arg を遊離する *exo* 型のプロテアーゼであり、α-フェロモンやキラートキシンのプロセッシング、細胞死等に関与していることが明らかとなっている。一方、*A. oryzae* における KexA の基質特異性は *S. cerevisiae* のものより広いことが明らかとなっている。そこで本研究では *A. oryzae* における KexA の機能を解析することを目的とした。

【方法】

KexA の欠損株、過剰発現株を作製し、表現型観察と転写解析を行った。欠損株は RIB 40 *Δligd* 株をホストに *kexA* 遺伝子を *sC* 遺伝子で置換することにより作製した。過剰発現株はアミラーゼプロモーターと *niaD* 遺伝子を搭載したプラスミド (pAPTLN) を利用し、RIB 40 niaD 300 株を形質転換して作製した。

【結果】

欠損株では分生子形成能の低下が認められ、菌糸が直線状に伸長しているのが観察された。一方，過剰発現株では成育の遅れ、特に、細胞壁キチンに結合し成育を阻害する Calcofluor White を添加した培地において著しい成育阻害が認められた。対して、細胞壁グルカンに結合し成育を阻害する Congo Red に対する感受性は、欠損株、過剰発現株ともにコントロール株と比較して差が認められなかった。また、過剰発現株では菌糸の多分岐や脆弱化が観察された。以上のことから， KexA は *A. oryzae* において細胞壁関連タンパク質、その中でもキチン関連タンパク質の制御に関与していると考えられた。

KexA 欠損株の網羅的な転写解析の結果、欠損株において 17 個存在すると推定されているキチナーゼ遺伝子のうち、 2 つのキチナーゼ遺伝子の転写量が大幅に減少していることが明らかとなった。このことから KexA がキチンの代謝に関わっていることが示唆された。

なお本研究の一部は生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである

Aspergillus oryzae, processing enzyme, transcirptome

講演番号：3C22a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ C校舎22会場

黄麹菌 serine-type carboxypeptidase の *Aspergillus nidulans* における高分泌化の解析

Serine-type carboxypeptidases from *Aspergillus oryzae* hyper secretion in *Aspergillus nidulans*

○佐野 和紀、森田 寛人、前田 浩、山形 洋平、竹内 道雄（東農工大院・応生化）
○Kazunori Sano, Hiroto Morita, Hirosi Maeda, Youhei Yamagata, Michio Takeuchi (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の全ゲノム解析によって明らかとなった 12 種類の serine-type carboxypeptidases（ CPase ）のうち、 10 種の CPase は signal peptide を有する酵素であることが示唆された。これらの CPase 遺伝子を *Aspergillus nidulans* を宿主として異種発現したところ、菌体外に高分泌型のものと低分泌型のものが存在した。アミノ酸配列の比較により、差異の明らかな N 末端 5 アミノ酸に注目し、高分泌型 CPase である TA4 の N 末端 5 アミノ酸に低分泌型 CPase である TA11 、TA12 、TA13 の N 末端アミノ酸配列を置き換えるように構築した遺伝子を用い、*A. nidulans* を形質転換し、形質転換体の CPase 分泌量の違いを解析することにより、CPase の N 末端アミノ酸配列の機能を解明することを目的とした。

【方法】解析はタンパク質の 2 次構造予測ソフトを用いた解析と、実際の形質転換体作製による解析の 2つをおこなった。タンパク質の 2 次構造予測は、 Chou-Fasman 法でおこなった。形質転換体の作製は、まず低分泌型 CPase TA11 、 TA12 、 TA13 の N 末端 5 アミノ酸を高分泌型 CPase の TA4 の N 末端 5 アミノ酸配列に置換（ 4-11 、 4-12 、 4-13 ）するように設計した遺伝子カセット、および低分泌型 CPase である TA13 の signal peptide を TA4 の signal peptide に置換（ 4-13 wh ）するように設計した遺伝子カセットを PCR により作製した。各遺伝子カセットを改良型 *amyB* プロモーターを有する pIE227cs3 プラスミドに挿入した発現用プラスミドで *A. nidulans* A89 をプロトプラスト-PEG 法により形質転換した。得られた形質転換体を、starch による誘導条件下で 5 日間培養し、培養上清の SDS-PAGE 、western blot 、および CPase 活性測定をおこなった。また、形質転換体のゲノム DNA を抽出し挿入遺伝子のコピー数を Southern blot 、Real-Time PCR により解析した。さらに、挿入した遺伝子からの RNA の転写量を Real-Time PCR により解析した。

【結果】各変異酵素の 2 次構造予測により、 TA4 の N 末端 5 アミノ酸に置換した TA13（4-13）のみが N 末端側の 2 次構造が変化して、高分泌 CPase である TA4 および TA6 の 2 次構造と類似することが明らかになった。実際に構築した形質転換体では、置換前の TA13 と比べて、 4-13 で誘導培養後の培養上清に活性型 TA13 が高分泌されていた。また 4-13 、4-13 wh 、4-11 、4-12 形質転換体において、マルチコピーで低分泌 CPase 遺伝子が挿入され、転写量も増大していることが明らかになった。

なお、本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環としておこなわれたものである。

Aspergillus oryzae , signal peptide , heterogous expression

講演番号:3C22a06
講演日時、会場:3月24日10:05～ C校舎22会場

大腸菌RNase GのmRNA切断部位の認識について

Does the *E. coli* RNase G recognize the mRNA cleavage site?

○伊藤和敬、浜崎孝信、柏森綾、グエンフンアンティ、和地正明（東工大院・生命理工・生物プロセス）
○Kazutaka Ito, Koushin Hamasaki, Aya Kayamori, Phuong Anh Thi Nguyen, Masaaki Wachi (Dept. of Bioeng, Tokyo Inst. of Tech.)

【背景】大腸菌のエンド型リボヌクレアーゼの一種であるRNase Gは、16S rRNAの成熟に関与する他、アルコールデヒドロゲナーゼ（AdhE）やエノラーゼをはじめとする主要な糖代謝酵素の発現量を制御することが知られている。RNase G変異株ではこれらのmRNAの半減期が増大し、タンパク質発現が増加する。中でもAdhEはRNase G変異株において非常に高い発現を示す。*adhE* mRNAの5’末端側非翻訳領域（5’ UTR)を*lacZ*に融合した*adhE-lacZ*融合遺伝子でもRNaseG変異株において過剰発現が見られたことから、RNase Gは*adhE* mRNAの5’ UTRを認識しmRNAを切断することが予想された。これまでの研究で5’ UTRに様々な欠失を持つ*adhE-lacZ*融合遺伝子を持ったプラスミドが構築され、RNase Gが*adhE* mRNAの－145～－125領域を認識していることが示唆されている。またプライマー伸長法によりRNaseGは*adhE* mRNAの－18と－19の間（翻訳開始コドンのAを＋1とする）を切断することが明らかとなった。

【目的】RNase Gが*adhE* mRNAの5’ UTR依存的に分解を行う際に、切断点前後の配列を認識しているか否かを明らかにすることを目的とした。

【方法】RNase Gの切断点前後の－18部位、－19部位及びその両方に変異を導入した5’UTRを持つ*adhE-lacZ*融合遺伝子を構築し、RNaseGが切断点の配列を認識しているかを調べた。変異プラスミドを野生株とRNaseG欠損株に導入し、AdhE-LacZタンパク質の発現量を比較した。またそれぞれの切断点変異型*adhE-lacZ*融合mRNAのRNase Gによる切断点をプライマー伸長法によって確認した。

【結果】いずれの変異プラスミドにおいても野生型プラスミドと同様にRNaseG欠損株でのみAdhE-LacZタンパク質過剰発現が認められた。またプライマー伸長法により、切断点変異の有無にかかわらず、*adhE-lacZ*融合mRNAも*adhE* mRNAと同様に－18と－19の間をRNase Gによって切断されることが示された。このことから、RNaseGは*adhE*の切断点前後の配列を認識していないことが示唆された。
これらの結果から、タンパク質発現系に利用する際には、*adhE* 5’ UTRの全長は必要とせず、RNaseG認識領域さえあれば良いことが示唆された。

RNase G, *adhE*, mRNA

講演番号：3C22a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎22会場

海洋性光合成細菌によるshort hairpin RNAの菌体外生産とRNAプロセシング

Extracellular production and processing of short hairpin RNA by the marine phototrophic bacterium

○長尾 信義、鈴木 宏道、梅影 創、沼野 利佳[1]、菊池 洋（豊橋技科大・工、[1]豊橋技科大・エレクトロニクス先端融合研究所）

○Nobuyoshi Nagao, Hiromichi Suzuki, So Umekage, Rika Numano[1], Yo Kikuchi (Dept. of Environmental and Life Sciences, Toyohashi Tech., [1]EIIRIS Toyohashi Tech.)

【目的】菌体外へ自身の核酸を放出し、それを能動的に利用する現象が様々な細菌において報告されている。その中で、海洋性光合成細菌*Rhodovulum sulfidophilum*は、培養液中に自身の核酸を放出する細菌として知られている。我々は、本菌の培養液中のRNA分解酵素活性が著しく低いこと、および、そのため培養液中に放出されたRNAが比較的安定に存在できるということを見出した。さらに遺伝子工学的に改変した本菌を用い、RNAアプタマーの菌体外生産に世界で初めて成功した。(Suzuki *et al.* 2010, 2011)。このような微生物を用いたRNA生産は、従来の有機合成を主流とするRNA合成法よりも低コストかつ簡便な手法となることが期待される。本年会においては、本菌を用いたshort hairpin RNA（shRNA）の生産について報告する。またこれらの人工的ヘアピン構造が、本菌によりプロセシングを受けていることが示されたので合わせて報告する。

【方法】本菌由来の*rrn*プロモーター配列、shRNA配列、*puf*ターミネーター配列を組み込んだプラスミドDNAを作製し、本菌に導入した。この菌株を好気明条件で培養した後、菌体内および菌体外のトータルRNAを調製した。それぞれのトータルRNAについてノーザンハイブリダイゼーションを行い、プラスミドDNAから転写され生産されたshRNAのプロセシング部位等の解析を行った。次に、プライマー伸長法を用いて菌体内に存在しているshRNAのプロセシング部位を解析した。

【結果】ノーザンハイブリダイゼーションにより、転写されたshRNAは菌体内でプロセシングを受け、複数のフラグメントに分断されていることが示された。また、プライマー伸長法によって、主要なプロセシング部位はステム中にあることが示され、本菌が持つ二本鎖特異的なRNA分解酵素がプロセシングに関わっている可能性が示唆された。これらのフラグメントはその大小に関わらず、菌体外へ放出されていることも確認された。菌体外へ放出されたshRNAフラグメントは培養時間とともに増加する傾向にあり、培養液中で安定に存在していることが示された。以上のことから、本菌を用いたshRNAの生産を行うためには、このプロセシング機構の抑制あるいは目的の部位で切断が起こるようなshRNA発現系のデザインが必要であると思われる。

Suzuki *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 786 (2010)
Suzuki *et al. J. Biosci. Bioeng.* **112**, 458 (2011)

RNA production, *Rhodovulum sulfidophilum*, short hairpin RNA

講演番号：3C22a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ C校舎22会場

紅色非硫黄性細菌*Rhodobacter capsulatus*を用いた機能性RNA生産法の開発
Functional RNA production by *Rhodobacter capsulatus*

○横田　哲朗、藤田　能亘、鈴木　宏道、長尾　信義、梅影　創、菊池　洋（豊橋技科大・環境・生命工学）
○Tetsuro Yokota, Yoshinobu Fujita, Hiromichi Suzuki, Nobuyoshi Nagao, So Umekage, Yo Kikuchi (Toyohashi Tech.)

【目的】近年RNAアプタマー、リボザイム、siRNAなどが、その多様な機能をいかした用途へ応用されようとしている。しかし現在、これら機能性RNAの合成は化学合成または酵素合成により行われており、コスト、簡便さの点で多くの問題を抱えている。より安価かつ簡便なRNA生産法として、微生物を用いた手法が考えられる。海洋性光合成細菌*Rhodovulum sulfidophilum*は、自身の核酸を菌体外へ放出すること、および培養液中のヌクレアーゼ活性が著しく低いという特性を持つ。我々は*Rdv. sulfidophilum*を利用し、RNAアプタマーの菌体外生産に成功している（1）。さらに、菌体外RNA生産量の増加を目指し、我々は*Rdv. sulfidophilum*の近縁種である*Rhodobacter capsulatus* B10S-T7株（2）を用いた菌体外RNA生産を検討している。本年会においては、本菌株における菌体外RNA生産について報告する。
【方法】*Rba. capsulatus* B10S株の菌体外核酸生産能を検証するために、培養上清を回収し、菌体外核酸生産の有無を確認した。また培養上清に*in vitro*合成したRNAを投入し、RNAの分解挙動を追跡することで、培養液中のヌクレアーゼ活性を評価した。ゲノムにT7 RNAポリメラーゼ遺伝子が組み込まれた*Rba. capsulatus* B10S-T7株とT7プロモーターをもつRNAアプタマー発現プラスミドによる人工RNAの生産をノーザンブロット法等で解析した。
【結果】*Rba. capsulatus*は*Rdv. sulfidophilum*と同様に、内在性核酸を放出することが示された。*Rba. capsulatus*の培養液中には*Rdv. sulfidophilum*の場合と異なり、ヌクレアーゼ活性がわずかに確認された。T7 RNAポリメラーゼ遺伝子が組み込まれた*Rba. capsulatus* B10S-T7株にストレプトアビジンRNAアプタマー発現プラスミドを導入することにより、菌体外へのストレプトアビジンRNAアプタマーの生産に成功した。生産量は、最大で1.21 μg/L-cultreであった。これは*Rdv. sulfidophilum*における最大生産量の約6倍であった。以上のことから、*Rba. capsulatus*は機能性RNA生産に有用であることが示された。今後この系を改良することで、さらなる菌体外RNA生産量の増大につながると考えられる。

（1） Suzuki, H.*et al. Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 786 (2010)
（2） N. Katzke *et al. Protein Expr. Purif.* **69**, 137 (2010)

Rhodobacter capsulatus, T7 RNA polymerase gene, streptavidin RNA aptamer

講演番号：3C22a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎22会場

細胞性粘菌における新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素SteelyAの機能解析

Functional analysis of SteelyA, a novel hybrid type polyketide synthase in *Dictyostelium discoideum*

○成田　隆明、森田　直樹[1]、齊藤　玉緒[2]（上智大院・理工、[1]産総研・生物プロセス、[2]上智大・理工）

○Takaaki Narita, Naoki Morita[1], Tamao Saito[2] (Sophia University, [1]AIST, [2]Sophia University)

【目的】Steely酵素とはI型とIII型のポリケタイド合成酵素 (PKS)が融合した新規ハイブリッド型酵素であり、細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*で初めて発見された。このSteely酵素は、それまで別個と考えられていた酵素が融合した独自の構造を持っているため、新規有用物質の開発やコンビナトリアル生合成への応用などが期待されている。また、Steely酵素は細菌・植物以外で初めて発見されたIII型PKSであり、*D. discoideum*が持つIII型PKSはSteely酵素のみである。細胞性粘菌ではポリケタイドが発生・分化を制御していると考えられており、2種類存在するSteely酵素のうち、SteelyBは柄細胞分化誘導因子DIF-1 (Differentiation inducing factor-1)を合成していることが明らかとなっている。しかし、本研究の対象であるSteelyAはこれまで解析があまり進んでいなかった。そこで、SteelyAも発生・分化を制御しているのではないかと考え、本研究ではSteelyAの*in vivo*産物とその機能解析を行うことを目的とした。

【方法】野生株 (Ax2)とSteelyA遺伝子破壊株 (*stlA*$^-$株)を用いて、SteelyAの*in vivo*産物の解析を行った。さらに*stlA*$^-$株の表現型を観察し、その欠損がSteelyAの産物を加えることで回復するのか検証した。

【結果】Ax2と*stlA*$^-$株が細胞外に放出している疎水性物質を分析、比較した結果、*stlA*$^-$株では4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol (MPBD)が検出されなかった。*stlA*$^-$株の表現型の観察を行った結果、*stlA*$^-$株は成熟胞子細胞をほとんど形成できないことがわかった。*stlA*$^-$株の成熟胞子細胞の割合は、Ax2に比べわずか20%程度であった。しかしこの欠損はMPBDを加えることで回復した。このことから、SteelyAは*in vivo*でMPBDを合成し、この物質は成熟胞子細胞の形成を誘導していると結論付けた。

　また、*stlA*$^-$株はAx2に比べて細胞集合の開始が遅れ、さらにAx2に比べ小さな多細胞体を形成する様子が観察された。Ax2の細胞はcyclic adenosine monophosphate (cAMP)に対する走化性を示したが、*stlA*$^-$株はAx2に比べcAMPに対する走化性が低下していた。しかし、この走化性に関する欠損もまた、MPBDを加えることで回復した。このことから、MPBDは胞子成熟を誘導する物質であると同時に、走化性調節因子である可能性が示唆された。以上より、*D. discoideum*においてMPBDは発生初期にcAMPに対する走化性を、発生後期に胞子成熟を別々に制御している物質であると考えられる。

polyketide, Steely, *Dictyostelium*

講演番号:3C22a10
講演日時、会場:3月24日10:49～ C校舎22会場

ビフィズス菌のGalacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose phosphorylaseの発現を誘導する糖質源の検討

Investigation of sugar sources for the expression of galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose phosphorylase in bifidobacteria

○清原 正志、川上 真理子、中井 博之、西本 完、北岡 本光（農研機構・食総研）
○ Masashi Kiyohara, Mariko Kawakami, Hiroyuki Nakai, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka(NFRI, NARO)

【目的】乳幼児の腸管に生息するビフィズス菌種に対する特異的な増殖因子として期待される二糖ラクト-*N*-ビオース Ⅰ（LNB）の製造には、sucrose phosphorylase、UDP-glucose 4-epimerase、UDP-glucose-hexose 1-phosphate urydylyltransferase 、 galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose phosphorylase（GLNBP）の4種類の酵素が用いられる。食品としてのLNBの用途開発を考えると、当初は組み換え酵素でなく元の酵素生産菌の培養により得られる酵素を利用することが望ましい。ビフィズス菌は、これらの4酵素すべてを保持している点、およびそれ以外のGLNBP生産菌の大部分が病原性菌を含む種である点から、理想的な酵素源と考えられる。しかしながら、4種類の酵素の中でGLNBP活性が合成のボトルネックとなっており、本酵素の発現量を改善することが課題となっている。本研究では、GLNBPの発現条件を最適化することを目的として、ビフィズス菌の培養時に用いる糖質源の種類とGLNBPの生産量について検討を行った。
【方法】*Bifidobacterium breve* JCM1192株、*B. longum* JCM1217株および*B. bifidum* JCM1254株を被検菌とし、まず、14種の異なる糖質をそれぞれ単一の糖質源とした培地における資化性を評価した。資化性を示した糖質のうち、良好な増殖を示した糖質について、これらを糖質源として培養した菌体から無細胞抽出液を調製し、我々が以前に報告したワンポット比色定量法[1]を用いてGLNBP活性を評価した。
【結果】*B. longum* JCM1217株は、グルコース（Glc）で培養した場合においてほとんどGLNBP活性が検出されず、また、その他の資化可能な糖質でも若干の酵素活性がみとめられる程度であったが、LNBおよびガラクト-*N*-ビオース（GNB）で培養した場合においては顕著に高い酵素活性を示した。*B. breve* JCM1192株では、Glcで培養した場合においてわずかなGLNBP活性がみとめられ、その他の資化可能な糖質でも若干の酵素活性が検出されたが、*B. longum* JCM1217株と同様に、LNBおよびGNBで培養した場合に顕著に酵素活性が増加した。一方で、*B. bifidum* JCM1254株はGlcで培養した場合において高いGLNBP活性が検出され、LNBあるいはGNBで培養した場合では、さらに酵素活性が増加した。これらの結果から、LNBまたはGNBを糖質源として培養した場合に特異的にGLNBPの発現が誘導されることが明らかとなり、*B. bifidum* 以外の2菌種でGLNBPの生産を行う際には、糖質源としてLNBもしくはGNBが必要であると考えられる。

1. Nihira *et al.*, *Anal. Biochem.*, **371**, 259 (2007)

Bifidobacterium, lacto-*N*-biose I, galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose phosphorylase

講演番号:3C22a11
講演日時、会場:3月24日11:10～ C校舎22会場

Bifidobacterium のハチミツ構成糖の利用性およびフラクトオリゴ糖分解酵素生産

The honey-sugar utilization of *Bifidobacterium*, and fructooligosaccharides hydrolase production

○村松 圭、鎌塚 心和子、小野寺 秀一、上野 敬司、塩見 徳夫、菊地 政則（酪農大・食品科学）
○Kei Muramatsu, Miwako Kamatsuka, Syuich Onodera, Keiji Ueno, Norio Shiomi, Masanori Kikuchi (Rakuno Univ., Food Science)

【目的】すでに我々はハチミツおよびイミテーションハチミツ（模造ハチミツ, Imitation honey）を添加した培地で*Bifidobacterium*を培養し菌体内に高い1-KestoseおよびNystose分解活性を示すことを報告した。今回、*Bifidobacterium*がハチミツに含まれている糖をどのように資化利用しているのかを明らかにするため、ハチミツを添加して培養した際の糖成分の変化を分析し、さらに得られた菌体内のフラクトオリゴ糖分解酵素活性についても調べた。また分析によって得られたハチミツの糖含量からイミテーションハチミツを調製し、同様に*Bifidobacterium*を培養して、ハチミツで培養した結果と比較した。

【方法】ハチミツで培養した際、菌の増殖および酵素生産能の高かった*B. bifidum* JCM1255を、ハチミツおよびそのイミテーションを1%量になるよう添加したBL培地を用いて培養し、8、12、16、20、24、36時間ごとに菌の増殖（培養液濁度 650nm）および菌体内酵素生産、すなわちショ糖、1-KestoseおよびNystose分解活性（U/ml）を調べた。ハチミツに含まれる主要構成糖、果糖、ブドウ糖、マルトース、ショ糖量の変化はHPLCにより分析した。またイミテーションの糖組成はハチミツを分析した結果より培地１L当たり果糖:5.11g、ブドウ糖 :4.3g、マルトース:0.36g、ショ糖:0.21g、グルコン酸:0.02gとした。

【結果】菌の増殖はハチミツおよびイミテーションの両方とも良好であった。培養液中の果糖およびブドウ糖の濃度は、培養36時間後まで穏やかに減少したが、最終濃度がハチミツでブドウ糖2.8mg/ml, 果糖1.45mg/ml、イミテーションでブドウ糖2.53mg/ml, 果糖1.73mg/mlであり、ブドウ糖が40-50%, 果糖が65-70%利用されず残存していることが確認された。一方マルトースは、培養8時間後にはハチミツで20μg/ml、イミテーションで42μg/mlと急激に減少し、ほとんど利用されていた。ショ糖、1-Kestose、Nystose分解活性は、両者とも培養8時間後で最大を示し、 ハチミツで1.47U/ml(ショ糖)、24.2U/ml(1-Kestose)、19.2U/ml(Nystose)、イミテーションで1.07U/ml(ショ糖)、26.2U/ml(1-Kestose)、20.0U/ml(Nystose)でありフラクトオリゴ糖分解酵素は高いがハチミツとイミテーションに差はなかった。今後マルトースのみで培養した際に、今回のような高い糖の利用およびフラクトオリゴ糖生産がみられるかを検討したい。

Bifidobacterium, honey, 1-kestose

講演番号：3C22a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ C校舎22会場

タイトル　リボゾーム工学により育種したサイクロデキストラン合成酵素生産菌の解析

Title　Anlysis of the cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase (CITase) producing strain *Bacillus circulans* T-3040 improved by ribosome-engineering

田中　幸徳[1,2]、舟根 和美[2]、保坂　毅[3]、稲岡　隆史[2]、○越智　幸三[1,2]（[1]広島工大、[2]農研機構食総研、[3]信州大・若手拠点）

Yukinori Tanaka[1,2], Kazumi Funane[2], Takeshi Hosaka[3], Takashi Inaoka[2], ○ Kozo Ochi[1,2] ([1]Hiroshima Inst. Technol., [2]NARO-NFRI, [3]Shinshu University)

【目的】我々は既にリボゾーム工学により*B. circulans* T-3040株のサイクロデキストラン合成酵素(CITase)生産力を野生株の1100倍まで増加させたことを報告している(2008年度農芸化学会)。本研究では、育種株のCITaseコード遺伝子の転写、プロモーター領域の解析、リボゾームのタンパク質合成活性を評価し、CITase高生産力のメカニズム解明を試みた。

【方法及び結果】低レベルストレプトマイシン耐性変異*rsmG*、高レベルストレプトマイシン耐性変異*rpsL*、リファンピシン耐性変異*rpoB*の三変異を逐次的に導入した。次に、野生株と三段変異株を用いて、対数増殖期と定常期におけるCITase遺伝子の転写をリアルタイム定量PCRにて解析した。その結果、三段育種株は強力にCITase遺伝子の転写が増加していることを見出した。また、プライマー伸長法により、転写開始点を決定した。SDS-PAGEで確認した結果、三段育種株ではCITaseが強力に発現していた。対数増殖期のリボゾームを精製し*in vitro*のタンパク質合成活性を評価した結果、リボゾームタンパク質S12に変異が入ることにより、タンパク質合成活性が増加することを明らかにした。すなわち、リボゾーム工学により育種した株は、転写と翻訳の両面で活性化されていることが明らかになった。

本研究は、生研センターイノベーション創出事業のもとで行われた。

CITase, ribosome-engineering, improvement

講演番号：3C22a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ C校舎22会場

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のペクチンメチルエステラーゼ A, B に関する研究

Study on pectin methylesterase A, B in *Aspergillus luchuensis*

○水谷治、柿薗ダララット、高橋徹、山田修（酒総研）
○Osamu Mizutani, Dararat Kakizono, Toru Takahashi, Osamu Yamada (NRIB)

【目的】　焼酎製造において、官能的に必須な香気成分ばかりでなく、メタノールのように望まない成分も微量であるが生成することがある。特に原料に芋を用いて焼酎を製造した場合に、メタノールを含むことが経験上知られている。焼酎のメタノール濃度について、わが国の食品衛生法では製品あたり 1 mg/cm^{3}未満とされており、問題となっていないが、台湾の輸入基準では 100% エタノールあたり 1,000 mg/L 以下と設定されており、芋焼酎においては輸出ができない場合も想定され、解決しなければならない問題となっている。メタノールは、エタノールと近い性質から蒸留等の工程による除去は難しく、現状では醸造工程で生産しないことが最善の方策と考えられる。現在のところ、焼酎麹菌由来の酵素により原料中ペクチンを基質として、メタノールが生成されるとする見方が有力である。

近年、黒麹菌 （*A. luchuensis*） のゲノム解析が当研究所も参加した産官学連携で行われ、黒麹菌の研究プラットホームが整いつつある。そこで本研究では、黒麹菌のゲノムを利用して、メタノール生成に関与する酵素について調査し、その諸性質を明らかにする事を目的とした。

【結果】　メタノールは、原料に含まれるペクチンを基質として焼酎麹菌のペクチンメチルエステラーゼ (PME) の関与よって生成すると想定されている [(1)]。そこで、*A. luchuensis* のゲノムデータベースより PME 遺伝子を探索した所、*Aspergillus oryzae* の PME (PmeA) と相同性を示す 3 つの遺伝子が見出され、それぞれ *pmeA, pmeB, pmeC* と命名した。これらの遺伝子を *A. oryzae* を用いて強制発現させたところ、PmeA, PmeB に関してペクチンからメタノールを生成する活性が観察された。現在、PmeA, PmeB の諸性質を検討中である。また、製麹中の PME 活性及び遺伝子発現についても報告する。

(1) 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告 (2007) No. 52 p. 85-88

Aspergillus luchuensis, Pectin methylesterase, Methanol

講演番号：3C22a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ C校舎22会場

N-アセチルスクロサミンの酵素合成及び諸性質について

Enzymatic synthesis and the characterization of *N*-Acetylsucrosamine

○和田 徹[1]、重網 麻依[2]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）

○Toru Wada[1]、Mai Juami[2]、Takako Hirano[2]、Wataru Hakamata[1,2]、Toshiyuki Nishio[1,2]（[1]Graduate School of Bioresource Sciences,Nihon Univ.、[2]Dept. Chem. and Life Sci., Bioresource Sciences. Nihon Univ.）

【目的】キチンを構成している*N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）は美肌効果や変形関節炎の予防や改善といった生理機能が動物試験で報告されている。また、人の母乳中には*N*-アセチルスクロサミン、ラクト*N*-ビオースⅠのようなGlcNAcを含むオリゴ糖や*N*-アセチルガラクトサミンを含むオリゴ糖が含まれている。このようなオリゴ糖は病原菌の細胞付着を阻害する効果がある。以上のことからGlcNAc含有オリゴ糖には生理機能が期待される。そこで、GlcNAc含有オリゴ糖の開発を試みた。

*Aspergillus oryzae*は糖転移活性が高いβ-フルクトフラノシダーゼを細胞壁に含むことが知られている。そこで、*A. oryzae*を全細胞触媒として使用し、GlcNAcとスクロースの高濃度溶液中で作用させたところ、GlcNAcとフルクトースからなる*N*-アセチルスクロサミンが合成された。本研究で使用した*A. oryzae*には二種類のβ-フルクトフラノシダーゼあり、どちらの酵素が本オリゴ糖合成に関与しているかを調査した。また、本オリゴ糖をグラムスケールで製造し、物理的性質の調査、構造類似体であるスクロースとの熱・pHに対する安定性の比較、種々のスクロース分解酵素を用いてスクロースと本オリゴ糖の分解性の比較を行った。

【方法・結果】*A. oryzae*をセライトとスクロース含有培地で培養を行った。培養後、冷アセトンで洗浄し溶媒を留去させ、セライト-乾燥菌糸を調製した。これを全細胞触媒として用い、10%スクロース、19.4%GlcNAcを含むバッファー100 mlに乾燥重量で700 mgのセライト-乾燥菌糸を添加し、30℃で反応を行った。*N*-アセチルスクロサミンの精製は活性炭カラム、中圧カラムを用いて行った。スクロース換算での本オリゴ糖の収率は約22%だった。本オリゴ糖は非常に結晶性が悪く、また、水に対する溶解性が非常に高かった。様々な温度とpHで1時間インキュベーションした結果、本オリゴ糖はスクロースよりも熱や酸に対して安定なオリゴ糖であることが明らかとなった。また、種々のスクロース分解酵素を、1%のスクロースと本オリゴ糖溶液に添加して、30℃で反応を行った。その結果、本オリゴ糖はスクロースと比較して非常に反応性が低かった。

酵素の精製はセライト-乾燥菌糸にYatalase処理を行い、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィーにより精製を行った。その結果、二種類のβ-フルクトフラノシダーゼが存在していた。これを別々に回収し10%スクロース、19.4%GlcNAcのバッファー溶液に添加し反応を行ったところ、片方の酵素のみが本オリゴ糖合成に関与していることが明らかとなった。

Aspergillus oryzae, β-fructofuranosidase, *N*-acetylsucrosamine

講演番号：3C22a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ C校舎22会場

*Aspergillus oryzae*乾燥菌糸を全細胞触媒として用いた*N*-アセチルスクロサミンの連続生産法の検討

Continuous production of *N*-acetylsucrosamine using dried *Aspergillus oryzae* mycelia as a whole-cell catalyst

○佐藤　仁[1], 横地　佐江子[2], 平野　貴子[2], 袴田　航[1,2], 西尾　俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用, [2]日大生資科・生命化）

○Hitoshi Sato[1], Saeko Yokochi[2], Takako Hirano[2], Wataru Hakamata[1,2], Toshiyuki Nishio[1,2]（[1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci., Bioresource Sciences. Nihon Univ.）

【目的】*N*-アセチルスクロサミン（NAS）に関する物性と生理活性を調べるためには、本オリゴ糖量産化のための方法論を確立する必要がある。

そこで、糖転移作用を示すβ-フルクトフラノシダーゼを含む*Aspergillus*属細菌の乾燥菌糸を充填したカラムリアクターを作成し、これを利用した連続反応による効率的な生産法について検討することとした。なお、これまでの乾燥菌糸の担体にはセライトが用いられていたが、乾燥菌糸とセライトの複合体ではカラム充填および通液時の圧力に耐えられる機械的強度がないため、この点を満たす新たな担体の選定も必要となった。

また、この連続生産によって得られた反応液からのNASの簡易精製法についても検討した。

【方法】乾燥菌糸の担体には、菌糸の着床性や軽量さなどを考慮し、ビーズ状の発泡性真珠岩（パーライト）を利用した。半固相培養あるいは液体培養によって生育したβ-フルクトフラノシダーゼ含有*Aspergillus*菌糸を乾燥処理し、パーライトビーズの表面に固定化した。この固定化乾燥菌糸をカラム（φ2.5×18 cm）に詰め、それに10%スクロースと20%*N*-アセチルグルコサミンを含む緩衝液を通液（約75 mL/day）してNAS生成の連続反応を行なった。

また、反応液からのNAS精製は、副生成物であるフルクトオリゴ糖を酵母由来のインベルターゼを用いて分解した後、活性炭カラムを用いて5%イソプロパノール溶出にて行った。

【結果】半固相培養による菌糸には糖転移活性は認められず、液体培養によって生育した菌糸のみが糖転移活性を示しNASを生産した。このため、液体培養によって得られた乾燥菌糸をパーライトビーズに固定化してカラムリアクターに充填し、これを用いて連続反応を行ったところ、30日間にわたって安定的に約30 mg/mLのNASを含む溶液を得ることができた。

活性炭カラム通液の前にインベルターゼを作用させることにより、副生成物であるフルクトオリゴ糖は単糖にまで分解されたが、NASはインベルターゼでは加水分解されなかった。これにより、反応液中には活性炭に吸着されるNASと吸着されない単糖が残ったため、活性炭カラムのみでNASを高純度に精製することができた。

N-acetylsucrosamine, whole-cell catalyst, bioreactor

講演番号:3C22p02
講演日時、会場:3月24日14:00～ C校舎22会場

タイトル 異なる培養条件での*Ruminococcus albus* F40のタンパク質の解析
Title Proteins Produced by *Ruminococcus albus* F40 under Different Conditions
○笠井 美帆、苅田 修一[1]（三重大院・地域イノベ）
○Miho Kasai, Shuichi Karita (Grad. Regional Innov. Mie Univ.)

【目的】
牛などの草食動物の消化器官であるルーメン内に生息する微生物は、これらのセルロース繊維の分解に特化している。*Ruminococcus albus*は、ルーメンにおいて最も効率的にセルロース繊維を分解する微生物の一つとして知られている。*R. albus* のセルロース分解メカニズムを明らかにすることは、セルロース繊維をバイオ燃料や他の化学物質などへ、より効率的に変換する過程において役立つと考えられる。
本研究では、異なる培地条件で*R. albus* F-40株を培養した場合、タンパク質の発現にどのような変化があるのか、MALDI-TOF/TOF質量分析計を用いて解析を行った。
【方法】
R. albus F-40株を異なる培地にて、37℃の嫌気条件下で培養した。培地条件：GS改変培地(炭素源:セロビオースとボールミルドセルロース(BMC)/単独または混合)。*R. albus* F-40株の培養液を遠心分離し、その上清を回収した。この培養上清を10mMリン酸カリウム緩衝液(KPB、pH7.0)で透析した後、凍結乾燥した。凍結乾燥した試料を2D-PAGEまたはSDS-PAGEのサンプルとして調製し、それぞれの試料を2D-PAGEまたはSDS-PAGEに供した。電気泳動後、ゲルをクマシーブルーで染色した後、タンパク質バンドを切り出した。切り出したタンパク質バンドをトリプシン消化し、ペプチドを生成した。ペプチド化した試料を、脱塩チップで脱塩し、濃縮した。脱塩・濃縮した試料をマトリックス溶液と混合し、MALDI-TOF用サンプルプレートにプレーティングした。
【結果】
炭素源の異なる培地条件で*R. albus* F-40株を培養した時、タンパク質の発現パターンに違いが生じた。このことから、炭素条件が*R. albus* F-40株の機能性タンパク質の発現パターンに影響を与えることがわかった。
それぞれの培養条件で特異的なタンパク質バンドについて、MALDI-TOF/TOF質量分析計を用いて解析を行った。炭素源をセロビオースまたはBMC単独とした場合、いくつかのタンパク質バンドにおいて、ファミリー9セルラーゼ (GH9)、ファミリー3糖質結合モジュール、フィブロネクチンタイプⅢドメイン、ファミリー6糖質結合モジュール、ファミリー26マンナナーゼ、ファミリー48エキソ-セルラーゼ(GH48)、ファミリー11キシラナーゼ、ファミリー22糖質結合モジュールなどの*R. albus*由来のセルロース分解性タンパク質との相同性を示した。

rumen bacteria, cellulase, MALDI-TOF/TOF mass spectrometry

講演番号：3C22p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ C校舎22会場

エンドグルカナーゼ分泌生産型放線菌を用いたセルロースからの有用タンパク質生産

Useful protein production from cellulose using endo-glucanase expressing Streptomyces lividans

○河井禎文[1]、野田修平[2]、田中勉[2]、荻野千秋[2]、近藤昭彦[2]（[1]神戸大・工、[2]神戸大院・工）
○Yoshihumi Kawai[1], Shuhei Noda[2], Tsutomu Tanaka[2], Chiaki Ogino[2], Akihiko Kondo[2]
([1]Eng.,Kobe Univ, [2]Grad.Sch.Eng.,Kobe Univ.)

【目的】近年、石油資源の枯渇、地球温暖化などからの脱却を目指した循環型社会の構築に向けて、微生物を用いたバイオマス資源からの有用物質生産が注目されている。

放線菌*Streptomyces*属は、『異種タンパク質を大量分泌生産できる』、『バイオマス糖化酵素を多数保持している』という２つの特徴がある。このような特徴から、放線菌を用いたバイオマス資源から直接の有用物質生産に関する研究が、近年注目されている。本研究においては、セルロース糖化に必須であるエンドグルカナーゼを分泌生産する放線菌の創製を行い、セルロースから直接の有用タンパク質生産系の構築を目指した。

【方法】本研究では、有用タンパク質として、*Streptomyces cinnamoneus*由来トランスグルタミナーゼ採用し、エンドグルカナーゼの候補としては、ホストとして用いる*S. lividans*由来のもの及び、中度高熱性放線菌である*Thermobifida fusca*由来のものを数種類ずつ選択した。トランスグルタミナーゼをコードした遺伝子はpIJ101由来のマルチコピー型ベクターにより導入、エンドグルカナーゼ遺伝子については染色体組み込みにより導入を試み、2種類の遺伝子の共発現を検討した。

【結果】*S. lividans*で発現可能な数種類のエンドグルカナーゼ遺伝子の探索に成功した。さらに、エンドグルカナーゼ遺伝子とトランスグルタミナーゼ遺伝子を共発現する菌体の創製に成功し、現在、セルロースから直接のトランスグルタミナーゼ生産を検討しているところである。

Endo-glucanase, Transglutaminase, Cellulose

講演番号：3C22p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎22会場

Bacillus circulans KA-304 由来α-1,3-グルカナーゼの基質結合ドメインの解析

Characterization of α-1,3-glucan binding domains of α-1,3-glucanase from *Bacillus circulans* KA-304

○ Suyotha Wasana、矢野　成和、立木　隆、若山　守（立命館大生命・生工）
○ Wasana Suyotha 、Shigekazu Yano, Takashi Tachiki, Mamoru Wakayama
（Dept. Biotech, Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ.）

【目的】*B. circulans* KA-304は、*Schizophyllum commune*細胞壁標品を誘導炭素源とした時、α-1, 3-グルカナーゼを生産する。本α-1, 3-グルカナーゼは、*S. commune*菌糸の分解に寄与する[1)]。本酵素は、N-末端から、Discoidin ドメインI（DS1）、Carbohydrate binding Module 6型ドメイン（CB6）、Discoidin ドメインII（DS2）、機能未知ドメイン（CARDB）、触媒ドメインから構成されているが、個々のドメインのα-1,3-グルカン分解活性に関わる役割は分かっていない。前報では、DS1、CB6、DS2の欠失酵素を作成し、加水分解活性、およびα-1,3-グルカン結合活性を比較した。そして、欠失酵素のα-1, 3-グルカン分解活性が低下すること、さらに、α-1,3-グルカン結合活性も低下することを報告した[2)]。本報では、DS1、CB6、DS2の機能を解析するために、Green fluorescent protein（GFP）融合タンパク質を作成し、α-1,3-グルカン、β-1,3-グルカン、キチン、および*S. commune*菌糸への結合性を調べた。

【方法】GFP融合タンパク質であるDS1-GFP、CB6-GFP、DS2-GFPは、pETベクター系を用いて、*Escherichia coli* Rosseta-gami（DE3）で発現させた。各種GFP融合タンパク質は、DEAE-cellulofine A-500 とButyl-TOYOPEARL 650Mを用いて精製した。不溶性基質結合活性は、基質（１％）とGFP融合タンパク質（2 nmol/ml）を4℃で1時間保ち、遠心分離後の上清に残されたタンパク質量より算出した。*S. commune*菌糸を用いる場合は、菌糸（0.1 mg/ml）を基質とし、蛍光顕微鏡で観察した。

【結果】DS1-GFP、CB6-GFP、DS2-GFPのα-1,3-グルカンに対する結合率を測定したところ、それぞれ、約53%、72%、49%が結合した。β-1,3-グルカンとキチンへの結合率も測定したが、結合活性は認められなかった。なお、GFPのみでは、これらの基質に結合しなかった。本結果は、DS1、CB6、DS2が、それぞれがα-1,3-グルカン結合能を有すること、また、α-1,3-グルカンに対する基質特異性を有することを示唆している。次いで、各種GFP融合タンパク質の*S. commune*菌糸に対する結合能を解析したが、ほとんど結合しなかった。この結果から、DS1、CB6、DS2が複合効果によって菌糸に結合していることが予測できる。これを明らかにするために、融合タンパク質DS1CB6-GFP、CB6DS2-GFP、DS1CB6DS2-GFPを作成し、不溶性α-1,3-グルカンや糸状菌菌糸に対する結合能を解析した。

1) Yano, S., Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 1976-82 (2003).
2) 2010年農芸化学会大会講演要旨集p.201

α-1,3-Glucanase, Discoidin domain, Carbohydrate binding Module family 6

講演番号：3C22p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ C校舎22会場

Clostridium cellulovoransが生産するセルロソーム骨格タンパク質CbpBの機能解析

Characterization of the cellulosomal scaffolding protein CbpB from *Clostridium cellulovorans*.

○中島 大地[1]、永野 彰彦[1]、森坂 裕信[2]、黒田 浩一[2]、植田 充美[2]、田丸 浩[1]、三宅 英雄[1]（[1]三重大院生資、[2]京大院農・応用生命）

○Daichi Nakajima[1], Akihiko Nagano[1], Hironobu Morisaka[2], Kouichi Kuroda[2], Ueda Hiromi[2], Yutaka Tamaru[1], Hideo Miyake[1]（[1]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Biores., Mie Univ., [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.）

【目的】*Clostridium cellulovorans*は、骨格タンパク質に糖質関連酵素などが結合した「セルロソーム」と呼ばれる超タンパク質複合体を生産し、セルロース系バイオマスを効率よく分解する。 C. cellulovoransは、セルロソームを構成するための骨格タンパク質としてCbpAだけでなく、新規骨格タンパク質としてCbpBも発現することを明らかにした。そこで本研究では、CbpBのセルロソーム骨格タンパク質としての機能解析を行った。

【方法・結果】CbpBは、N末端に糖質結合モジュール(CBM)とC末端にドックリンを含むタンパク質と結合することができるコヘシンドメインを一つ持つ。CbpBのセルロースに対する結合力を評価したところ、CbpAのCBMと同程度の結合力を示した。また、*C. cellulovorans*由来でドックリンを含むXynBを作製し、CbpBとXynBの相互作用解析としてプルダウンアッセイを行ったところ、XynBはCbpBに結合することが確認された。以上の結果から、*C. cellulovorans*は、CbpBをベースに最小のセルロソームを生産することが明らかになった。

Clostridium cellulovorans, cellulosome, scaffoiding protein

講演番号:3C22p06
講演日時、会場:3月24日14:44～ C校舎22会場

枯草菌ゲノムベクターシステムを利用したミニセルロソームの構築

Architecture of minicellulosome using a *Bacillus subtilis* genome vector systems

○中山薫[1]、原裕一[1]、松岡聡[2]、吉川博文[1](東京農大・応生科・バイオ[1]、埼玉大・理・分子生物[2])

○Kaoru Nakayama[1], Yuichi Hara[1], Satoshi Matsuoka[2], Hirofumi Yoshikawa[1] (Dept. Biosci, Tokyo Univ. Agric.[1], Dept. Mol. Biol, Saitama Univ.[2])

地球上に多量に存在する再生可能な有機化合物の一つがセルロースである。セルロースはグルコースが多数連結した高分子であるので、分解すれば燃料や高付加価値の物質へと変換可能である。しかし、分解し難いという問題点がある。そこで嫌気性微生物が形成し、高いセルロース分解能を示すセルロソームと呼ばれる高分子セルラーゼ複合体が注目されている。セルロソームはエンドグルカナーゼやエキソセロビオヒドラーゼなど分解様式の異なる酵素サブユニットを含みセルロースを効率的に分解する。また、枯草菌ゲノムベクターシステムとは、枯草菌の高い形質転換能を利用し、ゲノム中に外来DNAを導入するシステムである。このシステムは最終的なクローニングサイズにほぼ制限がないため巨大な異種遺伝子群の発現ベクターとしての利用が可能である。そこで、本研究では枯草菌ゲノムベクターへのセルロソーム遺伝子群のクローニングによるミニセルロソームの構築を試みた。セルロソーム生産菌 *Clostridium cellulovorans*、*Clostridium thermocellum* 由来のセルロソーム関連遺伝子群のうち、骨格タンパク質、エンドグルカナーゼ、エキソセロビオヒドラーゼなどのコード遺伝子を枯草菌ゲノムに集積し、*Clostridium cellulovorans*、*Clostridium thermocellum* 由来のミニセルロソームを構築した。現在、可溶性セルロース（CMC)、結晶性セルロース（Avicel）の分解を指標とし、構築したミニセルロソームの評価を行っている。また、セルロソームは酵素の持つドックリンドメインと骨格タンパク質のコヘシンドメインの相互作用により形成される。コヘシンとドックリンの相互作用は種特異的であることが報告されている。このコヘシンとドックリンの相互作用の種特異性を利用し、枯草菌ゲノムベクターシステムを用いて *Clostridium cellulovorans*、*Clostridium thermocellum* 由来のセルロソームを組み合わせた人工セルロソームの構築を目指している。*Clostirium cellulovorans* 由来骨格タンパク質（セルロース結合ドメインと type Ⅰ コヘシンドメインを含む）に *Clostridium thermocellum* 由来 type Ⅰ コヘシンドメインを結合させたキメラ骨格タンパク質の作製と、構築したキメラ骨格タンパク質を用いた人工セルロソームの構築ついても報告する。

Bacillus subtilis, Cellulosome, Genetic engineering

講演番号：3C22p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎22会場

セルラーゼ複合体を応用したエチレン生産系の構築

Construction and analysis of chimeric enzyme complex for ethylene production

○神藤定生、伊藤ユキ*、松田隆之介*、細田晃文*、田村廣人*（名城大理工、*名城大農）

○ Sadanari Jindou, Yuki Ito, Ryunosuke Matsuda, Akifumi Hosoda, Hiroto Tamura (Meijodai)

セルロース分解性嫌気性菌は“セルロソーム”を形成し、バイオマスの分解効率を高めている。本研究は、その形成に必須であるコヘシン(Coh)-ドックリン(Doc)結合を応用したエチレン合成人工酵素複合体の構築を試みた。トマト由来1-アミノ-1-シクロプロパンカルボン酸（ACC）酸化酵素およびACC合成酵素をそれぞれPCR法で増幅させ、結合特異性が異なるDoc遺伝子とキメラ化した。また、骨格タンパク質(Cip2)は、2種類の結合特異性の異なるCohをキメラ化させ構築した。得られたPCR産物を発現用ベクターに導入し、大腸菌で発現・精製を行った。キメラサブユニットとCip2の複合体形成は、ゲル濾過カラム、およびNative-PAGEで確認した。酵素活性試験は、S-アデノシル-L-メチオニン(SAM)を基質に用い測定した。結果、酵素複合体化により最大2.5倍のエチレン合成能向上を確認した。

講演番号：3C22p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎22会場

タイトル　低温倍数化処理によるシイタケ菌体の微結晶セルロース分解力の向上

Title　Enhancement of the degrading ability of micro-crystalline cellulose in the mycelia of *Lentinula edodes* by autopolyploidization under lower temperature conditions

○外山　英男（南九大・健）
○Hideo Toyama (Nankyudai)

【目的】　シイタケは南九州地方の代表的な特産物の一つであり、高付加価値化により更に存在価値を高める必要がある。演者はこれまでに、シイタケ菌体の低温倍数化処理によりシイタケの高増殖株を構築することに成功した。今回は、生産性の更なる向上につながることが期待されるシイタケの微結晶セルロース分解力の向上を同方法で試みたので報告する。

【方法】　実験にはモデル株として、*Lentinula edodes* IFO 30724 株を使用した。
この株を寒天平板培地上で増殖させた後、菌体を切り取り、同質倍数化用液体培地に加え低温下で倍数化処理を行った。処理後、処理菌体と元株菌体を微結晶セルロース含有寒天培地上において２６℃で培養後、５０℃で一定時間加熱し、プレート中の微結晶セルロースの分解度合いを裏面から観察・比較した。菌体中の核状況の観察にはギームザ液とDAPI液を使用した。

【結果】　使用した微結晶セルロース分解力評価用寒天培地に加えた微結晶セルロースの濃度はそれぞれ、1.0%, 0.5%, 0.1%であった。また、加熱前はプレート裏面は均一な白色の状態にあった。加熱後、低温倍数化処理した菌体は、微結晶セルロース培地の白色部を減少させ、0.1%の場合には白色の培地が半透明化した。しかし、元株菌体では、これらのプレートの白色部を減少させることはできなかった。この「白色部の減少」は微結晶セルロースの分解によると考えられるので、低温倍数化処理した菌体では微結晶セルロース分解力が向上していると考えられた。菌体核染色の結果、低温倍数化処理菌体中には元株よりも大型の核、すなわち倍数核が存在していることが判明した。以上の結果から、同方法でシイタケの微結晶セルロース分解力を向上させることが可能であると結論した。

参考文献：外山英男　「有糸分裂阻害剤を用いたシイタケ高増殖性菌体の構築」
南九州大学研究報告自然科学編　第40A号（2010）p87-90.

Lentinula edodees, cellulase, cellulose

講演番号：3C22p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎22会場

可溶性炭素源を用いた*Trichoderma reesei*の連続フィード培養による細胞壁分解酵素の生産制御

Controlled preparation of cell-wall degrading enzymes from *Trichoderma reesei* using continuous feeding strategies of soluble sugar mixture

○池　正和、田伏　美峰、徳安　健（農研機構・食総研）
○Masakazu Ike, Mine Tabuse, Ken Tokuyasu (NFRI, NARO)

【目的】

繊維質原料からのエタノール製造工程においては、糖化酵素のコストが実用化に向けた大きな障壁となっており、糖化酵素の低コスト生産技術開発が強く求められている。繊維質基質の効率的分解に必要となる糖化酵素は、原料の種類や前処理法によって異なってくる。我々は、異なる原料・前処理法に応じた糖化酵素を効率的に生産するため、*Trichoderma reesei* による生産酵素組成比を制御した糖化酵素生産システムの構築を目指している。これまでに、*T. reesei* 変異株を用い、主要炭素源としてグルコース（Glc）、セルラーゼ誘導物質としてセロビオース（C2）の２種混合液での連続フィード培養によるセルラーゼ大量生産について報告している[1)]。本研究では、可溶性炭素源を用いた連続フィード培養による、*T. reesei* セルラーゼ生産時におけるヘミセルラーゼ活性生産量制御を目的とした。

【方法・結果】

グルコース存在下でも効率的なセルラーゼ生産が可能な *T. reesei* 変異株を用いて、① Glc + C2（基本条件）、② Glc + キシロース（Xyl）+ C2 および ③ Glc + Xyl + アラビノース（Ara）+ C2 の可溶性糖質混合液を連続的に添加しつつ培養を行い、酵素生産特性を評価した。基本条件①と比較して、②および③では、セルラーゼ生産性は僅かに低下したものの、キシラナーゼ・β-キシロシダーゼ活性が大きく増加した。さらに③ではα-L-アラビノフラノシダーゼ活性も顕著に高かった。これらの結果から、Glc + C2 を基本として、Xyl や Ara を加えることで、ヘミセルラーゼ活性量の調節が可能であることが示唆された。そこで、フィード液として①および②を用い、Ａ：全期間①、Ｂ：前半①→後半②、Ｃ．全期間②の３種のフィード様式で培養を行ったところ、生産酵素のヘミセルラーゼ/セルラーゼ比は、Ｃ→Ｂ→Ａの順で高かった。この結果は、フィード液の糖組成、添加時期などをコントロールした連続フィード培養で、生産酵素のヘミセルラーゼ活性量の制御が可能であることを示唆している。

尚、本研究は、農林水産省「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発（BEC-A250）」によるものである。

1) Ike et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.(2010)87:2059-2066

Cellulase, *Trichoderma reesei*, Enzyme production

講演番号：3C22p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎22会場

Trichoderma 属のセルラーゼと相乗作用を示す放線菌由来キシラナーゼの遺伝子クローニングと発現

Cloning and expression of the gene encoding an actinomycete xylanase showing synergistic action with celluclast from *Trichoderma*

○吉本　結香、谷　修治、炭谷　順一、川口　剛司（阪府大院・生環科）
○Yuka YOSHIMOTO, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI （Grad Sch Life & Env Sci, Osaka Pref Univ）

【目的】*Trichoderma reesei* は最強のセルラーゼを生産する菌株として注目されているが、ヘミセルラーゼ活性の低さや単糖生成力の低さなど、天然基質の分解においてはいくつかの問題点が指摘されている。一方、放線菌は自然界において難分解性有機物の分解に深く関わっていることが知られており、多様な糖質分解酵素遺伝子を保有していることも明らかにされている。我々は、以前、土壌サンプルより *Trichoderma* 属由来のセルラーゼ剤（Celluclast）と相乗的な稲わら分解作用を示す酵素を生産する放線菌のスクリーニングを行った。その結果得られた放線菌（*Streptomyces* sp. No.465 株）から相乗作用を示す酵素の同定を試みたところ、キシラナーゼ（Xyn465A）がその要因であることが確認された。本研究では、Xyn465A がどのようなキシラナーゼであるかを明らかにするために、その遺伝子クローニングと発現を試みた。
【方法と結果】N末端アミノ酸配列をもとに相同性検索を行った結果、Xyn465A は放線菌由来 GH family 11 に分類されるキシラナーゼと相同性があることがわかった。そこで、放線菌由来 GH 11 キシラナーゼの保存領域を基に、常法によって Xyn465A 遺伝子を含む約 8 kb の *Sac*Ⅰ 断片を得た。シークエンス解析の結果、Xyn465A のN末端 20 アミノ酸と完全に一致する配列が確認されたことから、Xyn465A は 40 アミノ酸からなるシグナルペプチドを含む前駆体タンパク質として合成されることが明らかとなった。成熟型 Xyn465A の分子量は約 21000 と計算されたが、No.465 株由来精製酵素の SDS-PAGE 解析では、計算値より少し大きく、分子量約 23000 のタンパク質として検出された。同属である *Streptomyces* 属由来の GH 11キシラナーゼとは 80% 以上の高い相同性を示し、また、周辺配列の解析結果から、この Xyn465A 遺伝子がアセチルキシランエステラーゼ（Axe465A）をコードする遺伝子とオペロンを形成していることも明らかとなった。放線菌発現プラスミド pSEV１のプロモーター下流に SD 配列を含む Xyn465A 遺伝子全長を挿入したコンストラクトを構築後、プロトプラスト PEG 法によって *S.lividans* を形質転換し、 Xyn465A 遺伝子の発現を試みた。その結果、コントロール株に比べて高いキシラナーゼ活性を持つ形質転換体が取得できたが、Xyn465A の生産性はあまり高くなかった。現在、*E. coli* での発現を検討中である。

Xylanase, cloning, expression

講演番号：3C22p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ C校舎22会場

Prevotella copri のキシラナーゼ Xyn10Aの酵素の性質および発現解析

Characterization and expression analysis of xylanase Xyn10A from *Prevotella copri*

○田中 芳貴，田中 裕興，對馬 裕誠，林 秀謙（前工大・工）
○Yoshiki Tanaka, Hiroki Tanaka, Yusei Tsushima, Hidenori Hayashi (Maebashi Inst. of Tech.)

【目的】食物繊維は消化、吸収を受けることなく大腸に達し、大腸内細菌のキシラナーゼなどの糖質加水分解酵素の分解を受け、短鎖脂肪酸に変換される。短鎖脂肪酸の一つである酪酸は発ガン、炎症性腸疾患の抑制、腸管上皮細胞の発達と代謝に重要な役割を果たしている。ヒトの腸内より分離された*Prevotella copri*は高頻度に存在する腸内細菌の一つであり、そのゲノム配列の決定がなされ、食物繊維分解に関与する酵素遺伝子が多数存在していた。本研究は*P. copri*のキシラン分解に関与するキシラナーゼ Xyn10Aについて報告する。
【方法】*P. copri*よりゲノムDNAの抽出を行い、ファミリー10に属するキシラナーゼxyn10AをPCRにより増幅した。*xyn10A*遺伝子を大腸菌で発現させ、精製酵素の至適pH,至適温度,熱安定性,pH安定性,基質特異性の酵素特性を調べた。さらに、TLCによるXyn10Aのキシロオリゴ糖分解産物の測定を行った。キシラン、キシロース、グルコースおよびセロビオースのそれぞれの炭素源で培養した菌体を回収し、活性染色を行った。同様に４つの炭素源で培養した*P. copri*よりmRNAを抽出し、RT-PCRより*xyn10A*の発現解析を行った。
【結果および考察】Xyn10Aは374アミノ酸の単一のファミリー10の触媒ドメインからなる。精製したXyn10Aは分子量42,000 Daであり、推定されるシグナル配列を切断した分子量と一致した。至適pHは5.5、至適温度は37℃、熱安定性は50℃まで100％の活性を示し、55℃で酵素活性が半減した。pH安定性はpH5～10で100％の安定性を示した。キシランに対する比活性は96U/mgであった。Xyn10Aはキシラン、CMC、PNPCを加水分解したが、CMC、PNPCに対しては低い活性であった。PNPG、PNPXに対しては活性を示さなかった。キシラン以外の基質に活性を示すのは、ファミリー10に属するキシラナーゼの特徴であり、その性質と一致した。TLCの解析の結果、X3以上の鎖長のキシロオリゴ糖をX2,X1に分解し、X2に対しては作用しなかった。キシラン、キシロース、グルコースおよびセロビオースを炭素源として*P. copri*を培養し、活性染色を行ったところ、キシラン、セロビオースではXyn10Aと同じ分子量42,000Daに強い活性のあるバンドが認められた。一方、グルコース、キシロースにおいてはキシランとセロビオースと比べ、活性が弱かった。また、*P. copri*よりmRNAを抽出し、RT-PCRで発現解析を行った。キシラン、セロビオースで培養したものにおいて*xyn10A*の増幅が見られ、*xyn10A*が発現していることがわかった。しかし、グルコース、キシロースで培養したものにおいては、発現量が少なかった。これら二つの結果から、キシロースおよびグルコースを炭素源とした培養では*P. copri*の*xyn10A*の発現に何らかの制御がかかっているのではないかと考えられる。

Prevotella copri, xylanase,

講演番号:3C22p12
講演日時、会場:3月24日16:10～ C校舎22会場

*Agrobacterium tumefaciens*由来キヌクリジノン還元酵素の高活性に関する構造基盤

Structure basis on the high activity of a 3-quinuclidinone reductase from *Agrobacterium tumefaciens*

○侯 峰[1]・宮川拓也[1]・片岡道彦[2,3]・熊代祥子[3]・竹下大二郎[1]・永田宏次[1]・清水 昌[3,4]・田之倉 優[1]
([1]東大院・農生科、[2]阪府大院・生命環境、[3]京大院・農、[4]京都学園大・バイオ環境)
○Feng Hou[1], Takuya Miyakawa[1], Michihiko Kataoka[2,3], Shohko Kumashiro[3], Daijiro Takeshita[1], Koji Nagata[1], Sakayu Shimizu[3,4], Masaru Tanokura[1]([1]The University of Tokyo, [2]Osaka Prefecture University, [3]Kyoto University, [4]Kyoto Gakuen University)

医薬品市場における光学活性体（キラル化合物）の需要は極めて高く、日本で2000年から2002年に上市された医薬品の67%がキラル化合物であり、その84%が単一の鏡像異性体である。化学合成によってつくられたキラル化合物から鏡像異性体を分離することは技術的には困難な場合が多く、キラル化合物の不斉合成技術が医薬品合成にとって必須となっている。カルボニル還元酵素の１つであるキヌクリジノン還元酵素はNAD(P)H依存的にキヌクリジノンの3位のカルボニル基を還元し、(*R*)-3-キヌクリジノールを生成する酵素である。反応産物(*R*)-3-キヌクリジノールは気管支拡張剤、向認知症薬などの薬剤の原材料として利用されている。キヌクリジノン還元酵素として、*Agrobacterium tumefaciens*由来のNADH要求型還元酵素AtQRと*Rhodotorula rubra*由来のNADPH要求型還元酵素RrQRがこれまでに同定されている。これら2種類の酵素は、同等の立体選択性をもつが、補酵素要求性が異なる。また、AtQRの基質に対する親和性は、RrQRの100倍高いことが分かっている。本研究はAtQRとRrQRの補酵素要求性と基質に対する親和性の違いに関する構造基盤を解析することを目的とした。

X線結晶構造解析により、2.0 Å分解能でAtQRの構造を決定した。AtQRのAsp40はアデノシン部分のリボース環に水素結合することにより、2'-位にリン酸基の入る空間が無く、NADH要求性を獲得していることが分かった。また、NADHは8番目のαヘリックス上のArg196およびGln194と水素結合しており、補酵素の結合によりAtQRの構造が安定化すると考えられる。一方、基質選択性に関して、3-キヌクリジノンのカルボニル基と水素結合を形成するRrQRのSer残基がAtQRにおいては保存されておらず、代わりにGlu197が触媒部位に存在しており、この残基が基質に対する親和性の違いに寄与している可能性が考えられた。Glu197をAlaに置換した変異体では活性が全く失われた。基質の結合様式を考慮するとGlu197は、3-キヌクリジノンの3級アミンの認識に関わり、基質の親和性に大きく寄与していると考えられる。

X-ray crystallography, quinuclidinone reductase, Structure

講演番号：3C22p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎22会場

好熱菌*Geobacillus kaustophilus*由来L-グルタミン酸合成酵素が持つ新規色素依存性L-グルタミン酸脱水素活性の機能解析

Functional analysis of novel dye-linked L-glutamate dehydrogenase activity of L-glutamate synthase from *Geobacillus kaustophilus*

○黒木 俊行、松川 博昭[1]、大森 勇門[1]、若松 泰介[1]、土居 克実[1]、大島 敏久[1]（九大院・生資環、[1]九大院・農）

○Toshiyuki Kuroki, Hiroaki Matsukawa[1], Taketo Ohmori[1], Taisuke Wakamatsu[1], Katsumi Doi[1], Toshihisa Ohshima[1] (Grad. Sch. Biore. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [1]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

【目的】色素依存性脱水素酵素は、人工の酸化還元色素を電子受容体とする酵素ファミリーであり、一般に生体膜中にある電子伝達系への基質からの電子の取込みに機能する。このファミリーの酵素は、人工色素をメディエータとして、基質からの電子を電極へ導入できるので、バイオセンサーや酵素電池の反応素子としての産業的利用が期待できる。我々は、新規グルタミン酸センサー、グルタミン酸電池の開発のために、安定性の高い新規色素依存性 L-グルタミン酸脱水素酵素（dye-GDH）の好熱菌における検索を行い、好熱菌 *Bacillus* sp. DSM 406 と 405 の細胞抽出液に新規 dye-GDH 活性を見出した。本研究では、この新規 dye-GDH の詳細な機能解析を行うことを主な目的とした。

【方法と結果】まず、好熱菌 *Bacillus* sp. DSM 406 の細胞抽出液から、各種カラムクロマトグラフィーにより dye-GDH の精製を行い、得られた高度精製標品の SDS 電気泳動後に検出された複数のタンパク質バンドを抽出し、N-末端アミノ酸配列の決定を行った。それらの配列のデータベースによる相同性探索から、最も移動度の小さい（高分子）タンパク成分（約 150 kDa）の N-末端アミノ酸配列が、ゲノム配列既知の好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来フェレドキシン依存性グルタミン酸合成酵素 (GK1431) と 100％一致することを見出した。そこで、*G. kaustophilus* の GK1431 遺伝子を pET-28a ベクターに挿入し、大腸菌 BL21(DE3) を使って、GK1431 の大量発現を行った。細胞抽出液を疎水性クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、吸着カラムクロマトグラフィーにより効率よく均一に精製することに成功した。この精製タンパク質は、活性染色法により dye-GDH 活性を示した。またゲル濾過により、分子質量は約 170 kDa と算出され、GK1431 は単量体構造をとることが明らかとなった。また、L-グルタミン酸を電子供与体としたとき、フェリシアン化カリウム、WST-1、DCIP などを電子受容体として利用できることが分かった。本大会では、この新規 dye-GDH の反応の速度論的解析や補因子の同定などについても報告する。

thermophile, glutamate dehydrogenase, glutamate synthase

講演番号：3C22p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎22会場

糸状菌 *Ascochyta viciae* G-21 由来クロロペルオキシダーゼの単離・精製

Purification of chloroperoxidase from *Ascochyta viciae* G-21

○新藤　正人、司馬　肇、細野　邦昭（日本大学・生物資源科学）
○Masato Shindo, Hajime Shiba, Kuniaki Hosono (Nihon university)

【目的】糸状菌 *Ascochyta viciae* G-21 は抗腫瘍性物質アスコクロリンとその類縁体を生産する。アスコクロリンは分子内に塩素原子を持っているが、塩素含有化合物において塩素の取り込みにクロロペルオキシダーゼ（CPO）が関与していることが知られている。G-21 株も CPO を有すると考えられることから、菌体より CPO を単離・精製して、酵素化学的性質を明らかにする。
【方法】液体培養によって得られた菌体をガラスビーズで破砕し、上清を直接陽イオン交換樹脂 SP-650M に吸着させた後、NaCl で溶出した。さらに、陽イオン交換樹脂 CM-650M およびハイドロキシアパタイトクロマトにより精製を行い、次いで SDS-PAGE を行った。また、CPO 活性はモノクロロジメドンを基質とする活性測定法により行った。
【結果】*A.viciae* G-21 株はハロペルオキシダーゼ活性を持ち、塩素のみならず臭素に対しても反応性を持つことからブロモペルオキシダーゼ活性を持つことを明らかにした。また、280nm と 405nm に吸収波長を持つことからヘム型の補欠分子族を含む可能性が示された。

chloroperoxidase ,Ascochlorin, *Ascochyta viciae*

講演番号:3C22p15
講演日時、会場:3月24日16:43～ C校舎22会場

組換え出芽酵母高密度懸濁液による難生産性ラッカーゼの効率的生産

High cell-density expression system: yeast extracellular production of "difficult-to-express" proteins

齋藤 雄太[1], 木全 浩一[1], 山口 真也[2], 山根 恒夫[3], 矢野 明[4], 伊藤 圭祐[1,2], ○河原崎 泰昌[1,2] ([1]静岡県大食栄, [2]静岡県大院生活健康・食栄, [3]中部大応用生物, [4]岩手生工研セ)

Yuta Saito[1], Koichi Kimata[1], Masaya Yamaguchi[2], Tsuneo Yamane[3], Akira Yano[4], Keisuke Ito[1,2], Yasuaki Kawarasaki[1,2] ([1]SFNS, Univ. Shizuoka, [2]GNES, Univ. Shizuoka, [3]College Biosci. Biotechnol., Chubu Univ., [4]Iwate Biotech. Res.Center)

【目的】ラッカーゼ［EC 1.10.3.2］は、酸化基質であるO_2をH_2Oに還元して種々のフェノール性化合物を酸化する反応を触媒する酵素である。ラッカーゼは多様な基質特異性レンジ等の酵素学的諸性質をもち、様々な産業プロセスへの利用が期待されている。しかしながら、シイタケラッカーゼ(Lcc1, Lcc4)をはじめ多くのラッカーゼは組換え体による生産が困難であり、利用可能なラッカーゼ種は限定的である。そこで我々は組換えシイタケラッカーゼの酵母発現系を構築し、難生産性の原因となる諸因子の同定および発現量の改善を目的として種々の検討を行った。
【方法】一般的なpYES2由来のプラスミドを用い、GAL1プロモーターの下流にLcc1またはLcc4遺伝子を挿入した。酵素の発現はガラクトースおよび銅を含む培地により誘導し、生産された酵素量は、一般的な基質であるABTSの酸化活性を指標として定量した。なお、pH4.5、30℃の反応で1分間に1 μmolのABTSを酸化する酵素量を1 Uと定義した。
【結果と考察】一般的な生育連動型の発現誘導を行った所、宿主からのプラスミド脱落が見られ、宿主細胞の生育は顕著に阻害された。活性型ラッカーゼは菌体外に極微量（<1 mU/L)、検出された。種々の検討の結果、前培養した菌体を高密度（OD_{660}=15）で誘導培地に懸濁して発現誘導を行うことで、プラスミド保持率は大きく改善され、酵素生産量が顕著に増大（>1 U/L）することを見出した。さらに宿主株、誘導温度等を最適化したところ、小スケールでは7.3 U/Lの酵素生産量を得た。しかしながら、スケールアップに伴って酵素生産量は著しく低下（1 U/L）したため、通気量が律速となっている可能性が示唆された。そこで、ジャーファーメンター（2 L）を用い、高密度菌体懸濁液（0.5 L）に対して激しく通気（2-3 vvm）した所、生産量は4.9 U/Lに回復した。プラスミド脱落・宿主生育阻害を伴う難生産蛋白質に対し、誘導時菌体濃度の高密度化が有効であることを示したのは、本研究が初となる。現在、得られた組換えLcc4を培地上清より精製して酵素学的諸性質を決定しつつあり、大会ではこれらの知見も合わせて報告する。

Saccharomyces cerevisiae,, Lentinula edodes laccases, recombinant protein production

講演番号：3C22p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎22会場

ゲノム情報を利用した多様な細菌由来のハロアルカンデハロゲナーゼの解析

Analysis of the haloalkane dehalogenases derived from various bacteria using genome information

○田中 裕興、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命科学）
○Hiroki Tanaka, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku University)

【背景・目的】ハロアルカンデハロゲナーゼ(HLDs)は有機ハロゲン化合物の炭素–ハロゲン原子の結合を加水分解で切断する酵素である。様々な有機ハロゲン化合物が農薬などとして利用されると共に、化学合成やゴミ処理の際の副産物として環境中へ放出され、深刻な環境汚染を引き起こしており、多様な基質特異性を示すHLDsは有機ハロゲン化合物分解の鍵酵素として、バイオレメディエーションへの利用が期待されている。一方、ゲノム解析の進展に伴い、多種多様な細菌が推定HLD遺伝子を有していることが明らかになった。本研究では、それらの機能解析を行い、新規反応特性を有するHLDを取得することを目的とした。
【方法】HLDsの加水分解反応にはcatalytic triadと呼ばれる3つのアミノ酸残基が必須である。また、HLDsは３つのサブファミリー（HLD-Ⅰ,HLD-Ⅱ,HLD-Ⅲ）に分類されるが、HLD-IIIの機能に関する知見は乏しい。そこで、catalytic triadと推定されるアミノ酸残基が保存されたデータベース上の推定HLD遺伝子のうち、HLD-IIIを中心に、多様な環境に棲息する細菌ゲノム由来の９つを選び、これら遺伝子をコドン使用等を大腸菌での発現に最適化して人工合成した。これら推定HLDsを発現させた大腸菌の粗酵素抽出液の様々な有機ハロゲン化合物に対する活性を、遊離ハロゲンイオンを定量するチオシアン酸第二水銀比色定量法、および検出器にECDを装備したガスクロマトグラフィーで検討した。
【結果】解析した９つ全ての推定HLDsは、少なくとも、一般にHLDsの良い基質である1,3-ジブロモプロパンに対するHLDs活性を有していた。すなわち、catalytic triadと推定されるアミノ酸残基を有するなどの条件を絞ってデータベースからHLDs遺伝子を探索し、大腸菌での発現に最適化した遺伝子を人工合成する方法は、未開拓遺伝子資源の利用法として有効である。現在、これらHLDsの特定有機ハロゲン系環境汚染物質に対する分解活性の有無と、基質特異性について検討を行っている。また、高温、高塩などの極限環境を含む様々な環境由来の細菌がHLD遺伝子を有していることは、その生理学的意義を考える上で興味深い。

haloalkane dehalogenase,genome,bioremediation

講演番号：3C22p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ C校舎22会場

ヒラタケにおける香気成分1-オクテン-3-オールの生合成とリポキシゲナーゼの発現

Biosynthesis of 1-octen-3-ol and lipoxygenase expression in *Pleurotus ostreatus*

○田崎 裕二、佐藤 亮二、佐藤 直、城 斗志夫[1]（長岡高専・物質工、[1]新潟大・農）
○Yuji Tasaki, Ryoji Sato, Nao Sato, Toshio Joh[1] (Nagaokakosen, [1]Niigatadai)

【目的】1-オクテン-3-オールは，ほとんどの食用キノコに含まれる主要な香気成分である．その生合成においては，はじめにリノール酸にリポキシゲナーゼ（LOX）が作用してヒドロペルオキシドが形成される．その後，ヒドロペルオキシドがヒドロペルオキシドリアーゼの作用により開裂し，1-オクテン-3-オールが生成されると推定されている．これまでの研究で，ヒラタケのLOX遺伝子（*PoLOX1*）のcDNA及びゲノムDNAが単離され，それらの塩基配列が決定された．本研究では，ヒラタケ子実体の発生及び成熟過程と収穫した子実体の保存中におけるLOXの発現と1-オクテン-3-オールの生合成について解析した．

【方法】供試菌株にはヒラタケH1株（大貫菌蕈，宇都宮）を用いた．H1株菌糸をブナおがくず-米糠培地の入った栽培瓶または栽培袋で約35日間培養した後，子実体発生誘導を行い，子実体を発生させた．キノコ試料は，子実体発生過程の各段階［菌糸体，原基，幼子実体（傘直径3-6 mm），成子実体（13-17，40-50，80-100 mm）］において採取した．また，成子実体試料の数サンプルは，各部位（傘，柄，石づき）に分けた．保存実験のため，成子実体試料をポリエチレンテレフタレート製トレイと塩化ビニル製ラップでパックして，4℃で一定期間保存した．*PoLOX1*の転写量は，各キノコ試料より単離したトータルRNAを用いたリアルタイムRT-PCR法により定量した．内因性リファレンス遺伝子には18S rRNAを用いた．LOX活性は，リノール酸を基質に用いて，共役ジエン法により測定した．1-オクテン-3-オール量はガスクロマトグラフィーを用いた内部標準法により定量した．

【結果】子実体発生過程におけるLOXの発現を調べるため，*PoLOX1*の転写量をリアルタイムRT-PCR法により定量した．その結果，転写量は菌糸体では極めて少なかったが，子実体発生誘導後急激に増加し，成子実体でピークに達した．成子実体（13-17 mm）での転写量は菌糸体の約700倍だった．次に，子実体の各部位における転写量の違いを調べた．その結果，柄での転写量が最も多く，傘と石づきの約9倍だった．子実体の成熟がLOXの発現と1-オクテン-3-オールの生合成に及ぼす影響を調べるため，大きさの異なる3種の成子実体の傘と柄部位を用いて，LOX活性と1-オクテン-3-オール量を測定した．LOX活性と1-オクテン-3-オール量は，中型の子実体（40-50 mm）の柄においてのみ高い値を示したが，それ以外の試料において，子実体の部位及びサイズの違いによる量的な違いはあまりみられなかった．収穫した子実体の冷蔵保存中でのLOXの発現と1-オクテン-3-オールの生合成の経時的変化を調べるため，パック保存された子実体のLOX活性と1-オクテン-3-オール量を測定した．8日間の保存期間を通じて，1-オクテン-3-オール量は1日目で一時的に増加したが，その後，徐々に減少した．これに対して，LOX活性はわずかに増加する傾向にあった．

Lipoxygenase, Mushroom aroma, 1-Octen-3-ol

講演番号:3C22p18
講演日時、会場:3月24日17:26～ C校舎22会場

中度好塩菌*Halomonas* sp. 593由来好塩性アルカリフォスファターゼのクローニング・発現・精製とNaイオンによる活性化

Cloning, expression, purification and activation by Na ion of halophilic alkaline phosphatase from moderate halophile *Halomonas* sp. 593

○石橋松二郎、小田一輝、荒川　力[1]、徳永正雄　（鹿大・農、[1]Alliance Protein Lab.）
○Matsujiro Ishibashi, Kazuki Oda, [1]Tsutomu Arakawa , Masao Tokunaga (Kagoshima Univ., [1]Alliance Protein Lab.)

【目的】アルカリフォスファターゼ(ALP)は遺伝子工学や臨床検査などで使われ、よく研究されているペリプラズム内酵素の1つだが、高度好塩菌由来ALPに比べ、中度好塩菌由来ALPの研究は限られている。我々は以前、中度好塩菌*Halomonas* sp. 593からALP (HaALP)を部分精製し、性質検討した結果、HaALPは2量体を形成しており、安定性に少なくとも0.3 M以上NaClが必要であることがわかった。今回我々はこの遺伝子をクローニングし、大腸菌での発現、精製を行った。さらに詳しい諸性質検討をし、この酵素の好塩性メカニズムの解明を目指す。
【方法】*haalp*遺伝子をプラスミドベクターpET3a (Novagen)に組み込み、発現ベクターpHAを構築した。この発現ベクターを使って、*E. coli* BL21 Star (DE3) pLysSを形質転換した。発現は18℃で行い、HiTrap Q HP column (1.6 X 2.5 cm, GE Healthcare)で精製をした。さらに精製したHaALPをHiload Superdex 200 pg gel filtration column (1.6 X 60 cm, GE Healthcare)で分離した。得られたサンプルは、さまざまな塩を含んだ50 mM Tris-HCl (pH8.0)/2 mM $MgCl_2$ bufferで透析され、基質p-nitrophenyl phosphateを使って活性が測定された。
【結果】我々は中度好塩菌*Halomonas* sp. 593から*haalp*遺伝子を含む2023 bpのDNA断片を取得し、塩基配列を決定した(DDBJ ID: AB271127)。推定されたアミノ酸配列は他の生物由来ALPと高い相同性を示した。また、酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸の比 ((E + D)/(K + R)) は2.8を示し、好塩性タンパク質の特徴である酸性アミノ酸の増加がみられた。この遺伝子を*E. coli* BL21 Star (DE3) pLysSに組込み、18℃で発現させ、Qカラムで精製したところ、培地100 mlあたり、8 mgのHaALPタンパク質を得ることが出来た。しかし、このHaALPは活性を保持していなかった。そこで、ゲル濾過によりこのサンプルを分離したところ、4つのフラクションを得る事が出来た。この中の1つのフラクションは3 M NaClを含むバッファーで透析したところ、活性が回復した。興味深いことに、この活性回復には高濃度のNaイオンを必要とし、他の塩では回復出来なかった。
Protein Expr. Purif., 76(1), 97-102 (2011)

alkaline phosphatase, activation, halophile

講演番号：3C22p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ C校舎22会場

タイトル　*Thermoactinomyces* sp. T7-1 株由来ポリ乳酸分解酵素の性質
Title　Properties of poly lactic acid depolymerase from *Thermoactinomyces* sp. T7-1
○藤森健夫、原兆子、徳山真治（静岡大・農）
○Takeo Fujimori, Choko Hara, Shinji Tokuyama (Fac. Agric., Shizuoka Univ.)

【目的】ポリ乳酸（PLA）は、植物由来のセルロースやデンプンを原料に発酵で得られる乳酸を重合させた高分子化合物で、生分解性プラスチックの材料として用いられている。自然界においてPLAは微生物の作用により乳酸に分解されるが、PLA分解酵素の詳細な性質は不明である。本報告ではPLA分解酵素の性質及びその反応機構の解明を目的とし、*Thermoactinomyces* sp. T7-1株由来PLA分解酵素を精製し、その性質を検討した。
【方法】PLA分解活性は乳化PLAの濁度（660 nm）の減少を測定し求めた。本酵素の単位は1分間に乳化PLAの濁度を1.0減少させる酵素量とした。乳化PLAは、1%PLA溶液（ジクロロメタン）に10倍量のTris-HCl緩衝液（20 mM、pH 9.0）を加え、超音波処理（400 W、15分間）を行い調製した。本酵素の精製は硫安沈殿、CM-TOYOPEARL 650M 及びButyl-TOYOPEAEL 650Mを用いて行った。
【結果】*Thermoactinomyces* sp. T7-1株は、PLA分解酵素をPL229-5培地中に生産した（1.0 U/ml）。培養液から本酵素をSDS-PAGEで単一なバンドを示すまでに精製した（135 U/mg、収率23 %、1500倍）。本酵素は、PLA及び*p*-NP esters（特に*p*-NP acetate）などのエステルを分解した。本酵素はカゼイン及び*N*-suc-AAPF-*p*-NAにも作用したことからプロテアーゼ活性を有することが明らかとなった。更に*N*-suc-AAPF-*p*-NAを基質としたとき11500（U/mg）を示したことから本酵素はプロテアーゼであると推定される。また、本酵素のPLA分解活性はPMSF及びEDTAにより阻害された。Ca^{2+}の添加は本酵素のPLA分解活性を4倍に上昇させた。本酵素のPLA分解における至適温度及び熱安定性は、それぞれ60-80℃および55℃であり、至適pH及びpH安定性はそれぞれpH 9.0及びpH 4.0～11.0であった。本酵素のN末端および内部アミノ酸配列をもとに縮重プライマーを合成し、遺伝子のクローンニングを行っている。

Poly lactic acid, Thermoactinomyces, protease

講演番号：3C22p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ C校舎22会場

Lactobacillus salivarius AC21の2分子ペプチドバクテリオシンsalivacin K21の異種発現

Heterologous expression of the two-peptide bacteriocin, salivacin K21 of *Lactobacilus salivarius* AC21

飯干 翔子、○外村 彩夏[1]、元村 あかね、Nitisinprasert Sunee[2]、善藤 威史[3]、中山 二郎[3]、園元 謙二[3]、松崎 弘美（熊本県大・環境共生、[1]熊本県大院・環境共生、[2]カセサート大、[3]九大院・農）

Shoko Iiboshi, ○Ayaka Hokamura[1], Akane Motomura, Sunee Nitisinprasert[2], Takeshi Zendo[3], Jiro Nakayama[3], Kenji Sonomoto[3], Hiromi Matsusaki (Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Kasetsart Univ., [3]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

【目的】鶏腸管から分離した耐熱性乳酸菌*Lactobacillus salivarius* AC21は、バクテリオシンsalivacin K21を生産する。遺伝子解析により、本バクテリオシンは、αペプチドおよびβペプチドの2分子で構成されると予想されるが、βペプチドは精製されておらず、詳細は不明である。そこで、salivacin K21のαペプチドおよびβペプチドを大腸菌を宿主として、それぞれ単独で発現、精製し、各ペプチド単独での抗菌活性やそれらの相互作用について調べることを本研究の目的とした。
【方法】Salivacin K21の成熟αペプチドあるいは成熟βペプチドに相当するDNA領域とエンテロキナーゼが認識するアミノ酸配列に相当する塩基配列を付加して、それぞれpET32bベクターに挿入し、pET32b-msalAαおよびpET32b-msalAβを構築した。これらのプラスミドを*Escherichia coli* BL21(DE3)に導入し、αおよびβペプチドをそれぞれHis-tagチオレドキシン融合タンパク質として発現させ、その発現をSDS-PAGEにて確認した。その後、超音波破砕、アフィニティークロマトグラフィーを行って、αおよびβペプチドをHis-tagチオレドキシン融合体として精製した。次に、精製した融合タンパク質をそれぞれエンテロキナーゼで消化し、遊離したペプチドをTricine-SDS-PAGEにて確認した。遊離したペプチドの抗菌活性については、*Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157^{T}を指標菌としたバイオアッセイにより調べた。さらに、αおよびβペプチドの融合体のエンテロキナーゼ消化産物を混合して、αおよびβペプチドの相互作用について検討した。
【結果】LB培地にて37°C、1.0 mM IPTG条件下で誘導発現させたところ、αおよびβの両ペプチドとも約21 kDaのHis-tagチオレドキシン融合タンパク質が可溶性画分および不溶性画分に認められた。このとき、αペプチドの融合体は可溶性画分に多く存在していたが、βペプチドの融合体では、可溶性画分のみならず不溶性画分にも著量存在していた。可溶性画分よりアフィニティークロマトグラフィーを行って融合体を精製した。その後、エンテロキナーゼ消化を行ったところ、αペプチドはβペプチドが存在していなくても単独で抗菌活性を示すことが明らかとなった。一方、βペプチドについては、非常に弱いながらも、単独でわずかな抗菌活性を示した。さらに、αおよびβペプチド融合体のエンテロキナーゼ消化産物を混合して、バイオアッセイを行った結果、αおよびβペプチド単独の場合と比べて、非常に強い抗菌活性を示し、抗菌活性の相乗効果が認められた。

bacteriocin, *Lactobacillus salivarius*, lactic acid bacteria

講演番号：3C23a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ C校舎23会場

4-アミノピリジンの分解に関わる微生物群集の組成と分解経路の推定

Characterization of 4-aminopyridine degradation by bacterial community

○竹中 慎治、野村 亮介、吉田 健一（神戸大院・農）
○Takenaka Shinji, Nomura Ryosuke, Yoshida Ken-ichi (Kobedai)

【目的】4-アミノピリジンは農薬・鳥類の忌避剤として用いられている化合物で、残留基準値なども定められているが、他のピリジン類と比較して自然界における微生物分解の行方の詳細は明らかでない。前報では、4-アミノピリジンに関わる微生物の検索と微生物群集（No. KM20-14E）による同化合物の無機化を報告した。[1)] 本報では、PCR-DGGE法による4-アミノピリジン分解微生物群集の解析と代謝経路の推定を報告する。
【方法】培養：0.02%4-アミノピリジンー土壌抽出液添加培地（pH 5.5）を用いた。PCR-DGGE：培養液から菌体を回収し、抽出したDNAを鋳型として16S rDNAのV3領域を増幅後、DGGE（ゲル濃度勾配27.5%～42.5%、泳動条件50 V、4 h、60℃）を行った。菌の同定：16S rDNAのほぼ全長の解析および形態・生理生化学的性質の試験によった。代謝中間体の同定・定量：GC-MS、^{1}H-NMRおよびHPLCによった。
【結果】KM20-14Eの培養液を経時的にサンプリングし、平板希釈法で菌叢の変化を調べたが、4-アミノピリジンの分解に伴う菌種の構成変化は見られなかった。どの時期においても *Pseudomonas nitroreducens*（A株）、*Stenotrophomonas maltophilia*（B株）、*Enterobacter agglomerans*（C株）、*Tsukamurella pulmonis*（D株）、*Burkholderia* sp.（E株）、*Microbacterium* sp.（F株）、*Enterobacter* sp.（G株）が優占種であった。しかし、これらの菌株の単一培養系または再構成した混合培養系では4-アミノピリジンはほとんど分解されなかった。つづいて、培養液から抽出したDNAを鋳型にPCR-DGGEを行った。上述の優占種の中では、AおよびG株由来の増幅断片がいずれの時期にも見られた。また、4-アミノピリジンの分解に伴い平板希釈法では検出できなかった菌株（Y株）由来のバンド強度が増大した。さらに、培地に添加する4-アミノピリジン濃度を変化させて菌叢解析をした。その結果、AおよびG株由来のバンド強度は減少し、Y株由来のバンド強度は増大した。16S rDNAの解析の結果、Y株の同遺伝子配列はunculturable bacterium *Hyphomicrobium* spp.の同配列と非常に高い相同性を示した。また、培養液中に含まれる細菌の形態を観察したところ、*Hyphomicrobium*属においてみられる特徴的な形態（プロテスカ）を有する細菌細胞が多数見られた。

培養液中に蓄積した代謝中間体として、4-アミノ-3-ヒドロキシピリジンおよび3,4-ジヒドロキシピリジンを同定した。これらの化合物について4-アミノピリジン共存下および非共存下で分解性試験したところ、3,4-ジヒドロキシピリジンは分解されたが、4-アミノ-3-ヒドロキシピリジンは分解されなかった。KM20-14Eにおける4-アミノピリジン分解では3,4-ジヒドロキシピリジンを経る分解経路が主であり、4-アミノ-3-ヒドロキシピリジンはdead end productとして蓄積すると考えた。

1）2010年日本農芸化学会大会講演要旨集（2AUa11）.

4-aminopyridine, PCR-DGGE analysis, *Hyphomicrobium*

講演番号：3C23a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ C校舎23会場

Chryseobacterium sp. 5-3B由来*N*-アセチルトランスフェラーゼの特性解析

Characterization of *N*-acetyltransferase from *Chryseobacterium* sp. 5-3B

○吉田 健二、竹中 慎治、吉田 健一（神戸大院・農）
○Yoshida Kenji, Takenaka Shinji, Yoshida Ken-ichi (Kobedai)

【目的】我々はこれまでに芳香族アミン類のアミノ基を位置選択的に*N*-アセチル化する*N*-アセチルトランスフェラーゼの特性について報告してきた。[1] 本報では、キラルな脂肪族アミンのアミノ基を立体選択的に*N*-アセチル化する*N*-アセチルトランスフェラーゼ生産菌の分離と同酵素の特性を明らかにしたので報告する。
【方法】菌株の分離：1.0% ポリペプトン－0.1% D,L-2-フェニルグリシン培地（pH 8.0）を用いた。化合物の分析：COSMOSIL 5C_{18}- MS-ⅡまたはChiracel OD-Hカラムを用いて分別定量した。酵素精製：細胞抽出液を調製し、硫安分画および各種クロマトグラフィーによった。
【結果】キラルアミンとしてD,L-2-フェニルグリシン（DL-2PG）を用いて目的に叶う微生物を検索し、同基質を代謝する分離菌の中からL-2PGを高変換で*N*-アセチル化する微生物5-3B株を選抜し、*Chryseobacterium*属と同定した。本菌はDL-2PGのL-体を高選択的に*N*-アセチル化し、*N*-アセチル化代謝産物（2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸）を生成した。本菌の生育および変換に与える因子の影響を調べたところ、ポリペプトン添加培地（pH 8.0）において生育および代謝変換が最良であった。最適条件では、培養56時間後にモル変換率が49%に達した。また生成した2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸のエナンチオマー過剰率（e.e.）は99.5%以上で、L-体の*N*-アセチル化物（(2*S*)-2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸）を過剰に蓄積していた。

5-3B株から調製した細胞抽出液は、アセチルCoA存在下においてL-2PGを(2*S*)-2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸に変換した。よって、変換を触媒する酵素は、アセチルCoA依存性*N*-アセチルトランスフェラーゼと予想した。本酵素は2PG添加培地において誘導生産されていた。同培地で培養して得られた菌体から本酵素を精製し、その性質を調べた。最終調製酵素をNative-PAGE電気泳動後、活性染色およびCBB染色した。酵素反応によって生じたCoA-SHをDTNBで検出したバンドは、CBB染色においてもタンパク質のメインバンドであった。本酵素はpH 7.5、60℃において最大活性を示した。また、SH基修飾試薬について酵素阻害を調べたところ、PCMB、DTNBにより顕著に阻害が見られた。本酵素の基質特異性は高く、試験したアミン類の中でL-2PGに対して高い活性を示した。また、2PGの誘導体の中では、2-クロロフェニルグリシンに対しても活性を示した。一方、その他の脂肪族アミン類、芳香族アミン類、芳香環を有するアミノ酸に対してはほとんど活性を示さなかった。精製酵素を用いてDL-2PGから生成した2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸の光学純度を調べたところ、エナンチオマー過剰率（e.e.）は99.5 %以上（(2*S*)-2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸過剰）であった。

１）Takenaka et al., J Biosci Bioeng. 107: 27-32 (2009).

Chryseobacterium, 2-phenylglycine, *N*-acetyltransferase

講演番号：3C23a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎23会場

Rhodococcus jostii RHA1株におけるβケトアジピン酸経路の新規バイパス経路の解析

A novel route of β-ketoadipate pathway in *Rhodococcus jostii* RHA1

○山梨 智也、原 啓文[1]、鮒 信学（静岡県大院生活健康・食栄、[1]岡山理大院工・生体医工）
○Tomoya Yamanashi, Hirofumi Hara[1], Nobutaka Funa (University of Shizuoka, Department of Food and Nutritional Sciences, [1]Okayama University of Science, Department of Biomedical Engineering)

【目的】土壌放線菌*Rhodococcus jostii* RHA1株は、難分解性芳香族化合物を分解する。*R. jostii* RHA1株は、protocatechuate branchとcathecol branchからなるβ-ketoadipate pathwayによって、phthalate、terephthalate、benzoateを代謝する（図）。我々は以前、β-ketoadipate pathwayのprotocatechuate branchからcathecol branchへのバイパス経路の存在を示唆していた[1)]。本研究では、*R. jostii* RHA1におけるβ-ketoadipate pathwayのバイパス経路の解明を目的とした。

【方法および結果】terephthalateを唯一の炭素源とし、Δ*pcaHG*株、Δ*pcaB*株の生育を調べたところ、Δ*pcaHG*株は生育せず、Δ*pcaB*株は生育する[1)]。つまり、バイパス経路は、PcaHG以降、PcaB以前に存在すると予想できる。そこで、Δ*pcaHG*株にprotocatechuateを投与し、HPLCによって分析した。その結果、Δ*pcaHG*株は、protocatechuateを代謝しないことが判明した。また、Δ*pcaB*株で同様の実験を行ったところ、protocatechuate代謝中間物は検出されなかった。したがって、バイパス経路の出発物質は3-carboxy-*cis*, *cis*-muconateであることが示唆された。

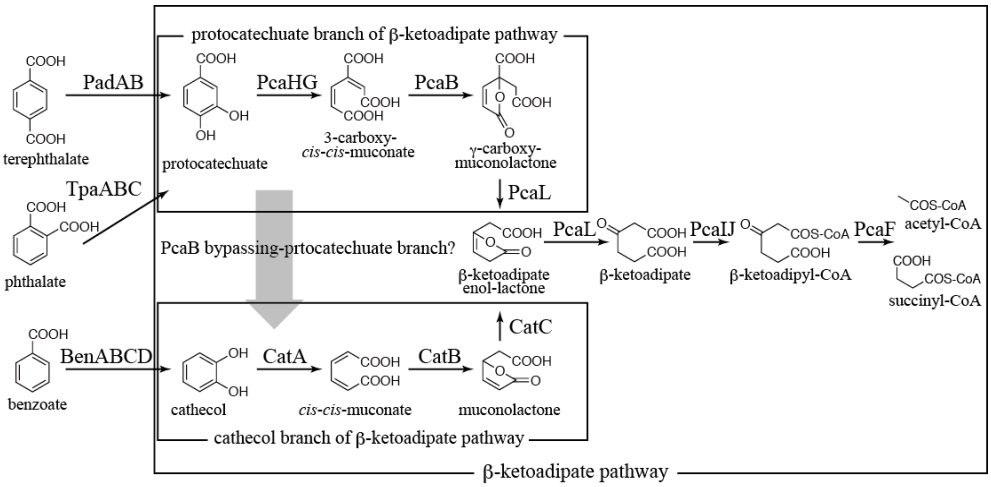


図　*R. jostii* RHA1株のβ-ketoadipate pathway

我々は以前、バイパス経路に関与する酵素遺伝子として、長鎖脂肪酸CoA結合酵素と相同性を有する*ro02781*および脱炭酸酵素と相同性を有する*ro02782*を見い出した[1)]。そこで、Δ*pcaB*Δ*ro02781*株のprotocatechuate代謝物をHPLCによって分析した。その結果、3-carboxy-*cis*, *trans*-muconate、3-carboxy-*trans*, *trans*-muconate、β-carboxymuconolactoneの蓄積が確認できた。これらの化合物はいずれも不安定な3-carboxy-*cis*, *cis*-muconateから生じると考えられる。以上より、バイパス経路の出発物質は3-carboxy-*cis*, *cis*-muconateであり、*ro02781*、*ro02782*により3-carboxy-*cis*, *cis*-muconateが変換されると予想できる。

1) 原 啓文、大西 康夫、福田 雅夫、*化学と生物*、**49**巻、234-242（2011）

Rhodococcus

講演番号:3C23a04
講演日時、会場:3月24日09:33～ C校舎23会場

微生物代謝を用いたリグニン由来低分子化合物からのβ―ケトアジピン酸（KA）の生産

Production of β-ketoadipate from lignin-derived substrates by engineering microbiological metabolism.

○西村 圭、笠井 大輔[1]、政井 英司[1]、福田雅夫[1]、大塚 祐一郎[2]、中村 雅哉[2]、佐藤 かんな、梶田 真也、片山 義博[3]（東農工大院・BASE、[1]長岡技科大・生物、[2]森林総研、[3]日大・生物資）

○Kei Nishimura, Daisuke Kasai[1], Eiji Masai[1], Masao Fukuda[1], Yuichiro Otsuka[2], Masaya Nakamura[2], Kanna Sato, Shinya Kajita, Yoshihiro Katayama[3] (Tokyo Univ. A&T, [1]Nagaoka Univ. of Tech., [2]FFPRI, [3]Nihon Univ.)

【目的】原油価格の高騰や国際的な資源獲得競争の激化により代替資源としての植物バイオマスが注目されている。植物バイオマスの主要な構成成分はセルロース約40%、ヘミセルロース約20~30%、リグニン15~30%である。植物バイオマスのうちセルロースやヘミセルロース等の多糖類は紙やパルプの原料、甘味料や医薬品原料など高度な利用法が確立されている。これら多糖類はバイオエタノールなどへの利用法が開発されているが、一方で食料との競合も危惧される。今後の人口増加を考えると食料と競合しない植物バイオマスとして、リグニンの利用法の開発が急務といえる。リグニンは天然に最も大量に存在する芳香族のバイオマスで、その複雑な三次元構造から分解や利用は容易ではないが、今後の石油資源の枯渇を考慮するとリグニンの物質資源としての高度な利用法の開発が求められる。本研究ではリグニンからの有用な物質の生産を念頭に、細菌*Sphingobium sp.* SYK-6 や *Pseudomonas sp.* の代謝経路を利用してβ-ketoadipate(KA)の生産を行った。KAは66ナイロンの原料であるアジピン酸にケトン基を付加した構造をしており、アジピン酸に類似した構造から、汎用性をもちつつケトン基に官能基を付加して機能性を付与した物質を生産できる可能性があり、将来的にリグニンの利用の促進に寄与することが期待される。

【方法と結果】1. *pcaIJ*遺伝子破壊株の作製　*P. putida* KT2440はプロトカテク酸(PCA)をβ-ketoadipate pathwayを経由して代謝する。宿主KT2440株のKA資化遺伝子*pcaIJ*を相同組み換えにより破壊し、*pcaIJ*破壊株を作製した（*IJ*破壊株)。PCAを加えたコハク酸添加培地にて生育させたところ*IJ*破壊株はKAを蓄積した。

2. β-ketoadipate pathway遺伝子の導入　KAの生産量を上げるためβ-ketoadipate pathwayの遺伝子*pcaHG, pcaB, pcaC, pcaD*を連結し、ppcaHGBCD(plasmid 1)として*IJ*破壊株に導入した。この株でKAの生産試験を5L容量ジャーファーメンターにて行った。その結果、培養液1Lあたり5g相当のバニリン酸からほぼ100%の効率でKAを生産することに成功した。基質をPCAにすると培養液1Lあたり30g相当をKAに生産でき、*IJ*破壊株に比べKAの生産量が10倍以上上昇した。

3. plasmid pJBVV2Aの構築と新たな基質からのKAの生産　次に SYK-6株由来のベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子である*ligV*および*ligV2*、さらに*P. putida*由来の 4-ヒドロキシ安息香酸-3-モノオキシゲナーゼ遺伝子pobAを連結しpJBVV2A(plasmid 2)を作製した。これをplasmid 1とともに*IJ*破壊株に導入し、 *p*-HBALとVNからのKAの生産を行った。このとき培養液1Lあたり5g相当のVNと1g相当の*p*-HBALからKAを生産できた。

lignin degradation, β-ketoadipate, *P. putida*KT2440

講演番号：3C23a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ C校舎23会場

有機溶媒耐性細菌*Pseudomonas putida* T-57株によるカテコール化合物の生産

Bio-production of catechols by organic solvent tolerant bacterium *Pseudomonas putida* T-57

渥美貴大、○田島誉久、片岡尚也、工藤大蔵、中島田豊、加藤純一（広島大院先端物質・分子生命）

Takahiro Atsumi, ○Takahisa Tajima, Naoya Kataoka, Daizou Kudou, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato (Hiroshimadai)

【目的】プラスチックや医薬品に代表される化成品の多くは、化学合成により生産されている。しかし、それらの反応は高温・高圧な条件を必要とし、多くは複雑な多段階反応によって行われる。そのため、多くのエネルギーが消費され、副産物の生成といったデメリットを持つ。3-フルオロカテコール(3FC)は医薬品等の前駆物質として期待され、複数の触媒と多段階反応を経て化学合成されている。*Pseudomonas putida* T-57株は、1-octanol/水 分配係数（log Pow）2.5以上のn-デカン、n-オクタン、n-ヘキサン、プロピルベンゼン、シクロヘキサン、キシレン、スチレン、トルエンなどに耐性を示す有機溶媒耐性細菌である。また、トルエンジオキシゲナーゼを有し、トルエンを資化することが可能である。そこで本研究では、有機溶媒耐性細菌*Pseudomonas putida* T-57変異株を用い、フルオロベンゼン(FB)を基質として3FCを生成する生体触媒を構築し、生産方法の検討を行うこととした。

【方法および結果】本研究では*P. putida* T-57株の*tod*オペロンにおける3-methylcatechol 2,3-dioxygenase（*todE*)を破壊し、*todC1*上流にカナマイシン耐性遺伝子プロモーターを挿入して*tod*オペロンを恒常的に発現させた変異株を用いた。基質であるFBや生産物3FCは生物毒性が高く、FBを培地に直接添加した一相系を試みたところ、3FCは生産されなかった。そこで、デカノール(3 ml)を培地(10 ml)に重層させた二相培養系による生産を行った。これによりFBと3FCは有機溶媒相にトラップされ、3FC生産が可能となった。T-57株はデカノールを資化することが可能であり、リザーバーであるとともに炭素源にもなる。生産向上のため、培地、FBの添加量、塩化マグネシウムの添加を検討したところ、1 g/L（有機相）の3FCが生成された。さらにトルエンジオキシゲナーゼ活性を高めるために*todC1C2BAD*をpHA10由来のpHKプラスミドによりカナマイシンプロモーター下で高発現させた株を構築した。この生体触媒により最大で5 g/L（有機相）の生産を可能とした。これを20倍に濃縮し、3% アルギン酸ナトリウムにより固定化させた生体触媒をデカノール：LB培地 = 1:1 (60 ml)で3MCを生産させたところ、10 g/L（有機相）を達成することができた。

Two-phase liquid reaction system, *Pseudomonas putida*, 3-fluorocatechol

講演番号：3C23a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ C校舎23会場

光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides*におけるコリスミ酸リアーゼ遺伝子の同定と解析

Identification of a gene encoding chorismate lyase from *Rhodobacter sphaeroides*

○氏原 哲朗、三宅 浩一郎（協和発酵バイオ）

○Tetsuro Ujihara, Koichiro Miyake (KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.)

【目的】光合成細菌*Rhodobacter sphaeroides*はコエンザイムQ10（CoQ10）の生産菌として知られており、既にゲノム配列が解読されている。そのため、大腸菌との相同性解析などからCoQ10生合成遺伝子のほとんどがすでに同定済みである。しかしながらその中でコリスミ酸からCoQ10のキノン骨格合成の出発物質である4-ヒドロキシ安息香酸を合成する酵素、コリスミ酸リアーゼは大腸菌の酵素とホモロジーのある酵素がゲノム配列中に存在せず、未同定であった。そこで、我々は*Rhodobacter sphaeroides*においてコリスミ酸リアーゼをコードする遺伝子を同定することを目的とした。

【方法・結果】*Rhodobacter sphaeroides*のゲノム配列から、コリスミ酸と結合すると推測される酵素遺伝子をクローニングし、大腸菌のコリスミ酸リアーゼ欠損株に導入し、相補実験を行った。その結果、大腸菌のコリスミ酸リアーゼとは相同性の低い新規の配列が相補活性を有することが確認された。さらに、この酵素遺伝子を発現させた大腸菌は*in vitro*でコリスミ酸から4-ヒドロキシ安息香酸を生成することが確認された。

次に、この酵素遺伝子が*Rhodobacter sphaeroides*で機能するかどうかを調べるため、過剰発現株を造成した。　この過剰発現株では4-ヒドロキシ安息香酸の蓄積量の増大がみられたことから、実際にコリスミ酸リアーゼとして機能していることが確認された。

これらの結果から、本酵素遺伝子は未同定であった*Rhodobacter sphaeroides*のコリスミ酸リアーゼ遺伝子であると推察され、今後、CoQ10の生産や4-ヒドロキシ安息香酸をはじめとするキノン化合物の生産などへが期待される。

Chorismate lyase, Rhodobacter sphaeroides, Coenzyme Q10

講演番号：3C23a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎23会場

大腸菌休止菌体を用いたcatecholからのreticuline生産

Bioconversion of catechol into reticuline using resting cells of *E. coli*

○松田元規、山本恵子、中川明、松村栄太郎、南博道、片山高嶺、佐藤文彦[1]、熊谷英彦、山本憲二（石川県大・資源研、[1]京大院・生命）

○Motoki Matsuda, Keiko Yamamoto, Akira Nakagawa, Eitaro Matsumura, Hiromichi Minami, Takane Katayama, Fumihiko Sato[1], Hidehiko Kumagai, Kenji Yamamoto (Ishikawa Prefectural University, [1]Kyoto University)

【目的】近年、植物や微生物が生産するフラボノイドやアルカロイドなどの二次代謝産物の生合成遺伝子を大腸菌などに組み込み、微生物発酵法により生産する試みが報告されている。我々は、植物が生産するbenzylisoquinoline alkaloidであるreticulineについて、dopamineを出発物質とする生合成経路を構築し、組換え大腸菌を用いた微生物変換法を報告している[1)]。

この生合成経路において基質となるdopamineは、生物界において広く二次代謝産物の生合成中間体として存在している。 Dopamineの生合成において基質となるL-DOPAは、tyrosine phenol-lyase (TPL) の逆反応によりcatechol、pyruvate、ammoniaから合成することが可能であり、すでに工業的に実用化されている。また、dopamineは、decarboxylaseによりL-DOPAから合成することが可能であり、TPLとの２段階反応による合成が可能である。この２段階反応によって、最大8 mMものdopamineが合成できることが報告されていることから[2)]、dopamineより下流の生合成酵素と組み合わせることにより、新たな二次代謝産物生合成経路を開発可能である。

本研究では、TPLとL-DOPA decarboxylase (DDC)を、上記のdopamineを出発物質とするreticuline 生合成経路と組み合わせることにより新たなreticuline合成経路を設計し、組換え大腸菌休止菌体反応によるcatechol、pyruvate、ammonia からのreticuline生産を行った。

【方法】TPL、DDC、monoamine oxidaseおよびnorcoclaurine synthaseの各遺伝子を含むpKK223とnorcoclaurine 6-*O*-methyltransferase、coclaurine *N*-methyltransferaseおよび3’-hydroxy-*N*-methylcoclaurine-4’-*O*-methyltransferaseの各遺伝子を含むpMW219を作製し、この２つのプラスミドを用いて大腸菌BL21(DE3)を形質転換した。この菌株を25℃, １２時間培養後、0.1 mM IPTGを加え、さらに１２時間培養後、遠心分離により集菌し、休止菌体を作製した。この休止菌体を既報のL-DOPA合成反応液に懸濁し、反応後LC-MSによりreticulineの合成を確認した。

【結果】pH8.5に調製したL-DOPA合成反応液では、reticuline合成は、ほとんど行われなかったが、初発ｐＨを中性付近まで下げることにより、培養液　１ Lあたり5 mg/Lのreticulineの合成に成功した。さらに反応条件を検討した結果、最大10 mg/Lの生産が可能となった。

[1)]Minami et al., PNAS,105, 7393-7398(2008)

[2)]Lee et al., Enzyme and Microbial Technology, 25,298-302(1999)

(S)-reticuline, dopamine, bioconversion

講演番号：3C23a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ C校舎23会場

糸状菌*Aspergillus niger*におけるoxaloacetate hydrolase遺伝子の高発現による高収率シュウ酸生産

High-yield Oxalic Acid Production by *Aspergillus niger* Overexpressing an Oxaloacetate Hydrolase Gene

○小林 慶一、本田 裕樹、服部 貴澄、桐村 光太郎（早大理工・応化）
○Keiichi Kobayashi, Yuki Honda, Takasumi Hattori, Kohtaro Kirimura (Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】糸状菌*Aspergillus niger*によるクエン酸の発酵生産では、シュウ酸の副生は精製工程の煩雑化などの原因となる[1)]。一方で、シュウ酸はキレート剤や洗浄剤などに使用される化学製品で、現在は有機合成により生産されている。本研究では、*A. niger*による再生可能な糖質原料からのシュウ酸の高収率生産を目的として、*A. niger* WU-2223L[2)]由来oxaloacetate hydrolase (OAH)遺伝子*oahA*破壊株と高発現株を作製し、シュウ酸生産量について検討した。
【方法および結果】クエン酸生産糸状菌*A. niger* WU-2223L由来*oahA*をクローニングした。*oahA*は2つのイントロンで分断される全長1,232 bpの遺伝子領域から成り、341個のアミノ酸残基から成るタンパク質をコードしていた。*oahA*の一部を欠失させた構造の*oahA*破壊用プラスミドを用いて、WU-2223Lを宿主とした形質転換により*oahA*破壊株(DOAH-1)を作製した。DOAH-1株においては*oahA*の転写およびOAH比活性は消失し、シュウ酸を生産しないことを確認した。一方、糸状菌高発現用プロモーターP-No8142下流に*oahA*を連結させた構造のプラスミドを用いて、WU-2223Lを宿主とした形質転換により*oahA*高発現株(EOAH-1)を作製した。EOAH-1株においては、*oahA*の転写量の増大にともないOAH比活性はWU-2223L株に比べ最大35倍まで増加し、炭素源として30 g/lのグルコースを含む培地での12日間培養においてシュウ酸生産量が28.9 g/l(収率96%)に達した。以上より、*A. niger* WU-2223Lにおけるシュウ酸生産がOAHによるオキサロ酢酸の加水分解に由来するもので、*oahA*高発現により高収率シュウ酸生産菌の作製が可能なことを明らかにした。

1) K. Kirimura, et al., Comprehensive Biotechnology (2nd ed.), p. 135-142 (2011).
2) Y. Honda, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., **75**, 1594-1596 (2011).

Aspergillus niger, oxaloacetate hydrolase, oxalic acid production

講演番号：3C23a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎23会場

Pseudomonas sp. WU-0701由来アコニット酸イソメラーゼの酵素的諸性質の検討と遺伝子クローニング

Purification, Characterization and Gene Cloning of Aconitate Isomerase from *Pseudomonas* sp. WU-0701

○米原 広海、本田 裕樹、服部 貴澄、桐村 光太郎（早大理工・応化）
○Hiromi Yonehara, Yuki Honda, Takasumi Hattori, Kohtaro Kirimura (Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】アコニット酸イソメラーゼ（EC 5.3.3.7）は、二重結合の転移によって*cis*-アコニット酸と*trans*-アコニット酸の異性化反応を触媒する酵素である。本酵素によって生成される*trans*-アコニット酸は、機能性高分子原料としての利用が期待される有機酸であり、本酵素を利用することでバイオプロセスによる*trans*-アコニット酸の生産が可能と考えられる。コムギやトウモロコシ等の植物や*Pseudomonas*属等の一部の微生物において本酵素の存在が報告されているが、酵素的諸性質や遺伝子に関しては未解明である。本研究では、*Pseudomonas* sp. WU-0701由来のアコニット酸イソメラーゼに関して、酵素精製、酵素的諸性質の検討および遺伝子クローニングを行った。
【方法および結果】クエン酸を唯一の炭素源として利用可能で*trans*-アコニット酸を生産する細菌を探索し、土壌より単離した*Pseudomonas* sp. WU-0701の細胞内にアコニット酸イソメラーゼ活性を検出した。当該細菌の無細胞抽出液から、CM-Sepharose FF陽イオン交換、Bio-Scale CHT5-Iヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー、Superdex 200カラムゲルろ過クロマトグラフィーを利用してアコニット酸イソメラーゼを比活性として305倍に精製した。精製酵素は、ゲルろ過クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEにより分子量25 kDaを示すため、単量体の酵素と推定された。精製酵素を利用した*cis*-アコニット酸を基質とする*in vitro*反応により、最適反応pHを6.0、最適反応温度を37°Cと決定した。さらに、精製酵素のN末端アミノ酸配列に基づいてアコニット酸イソメラーゼをコードする遺伝子をクローニングして塩基配列を決定した。この遺伝子は786 bpの翻訳領域を含み、22アミノ酸から成るシグナルペプチドを含む262アミノ酸から成るポリペプチドをコードしていた。この遺伝子を大腸菌発現系を利用して高発現させ、組換え酵素を可溶性タンパク質として取得した。以上より、*Pseudomonas* sp. WU-0701由来アコニット酸イソメラーゼを精製酵素として取得し、その酵素的諸性質を明らかにするとともに遺伝子クローニングと異種発現に成功した。

aconitate isomerase, *Pseudomonas* sp., citric acid

講演番号:3C23a10
講演日時、会場:3月24日10:49～ C校舎23会場

油糧微生物*Mortierella alpina* 1S-4由来アシルCoA合成酵素遺伝子の過剰発現による脂質生産性向上

Improvement of lipid production by overexpression of acyl-CoA synthetase genes from *Mortierella alpina* 1S-4

櫻谷 英治、○浅岡 卓也、安藤 晃規[1]、落合 美佐[2]、小川順(京大院農・応用生命、[1]京大・生理化学ユニット、[2]サントリーHD)

Eiji Sakuradani, ○Takuya Asaoka, Akinori Ando, Misa Ochiai[1], Jun Ogawa (Kyoto Univ., [1]Suntory Ltd.)

【目的】糸状菌 *M. alpina* 1S-4 は、炭素鎖長 20 の高度不飽和脂肪酸を生産するだけでなく、脂質蓄積能もきわめて高い。アシル CoA 合成酵素 (acyl-CoA synthetase, ACS)は ATP を利用して遊離脂肪酸をアシル CoA に活性化する酵素であり、脂質の変換・蓄積に重要な役割を担う。*M. alpina* 1S-4 には、12 個の ACS が存在することを見いだしており、本研究ではこれら酵素遺伝子を過剰発現させることで、個々の酵素の脂質生産性への影響を評価した。

【方法と結果】

パーティクルガン法により、個々の ACS 遺伝子を *M. alpina* 1S-4 に導入し、形質転換株を取得した。液体培養により得られた菌体の脂質を定性・定量分析したところ、脂質生産性向上に寄与する 4 つの ACS (ACS1、ACS2、ACS10、ACS11) を見いだした。さらに、定量 PCR により、3 つの ACS 遺伝子過剰発現株 (ACS1 株, ACS10 株, ACS11 株)において、各 ACS 遺伝子転写量の増大が確認された。経時的に脂質生産を測定したところ、培養 12 日目において、アラキドン酸生産量と脂質生産量が、コントロール株に対してそれぞれ ACS10 株では 2.5 倍と 1.6 倍に、ACS11 株では 2.5 倍と 1.5 倍に向上した。

Mortierella alpina, acyl-CoA synthetase, lipid production

講演番号:3C23a11
講演日時、会場:3月24日11:10～ C校舎23会場

乳酸菌における不飽和脂肪酸の飽和化反応に関わる鍵酵素の発見

Discovery of the key enzyme for the saturation of unsaturated fatty acids in the lactic acid bacteria

○岸野重信[1,2]、横関健三[2]、清水昌[1,3]、小川順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]京都学園大・バイオ環境）

○Shigenobu Kishino[1], Kenzo Yokozeki[1], Sakayu Shimizu[1,2], Jun Ogawa[1]（[1]Kyoto Univ.、[2]Kyoto Gakuen Univ.）

【目的】乳酸菌は、古来よりヒトと関係の深い微生物であり、現代においてもプロバイオティクスの観点から食品分野や医薬品分野において注目を集めている微生物である。特に、乳酸菌の脂肪酸代謝は、腸内細菌の生理学的・栄養学的機能に重要な役割を担うと予想されるにもかかわらず、詳細に検討した研究はこれまでほとんど存在していない。

そこで我々は、乳酸菌の脂肪酸代謝解明を目的とし、不飽和脂肪酸変換能が高い乳酸菌の探索を行った。その結果、リノール酸(*cis*-9,*cis*-12-18:2)を効率よく共役リノール酸(*cis*-9,*trans*-11-18:2, *trans*-9,*trans*-11-18:2)へと変換する乳酸菌*Lactobacillus plantarum*を取得した。以前より、嫌気性細菌における不飽和脂肪酸代謝の１つとして、二重結合の共役化を経る飽和化反応が報告されていたことから、本菌におけるリノール酸の共役リノール酸への変換に関わる酵素の同定および反応機構の解析を起点とする飽和化反応系の解明に取り組んだ。その結果、リノール酸から共役リノール酸への反応は、見かけ上は二重結合の転移反応であるが、水和・脱水、酸化・還元、二重結合の転移など３つの酵素が関与する複数の反応から成り立っていることを世界で初めて明らかにした。さらに、共役化酵素とリンクする飽和化酵素の同定、ならびに飽和化反応経路の解明に成功した。

【方法・結果】我々はリノール酸を効率よく共役リノール酸へと変換する乳酸菌*Lactobacillus plantarum*を取得し、その反応機構を詳細に解析した。その結果、本反応はリノール酸を水和して10-hydroxy-*cis*-12-18:1を生成する反応を初発に、水酸基の酸化、二重結合の異性化、水酸基への還元、脱水と複数の反応を介して共役リノール酸へと変換することを明らかにした。また、これらの反応を触媒する３種類の酵素(CLA-HY, CLA-DH, CLA-DC)を同定し、さらに本酵素をコードする遺伝子配列を決定した[1),2)]。続いて本菌のゲノム配列より、決定した遺伝子配列と関係が示唆される遺伝子配列(*cla-er*)に注目し、CLA-ERを大量発現する形質転換大腸菌を作成した。作成した形質転換大腸菌より調整した精製酵素CLA-ERを用い、本酵素の機能解析を行ったところ、本酵素は乳酸菌における不飽和脂肪酸の飽和化反応の鍵酵素であることを明らかにした。本酵素は、飽和化代謝中間体の分子内エノン構造を認識し、二重結合を単結合へと飽和化する反応を触媒することを明らかにした。

1) S. Kishino et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75 (2), 318-322 (2011)
2) S. Kishino et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 416, 188-193 (2011)

saturation, lactic acid bacteria, fatty acid metabolism

講演番号：3C23a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ C校舎23会場

非天然カロテノイド経路における不飽和化酵素の進化分子工学

Directed evolution of phytoene desaturase in non-natural carotenoid pathways

○古林 真衣子、李 伶、高市 真一[1]、斎藤 恭一、梅野 太輔
（千葉大院・工・共生応化、[1]日本医科大・生物）
○Maiko Furubayashi, Ling Li, Shinichi Takaichi[1], Kyoichi Saito, Daisuke Umeno
（Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ., [1]Biol. Lab., Nippon Med. Sch.）

【目的】カロテノイドは自然界に約750種類存在する天然色素の一群である．抗酸化作用，抗腫瘍作用，食品色素，光合成機能等の多様な生理活性が知られている．カロテノイドの色素としての性質は，分子内に存在する長い共役二重結合に由来し，その色と抗酸化機能は，二重結合の共役長さに強く依存している．天然のカロテノイドはC40またはC30のカロテノイド骨格をもち，それぞれは最大で15および11の共役二重結合を持つことができる．本研究では，我々がこれまでに生物生産に成功したC35やC45，C50，C60などの非天然骨格カロテノイドをベースにした，さまざまな色素化合物の生産を目指し，これら非天然カロテノイドの不飽和化酵素の開発を試みた．
【方法・結果】フィトエン不飽和化酵素（phytoene desaturase，CrtI）は，フィトエンの骨格中心にある共役した３つの二重結合を認識し，４ステップの脱水素化反応によってリコペンを合成する．これまでの研究で，*Pantoea ananatis*由来のCrtIが僅かながらにC50カロテノイドを不飽和化することが明らかになっている．そこでこの酵素を，C50経路で効率的に働かせるための進化工学実験を行った．まず，大腸菌に，C25PP合成酵素（*Geobacillus stearothermophillus*由来のファルネシル二リン酸合成酵素のサイズ変異体）とC50骨格合成酵素（*Staphylococcus aureus*由来のC30カロテノイド合成酵素のサイズ変異体）を共発現させ，C50骨格のカロテノイドを選択的に合成する経路を大腸菌内に確立した．ここに，CrtI野生型酵素を共発現させたところ，不飽和化C50カロテノイドはほぼ検出されなかった．そこで，このCrtIに変異PCR法によってランダム変異を導入してCrtIライブラリを調製し，これを，上述の選択的なC50骨格経路をもつ大腸菌に形質転換した．約2,000コロニーの中から，細胞色が赤くなったコロニーを６つ選択し，プラスミドを回収してCrtI変異体を得た．これらのCrtI変異体は，C50カロテノイド骨格を効率よく不飽和化し，C40カロテノイドのlycopene（11個の共役二重結合，赤色）よりも４つ長い共役二重結合をもつ，C50-lycopene（15個の共役二重結合，赤紫色)を効率よく合成することができた．その配列・機能分析から，CrtIの全492アミノ酸中，304，338，339番目のアミノ酸置換が，C50活性の向上に寄与することが分かった．本講演では，これら３つの部位のアミノ酸総置換（site saturation）の結果，得られた変異体群のC30，C35，C40,C50骨格経路における活性と反応ステップ数などについての網羅的分析の結果を示し，CrtI酵素のサイズ選択性，ステップ数の制御機構について得られた知見を報告する．

metabolic engineering, directed evolution, unnatural carotenoid

講演番号：3C23a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ C校舎23会場

基質消費活性スクリーニングを用いたゲラニオール合成酵素の進化工学

Directed evolution of GES by the screening based on substrate consumption

○ 岩嵜 美希，梶原 順，生悦住 茉友，古林 真衣子，斎藤 恭一，梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）

○ Miki Iwasaki, Jun Kajiwara, Maiko Furubayashi, Mayu Ikezumi, Kyoichi Saito, Daisuke Umeno (Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.)

【目的】テルペンは，多様な構造を持つ天然化合物群であり，医薬品や香料として有用な化合物を多数含む。テルペンの生物生産を効率的におこなうためには，テルペン合成酵素の異種細胞内での活性の向上が必須である。しかしながら，無色で複雑な構造を持つテルペンの合成活性をハイスループットに評価する方法がないために，テルペン酵素の細胞内での活性を高める試みは例がなかった。本研究では，テルペン合成酵素の細胞内活性を基質消費活性によってスクリーニングする手法を用いて、ゲラニオール合成酵素（GES）の活性向上を試みた。

【方法と結果】カロテノイド色素の生合成経路(黄色ブドウ球菌由来のCrtM, CrtN)を持つ大腸菌株は，カロテノイド色素の蓄積により細胞が黄色に着色した。この大腸菌株にテルペン合成酵素を追加発現すると，カロテノイド経路からテルペン酵素が前駆体を奪い，無色のテルペンを合成する。このため，細胞色が黄色から白色に変化した。こうして、テルペン合成酵素の細胞内での活性を基質消費能として（細胞色の黄色→白色への変化として）可視化できることがわかった。この色スクリーニングを用いて，GESの活性向上を試みた。まず，GESのN末端側にあるシグナルペプチド付近を様々な長さで削り込み、それぞれカロテノイド経路を持つ大腸菌株に共発現した。その細胞色の観察によって、活性を維持しつつ除去できるN末端領域を特定することができた。中には、野生型GESより活性の強いものも複数見いだされた。つづいて，GESの活性ドメインを変異PCRによってライブラリ化し，カロテノイド経路を持つ大腸菌株に形質転換し、固体培地に植菌した。白いコロニーを形成するGES変異体を単離し，大腸菌株の培養液抽出物をGC分析したところ，有意なゲラニオール合成量の向上が確認できた。

Keyword1 terpene, Keyword2 directed evolution, Keyword3 high-throughput screening

講演番号：3C23a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ C校舎23会場

生体触媒として微生物を用いた xanthohumol の変換

Biotransformation of xanthohumol by fungi as a biocatalyst.

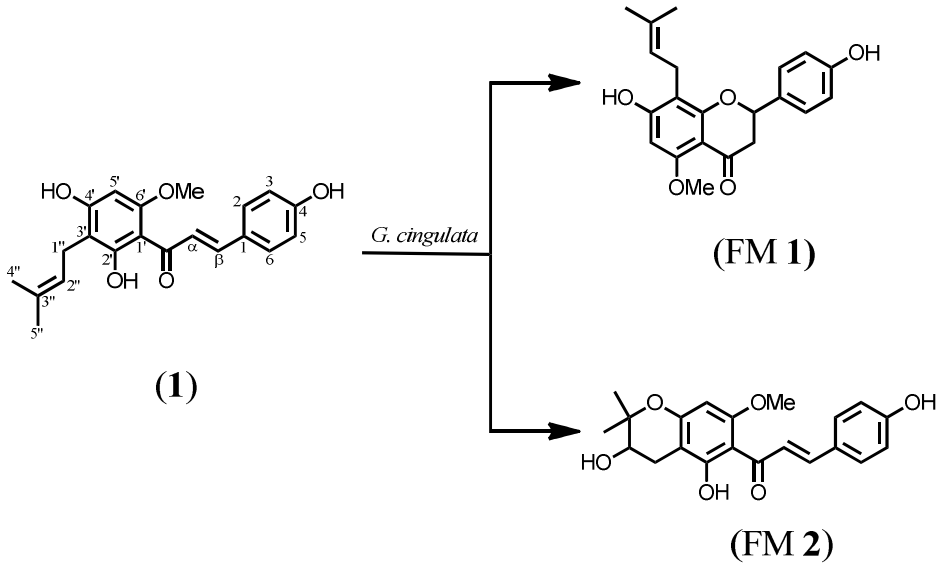
○宮澤　三雄、鹿島　悠生（近畿大・理工）
○Mitsuo Miyazawa, Yusei Kashima (kinki dai)

【目的】ホップ (*Humulus lupulus*) は大麦と並んでビールの重要な原料であり、ビールに独特の香りと苦味を与え、雑菌の繁殖、ビールの腐敗を防ぐといった大切な役割を果たしており、機能性を持つ物質が多く含まれる。ホップの構成成分の一つであり、主要成分である xanthohumol はフラボノイド中のカロコン類に属し、黄色、無臭の物質である。生理活性は、ガン細胞の増殖抑制、抗変異原作用、抗酸化作用、抗高脂血症作用、抗菌・抗カビ作用等が知られている。

ビールを摂取することで xanthohumol (**1**) は血液を介して肝臓に到達し、ヒトシトクロム P450 酵素群により変換を受け、様々な生理活性を発現すると考えられる。しかし、変換生成物の化学構造等について未だ未解明な部分が多い。そこで本研究では、xanthohumol を用いて、生体触媒 (*Glomerella cingulate*) を用いた変換反応を行い、ヒト体内での代謝の全貌を明らかにすべく、検討を行った。

【方法】*G. cingulate* を 300 ml の培地に植菌後、xanthohumol (**1**) を 0.3 mg/ml の濃度でそれぞれ添加し、27°Cで7日間回転培養による微生物変換を行った。変換生成物を TLC により経時的に追跡し、2種の変換生成物 (FM**1**、FM**2**) を確認した。

【結果】各種スペクトルデータから FM**1** は 2’位水酸基が β位炭素と閉環化反応した isoxanthohumol であると決定した。また FM**2** は、生体内の酵素反応によるプレニル基の 2”位、3”位二重結合がエポキシ化され、4’位の水酸基が 3”位に求核置換反応を起こし、テトラヒドロピラン環に変化した xanthohumol B であると決定した。



Glomerella cingulate, xanthohumol, biotransformation

講演番号：3C23p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ C校舎23会場

ピペリジン誘導体の立体異性体生産に有用なカルボニル還元酵素の探索及び立体選択性の評価

Screening and characterization of carbonyl reductases producing piperidine derivates stereoselectively

日比　慎、○脇田　祐太[1]、野田　哲治[2]、佐々木　美江[2]、詫摩　勇樹[2]、横関　健三、清水　昌[1]、小川　順[1]
（京大院農・産業微生物、[1]京大院農・応用生命、[2]有機合成薬品工業㈱）
Makoto Hibi, ○Yuta Wakita[1], Tetsuji Noda[2], Mie Sasaki[2], Yuki Takuma[2], Kenzo Yokozeki, Sakayu Shimizu[1], Jun Ogawa[1] (Ind. Microb., Grad. Sch. Agri, [1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agri.,Kyoto Univ, [2]Yuki Gosei Kogyo Co., Ltd.)

【目的】
ピペリジン誘導体は様々な化合物の原料として、産業的に有用な物質である。ピペリジン誘導体の1つである1-benzyl-4-oxopiperidine-3-carboxyalte（1BPDエステル）のケト基還元体にはそれぞれ4つの立体異性体が存在しており、各立体異性体はそれぞれ様々な医薬品合成における有用な中間体となりうる。1BPDエステルは水中で容易にラセミ化する性質を持っていることから、基質の立体認識性及び還元反応の立体選択性が高いカルボニル還元酵素を利用する事で、単一の立体異性を持つ1BPDエステル還元体を高純度・高収率で得ることができる。そこで、1BPDエステルのケト基を不斉還元する微生物及びカルボニル還元酵素の探索及び、HPLCを用いた生成還元体の立体異性の評価を行った。
【方法】
土壌単離菌及び我々が収集した様々なカルボニル還元酵素群の内より、基質である1BPDエステルの立体認識性及びケト基の還元反応の立体選択性の高い触媒の探索を試みた。土壌単離菌の休止菌体及び、カルボニル還元酵素群の大量発現大腸菌の無細胞抽出液を1BPDエステルを含む反応液に供した。生成した還元体の立体異性は、ODSカラム及びキラルカラムを用いたHPLC分析系を用いて評価した。
【結果】
スクリーニングの結果、高い1BPDエステルの立体認識性及び還元反応の立体選択性を持つ物として、土壌単離菌、CP130株、及び2種のカルボニル還元酵素、Glucose dehydrogenase（GDH）、Menadione reductase （ETMR）を見い出した。CP130株、GDH、ETMRの生成する1BPDエステル還元体の立体異性をHPLC分析系により推定した結果、CP130株は*cis*体（3*R*,4*S*）、GDHはいずれかの*trans*体、ETMRは*cis*体（3*S*,4*R*）を高い立体選択性で生成すると考えられた。

carbonyl reductase, stereoselective, piperidine derivate

講演番号：3C23p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ C校舎23会場

不斉還元による含フッ素光学活性アルコールの生産

Production of fluorinated chiral alcohol by aymmetric reduction

○三橋 和也、林 素子、松山 彰収（ダイセル・グリーンプロダクト開発センター）
○Kazuya Mitsuhashi, Motoko Hayashi, Akinobu Matsuyama (Daicel GDC)

【目的】光学活性な 3’,5’-ビス(トリフルオロメチル)フェニルエタノール（BTFPE）は、医薬品原料として重要なキラルアルコールであり、高い光学純度が求められている。酵素を用いた不斉還元はそこで、3’,5’-ビス(トリフルオロメチル)アセトフェノン（BTFAP）を原料とした製法を検討した。

【方法】（株）ダイセルで保有する不斉還元酵素およびこれらを発現する組換え菌を使用して、BTFAP を基質に BTFPE を生成する酵素のスクリーニングを実施した。不斉還元反応の進行が見られた酵素およびそれらを発現する組換え菌を使用した反応条件の検討を行い、生産性を評価した。

【結果】1% BTFAP、1mM NADH、1mM NADPH、グルコース、ギ酸ソーダを含むリン酸バッファーに、各種起源の不斉還元酵素を添加し、25℃、終夜攪拌反応を行った。反応液から BTFAP、BTFPE を、酢酸エチルで抽出し、溶媒置換を行った後、キラルカラムを使用した HPLC により、その定量と光学純度測定を同時に実施した。その結果、Chiralscreen ※1 E001、E039、E092 において、反応の進行が見られ、E001、E092 が *S* 体の BTFPE を、E039 が *R* 体の BTFPE を、非常に高い選択性で生成していた。これら酵素を使用した反応条件の検討を行った結果、特に 2-プロパノールの添加により、顕著な収率向上効果が見られ、基質濃度 10%で、収率 95%以上で光学活性な BTFPE を得る条件を見出した。

E039 を生産する組換え菌を用いて反応した場合、補酵素 NADH の添加なしに、酵素反応と同様の収率を与えた。また、この場合でも、2-プロパノールの添加が有効であった。

※1：Chiralscreen は、（株）ダイセルより発売されている酵素キットであり、不斉還元酵素および補酵素再生酵素の混合物である。

asymmetric reduction, chiral alcohol, biocatalyst

講演番号：3C23p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎23会場

Ralstonia eutropha H16 株由来可溶型 NAD+還元型ヒドロゲナーゼを用いた *Escherichia coli* 内共役系構築

Construction of coupled enzyme reaction in *Escherichia coli* with the use of NAD+ reducing hydrogenase derived from *Ralstonia eutropha* H16

○加藤 聖樹、二俣 翔、新井 博之、石井 正治、五十嵐 泰夫（東大院農生科・応生工）
○Masaki Kato, Natsuru Futamata, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi(Univ. Tokyo, Nouseika, Ouseikou)

我々は水素細菌 *Ralstonia eutropha* H16 株の持つ可溶性 NAD^+還元型ヒドロゲナーゼ（soluble hydrogenase、以下 SH）の有効利用を目指している。SH は分子状水素依存の NAD^+→NADH の還元反応を触媒するが、基質として安価な水素しか必要でない上に反応プロセスにおける副産物がプロトンのみなので、工業的に見て魅力的な酵素である。これまでに我々は *Escherichia coli* 内における活性型 SH の異種発現に成功している。今回の発表ではその異種発現 SH を用いた二酵素共役反応系構築について報告する。

SH と共役させる酵素として *Kluveromyces lactis* 由来アルコールデヒドロゲナーゼ(以下 KLB)を用いた。KLB は補酵素 NAD(P)H を触媒としてアセトインやアセトールなどのケトン類をアルコール類に還元する。水素気相条件下において SH が NAD^+再生系として働くため、SH と KLB の共役系においては継続的なケトン還元反応が理論上可能となる。

それぞれ別のプラスミドを用いて SH と KLB を *E. coli* に導入した。形質転換した *E. coli* を嫌気条件で生育させて得た無細胞抽出液において、水素依存の NAD^+還元活性及びアセトール依存の NADH 酸化活性が確認された。これは *E. coli* において SH と KLB 両方の異種発現が成功していることを示す。

本発表においては*in vitro*、*in vivo*における物質生産性を検討した結果についても報告する。

hydrogenase、NAD^+、coupled reaction

講演番号:3C23p05
講演日時、会場:3月24日14:33～ C校舎23会場

メタゲノムを用いた酸化還元酵素遺伝子の探索とその応用

Screening of oxidoreductase gene from metagenome and its application

○礒谷 健太郎、石母田 剛、加藤 真輝、黒川 純司、牧野 祥嗣、伊藤 伸哉(富山県大･工･生工)
○Kentaro Isotani, Tsuyoshi Ishimoda, Masaki Kato, Junji Kurokawa, Yoshihide Makino, Nobuya Itoh (Toyama Prefectural University)

【目的】*Leifsonia* sp. S749由来のアルコール脱水素酵素 (LSADH)は、NADHを補酵素として各種ケトン、α-ケトエステル、β-ケトエステルよりキラルアルコールを生産可能な、短鎖脱水素還元酵素 (SDR) ファミリーに属する酵素である。[1] また、LSADHは2-propanolを水素供与体として補酵素の再生が可能という特徴を有している。多様なケトンの不斉還元ができるLSADHの類縁酵素遺伝子を土壌DNA(メタゲノム)からPCRを用いて直接的に取得し、大腸菌による酵素発現の後、各種基質に対する活性を測定し、LSADHとの比較評価を行うことを目的とした。

【方法】LSADH 及び系統樹から LSADH と相同性の高い *Pseudomonas* sp. の SDR 配列情報を基にプライマーを作製し、土壌から抽出したメタゲノムを鋳型に PCR を行った。増幅した DNA を pUC 系ベクターである pHAR1 [2]にクローニングし、大腸菌による発現とシーケンス解析を常法により行った。得られた ADH 酵素を用いて各種基質の変換を行い、変換率、鏡像体過剰率、絶対配置を調べた。

【結果】メタゲノムからの LSADH 相同性遺伝子の単離は当初困難であった。そこで、主に *Pseudomonas* ADH のスクリーニングを行った。その結果、*Burkholderia* sp. 由来の 3-hydroxybutanoate ester dehydrogenase と 89-98 %の相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子及び *Pseudomonas* sp. 由来の短鎖アルコール脱水素酵素と 80-96 %の相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子、28 種類 (HBuADH-1～16 / HPsADH-17～28) が得られた。これら、いずれの酵素も LSADH と同様に NADH 存在下、trifluoroacetophenone を(*S*)-体アルコールに還元した。内 5 種は LSADH が不活性なケトンである ethyl benzoylformate に反応し、HBuADH-1 での変換実験において 80.2 % e.e. で(*R*)-ethyl mandelate が得られた。また、chloroacetone に対しても LSADH よりも高い立体選択性で(*R*)-1-chloro-2-propanol が合成された。メタゲノムより LSADH とは異なる変換能を示す酵素を見出すこと成功し、その有効性を確認した。

1) K. Inoue et al., (2005) *Tetrahedron: Asymmetry*, 16:2539-2549.
2) Y. Makino et al., (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77:833-843.

metagenome, alcohol dehydrogenase (ADH), Pseudomonas

講演番号:3C23p06
講演日時、会場:3月24日14:44～ C校舎23会場

フェニルアセトアルデヒド還元酵素（PAR)相同遺伝子のメタゲノムスクリーニングとその解析

Screening and characterization of homologous genes of phenylacetaldehyde reducatse (PAR) from soil metagenome

○伊藤 伸哉、礒谷　健太郎、竹内　奈美、牧野　祥嗣、大段　友美、黒川 純司（富山県大・工・生物工）

○Nobuya Itoh, Kentaro Isotani, Nami Takeuchi, Yoshihide Makino, Tomomi Oodan, Junji Kurokawa (Toyama Pref.Univ.)

【目的】Phenylacetaldehyde reducatse (PAR)は水素移動型不斉還元触媒として有用な酵素であり、各種ケトンから光学活性なアルコールを高効率で生産できる。[1] しかしながら、同酵素の基質とならない化合物や立体選択性の低い化合物も幾つか存在し、光学活性アルコールを多品種生産するためには、当該酵素のアナログ酵素ライブラリーが必要と考えられた。そこで、土壌メタゲノムから、当該酵素遺伝子のアナログ酵素遺伝子の分離と解析を試みた。

【方法】土壌サンプルより、ISOIL for Beads Beating™(ニッポンジーン社)を用いて約80種の土壌よりメタゲノムを取得した。プライマーはPARのN末端の相同性の高い配列部分を、C末端は同端から数アミノ酸上流部の部分でベクターと結合できるように設計した。ベクターはpSAR268 [2] の酵素遺伝子部分を除き、Sar268(PARの極性有機溶媒高活性変異体)のキメラ酵素となり、且つC末端にHis-tagが組み込まれるように設計した。メタゲノムを鋳型として直接増幅した遺伝子を当該ベクターに組み込み、*E. coli*に形質転換、IPTG誘導後、それらの酵素活性、遺伝子配列を解析した。

【結果】約80サンプルの土壌（0.5g湿重量）より、平均3.5μg、最大25 μgのメタゲノムが取得できた。これらを鋳型にPCR増幅を行った結果、14サンプルに遺伝子増幅が認められた。これらの遺伝子を精製し上記ベクターに連結後、*E. coli*に形質転換した。任意で選択した約170個の*E. coli*形質転換体を、コロニーPCR及び酵素活性で確認し、約20個に目的の酵素活性が認められた。これらの遺伝子解析を行い、一部重複した遺伝子等を除くと、PARとアミノ酸配列の異なる相同性遺伝子が16個（HPARと命名）取得できた。これらを発現させ、各HPARの熱安定性や基質特異性を調べた結果、PARとは基質特異性や熱安定性が大きく変化した相同性遺伝子酵素群が取得でき、メタゲノムスクリーニングの有用性が確認された。

1) N.Itoh et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., DOI 10.1007/s00253-011-3447-4.
2) Y. Makino et al., Appl. Environ. Microbiol., 71:4713-4720 (2005).

mtagenome, phenylacetaldehyde reducatse, homologous gene

講演番号：3C23p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎23会場

白色腐朽菌*Hericium coralloides*由来ラッカーゼの諸性質と遺伝子クローニング

Characterization and cloning of laccase from white-rot fungi *Hericium coralloides*

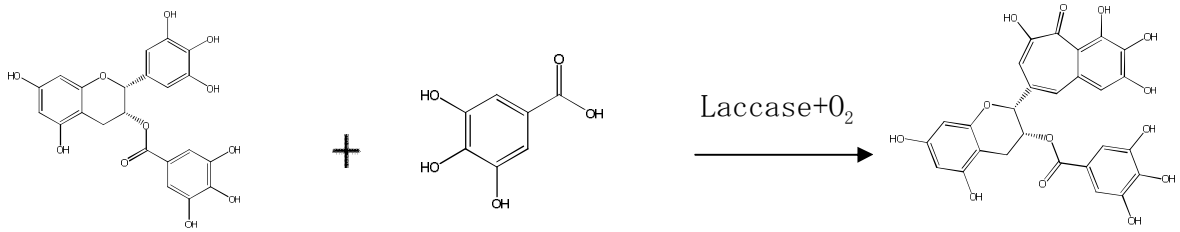
○高木 伸也、三木 亜沙美、黒川 純司、伊藤 伸哉（富山県大・工・生物工）
○Shinya Takagi, Asami Miki, Junji Kurokawa, Nobuya Itoh (Toyama Prefectural University)

【目的】緑茶カテキンに含まれるepigallocatechin gallate(EGCg)と没食子酸をラッカーゼで酸化させるとベンゾトロポロン環を持つepitheaflagallin 3-*O*-gallate(ETFGg)が生成する。[1] このETFGgは紅茶に含まれる微量成分であり、幾つかの有用な生理効果を示す茶ポリフェノールである。現在、エピテアフラビン類高含有茶の商品化を目的にラッカーゼダイワY120(*Trametes*属由来)を用いて酸化を行っているが当量反応が成立しておらず、その生産効率は必ずしも高くない。そこで、この反応に適したラッカーゼのスクリーニングを行い、ETFGg生産性の高いラッカーゼを見出し、その諸性質決定と遺伝子クローニングを行った。

【方法】主に担子菌154株からETFGg生産性の高いラッカーゼのスクリーニングを行った。高生産性を示したラッカーゼを各種クロマトグラフィーで精製し、基質特異性、至適pH等の諸性質を調べた。また、菌体からtotal RNAを抽出し、RACE法によってラッカーゼをコードする遺伝子をクローニングし、配列を決定した。

【結果】スクリーニングを行った結果、*Hericium coralloides* NBRC7716株の培養液において従来のラッカーゼダイワY120と比べ、約2倍のETFGg生産性を示すラッカーゼを見出した。この酵素を各種クロマトグラフィーを行い、単一なタンパク質として精製した。本酵素は2,2’-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)(ABTS)、2,6-dimethoxyphenol(DMP)、pyrogallol、*o*-catechol、gallic acid、*o*-guaiacolの順に活性を示した。至適pHは4.5、2価の鉄イオンとNaClによって活性が強く阻害されることが分かった。

ラッカーゼは銅イオンを有する酵素であり、銅結合に関わるアミノ酸配列を利用し、*H. coralloides*のゲノムよりPCRを用いてラッカーゼと相同性を示す塩基配列の一部分を得た。さらに、この配列を基にRACE法を用いてラッカーゼをコードする遺伝子の全長を決定した。得られた遺伝子は511アミノ酸数、分子量 55kDaのラッカーゼをコードしており、アミノ酸レベルで*Lentinula edodes*由来ラッカーゼと約77%の相同性を示した。



EGCg　　没食子酸　　ETFGg

1) N. Itoh *et al.*, Tetrahedron, 63, 9488(2007)

laccase, epitheaflagallin 3-*O*-gallate, *Hericium coralloides*

講演番号：3C23p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎23会場

ラッカーゼが触媒する不飽和脂肪酸の炭素-炭素結合開裂反応によるジカルボン酸生産

Cleavage of unsaturated fatty acids by laccase for dicarboxylic acid production

○竹内　道樹[1]、岸野　重信[1,2]、日比　慎[2]、小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物）

○Michiki Takeuchi, Shigenobu Kishino, Makoto Hibi, Jun Ogawa (Kyoto University)

【目的】

ラッカーゼは、酸素を電子受容体として幅広い基質に作用する酸化酵素であり、微生物が生産するラッカーゼは、自然界では主に木材の主要構成成分であるリグニン分解に関与し、木材の腐敗分解プロセスにおいて重要な働きを担っている。産業的には、ダイオキシンなどの難分解性環境汚染物質の分解、パルプ漂白、洗濯時の色移り防止、口臭予防などに利用されており、応用性の高い産業用酵素として注目を集めている。我々は、以前より微生物機能を用いた不飽和脂肪酸の新規変換反応の探索とその解析研究を行っており、不飽和脂肪酸の水和・脱水反応や異性化反応、不飽和化反応、飽和化反応など、多種多様な新規反応を見いだしている。本研究は、その一環として、ラッカーゼを用いた不飽和脂肪酸変換反応について検討した。

【方法・結果】

本研究では、当研究室保存*Trametes* sp. Ha1株由来のラッカーゼを触媒として用いた。様々な二重結合位置や水酸基、カルボニル基などの置換基を有する炭素数18の不飽和脂肪酸（約10 mM）を基質とし、メディエーターである1-hydroxybenzotriazoleと共に反応に供した。反応は、100 mMコハク酸バッファー（pH 4.0）を用い、37° C、300 rpm、好気条件下で24時間行った。反応後、反応液より基質や生成物を10%メタノール含有酢酸エチルで抽出し、遠心エバポレーターで濃縮した後、4%塩酸メタノール、ジクロロメタンを加え、50° Cで20分間インキュベートしてメチル化を行った。得られたメチルエステル化産物を抽出・濃縮したのち、アセトニトリルに溶かし、ガスクロマト（GC）分析に供した。様々な不飽和脂肪酸基質を用いて反応を行った結果、すべての基質において基質よりも炭素数の少ない化合物の生成が示唆された。そこで、未知化合物の同定をGC-MS分析により試みたところ、標品とのGC保持時間やMSスペクトルの比較から、生成物は酸化的な炭素-炭素結合開裂により生成するジカルボン酸（リノール酸基質の場合、炭素数9のジカルボン酸）であることがわかった。また、開裂位置は二重結合位置や置換基の位置に影響を受けていることがわかった。さらに、反応条件の検討を行ったところメディエーターの濃度が高いほどジカルボン酸の生成量が増加することがわかった。

dicarboxylic acid, laccase, unsaturated fatty acid

講演番号：3C23p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎23会場

放線菌*Streptomyces griseus*由来シトクローム P450の網羅的機能解析

Comprehensive functional analysis of cytochrome P450 from *Streptomyces griseus*

○牧野 拓也、大野 翔登、音松 俊彦[1]、原田 尚志[1]、三沢 典彦[2]、大西 康夫（東大院農生科・応生工、[1]神戸天然物化学、[2]石川県大生資研）

○Takuya Makino, Shoto Ohno, Toshihiko Otomatsu[1], Hisashi Harada[1], Norihiko Misawa[2], Yasuo Ohnishi (Tokyo Univ., [1]KNC Lab Co., Ltd., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【背景・目的】シトクローム P450 (P450)は医薬品や化成品原料の微生物変換プロセスに有用な酵素として注目されている。抗生物質を始めとした多種多様な生理活性物質の生産菌として知られる放線菌は、他の細菌と比べて非常に多くの*P450*遺伝子をもっている。ストレプトマイシン生産放線菌*Streptomyces griseus*は27種類の*P450*遺伝子を保有しているが、触媒機能が解明された分子種は僅か1つのみであった。*S. griseus*のP450の網羅的機能解析を通して、新たな触媒機能をもつP450を見出すことを目指した。【方法・結果】放線菌を始めとする細菌由来のP450がモノオキシゲナーゼとして機能するには、通常、NAD(P)H由来の電子をP450に伝達する電子伝達タンパク質とその電子伝達タンパク質を還元する酵素(両者をまとめてP450還元酵素とよぶ)が必要である。我々はまず始めに、放線菌P450を*Rhodococcus*由来のP450還元酵素ドメインとの融合タンパク質として大腸菌で生産させる系(pREDベクター系)を用いた。組換え大腸菌を含むリン酸緩衝液を用いて、81種類の基質候補化合物の変換試験を行い（変換産物の検出には、HPLC-PDAまたはHPLC-PDA-ESI-MS/MSを利用)、次の3つのP450、CYP107CA1、CYP154C3、CYP105D2が、それぞれindole、steroid 類、diclofenac sodiumを変換できることを見出した。このうち、極めて高い変換効率を示したCYP154C3によるsteroid類のD環16α位の水酸化に関しては昨年度の本大会において発表した（2011年度日本農芸化学会大会講演要旨集p.276)。今回、残り2つのP450について、放線菌由来の電子伝達タンパク質とその還元酵素を利用して、変換効率を上げることを試みた。*S. griseus*は6種類の電子伝達タンパク質と5種類の電子伝達タンパク質還元酵素を有している。diclofenac sodiumを変換できることが示されたCYP105D2については、これらを組み合わせて（30通り)、nativeな状態のP450とともに大腸菌で生産させ、diclofenac sodiumのバイオコンバージョンを試みた。その結果、pREDベクター系を用いた場合には基質変換効率が3.1%であったものが、35.1%と約11倍の変換効率が得られる電子伝達タンパク質とその還元酵素の組み合わせを見出すことに成功した。変換産物の構造をHRESI-TOF-MSおよびNMRで解析した結果、ヒトのP450であるCYP2C9や他の放線菌属で知られているいくつかのCYP105と同様に4’位の水酸化を担うことが判明した。また、CYP107CA1に関しても、同様の検討を行っている。放線菌の電子伝達タンパク質と電子伝達タンパク質還元酵素を利用した大腸菌でのP450の活性発現系の有効性について考察する。

Cytochrome P450 monooxygenase, Hydroxylation, *Streptomyces griseus*

講演番号：3C23p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎23会場

紅藻オゴノリ由来シクロオキシゲナーゼ(*COX*)遺伝子の単離と組換え大腸菌によるプロスタグランジンの生産

Identification of a cyclooxygenase gene from the red alga *Gracilaria vermiculophylla* and bioconversion of arachidonic acid to $PGF_{2\alpha}$ in engineered *E. coli*

○金本　浩介、竹村　美保、大山　莞爾（石川県立大・生物資源研）
○Hirosuke Kanamoto, Miho Takemura, Kanji Ohyama (Ishikawa Prefectural Univ.)

【目的】プロスタグランジン(Prostaglandin, PG) は動物の局所ホルモン（オータコイド）の１つで、その優れた生理活性から医薬品として利用されている。プロスタグランジンは主に化学合成や天然物からの抽出により製造されているが、より安価で安定した生産方法の確立が必要とされていた。それに対し生物が本来持つ機能を利用したプロスタグランジン生産方法の開発は医薬品を生産するための有用な技術として期待される。これまでに紅藻オゴノリ(*Gracilaria vermiculophylla*) においてプロスタグランジンの生合成が報告されているが、その生合成遺伝子については明らかにされておらず、解明が待たれていた。本研究では、オゴノリからのプロスタグランジン合成の初発反応に関わるシクロオキシゲナーゼ(*COX*)遺伝子の単離および同遺伝子を用いたプロスタグランジン生産への利用展開を目的とした。
【方法】紅藻*Gracilaria changii*のESTに登録されている*COX*相同遺伝子の部分塩基配列を基に縮重プライマーを設計し、オゴノリのtotal RNAからRT-PCR法によりオゴノリ由来*COX*相同遺伝子(*GvCOX*)の部分塩基配列を単離した。この部分塩基配列情報から 5'-, 3'-RACE法により*GvCOX*遺伝子の全長を決定した。pET21aベクターの*Nde*I, *Bpu*1102Iサイトに*GvCOX*遺伝子を導入し、大腸菌BL21(DE3)株にて組換えCOXタンパク質の発現を行った。次に、組換え*GvCOX*大腸菌の抽出液にアラキドン酸を添加して反応生成物を得た。その生成物を$SnCl_2$ により還元後、生成物中のプロスタグランジン$F_{2\alpha}$（$PGF_{2\alpha}$）をLC-MS/MSを用いて検出することによりGvCOXタンパク質の活性を調べた。一方、LB培地で培養した組換え*GvCOX*大腸菌に 100 μMのアラキドン酸を添加した後、一定時間培養することによってプロスタグランジンの生産を行った。
【結果】本研究によって藻類（植物）からの*COX*遺伝子単離に初めて成功した。オゴノリ由来*COX*遺伝子のコード領域は 1,689 bp、その塩基配列から予想されるタンパク質の分子量は 67.4 kDaであった。これまでに報告されている動物COXのアミノ酸配列との比較では、ヘム結合ドメインの保存性は認められたが、糖鎖付加サイトについては保存性がないなど動物COXとの相同性は低かった。また大腸菌での組換えGvCOXタンパク質の発現では、アラキドン酸の添加により$PGF_{2\alpha}$が検出されたことから、GvCOXがCOX活性を示すことが明らかとなった。さらに、この組換え大腸菌の培養液にアラキドン酸を添加することにより、培地中に 2.7mg/Lの$PGF_{2\alpha}$を蓄積させることができた。以上の結果、組換え大腸菌を利用した$PGF_{2\alpha}$の生産はプロスタグランジンの大量生産への道を拓く技術として期待された。本研究は、生研センター異分野融合研究事業によるものである。

prostaglandin, cyclooxygenase, bioconversion

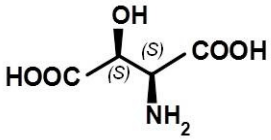
講演番号：3C23p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ C校舎23会場

酵素法による光学活性3-ヒドロキシアスパラギン酸異性体の調製

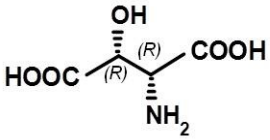
Preparation of optically active 3-hydroxyaspartate isomers by enzymatic resolution

○武田 由希、田中 修、横田 篤、和田 大 (北大院農・応生科)
○Yuki Takeda, Osamu Tanaka, Atsushi Yokota, Masaru Wada (Hokkaido Univ.)

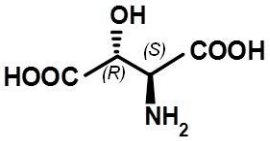
【目的】3-ヒドロキシアスパラギン酸 (HA) とその誘導体は医薬品やその原料として期待されているが、4種の異性体の立体選択的合成は困難である。特にL-*threo*体の誘導体は哺乳類脳の興奮性グルタミン酸トランスポーターの競争阻害剤として注目される。本研究ではHAに立体選択的に働く2種類の微生物デヒドラターゼを用いた光学分割により、光学的に純粋な3種のHA異性体、L-*threo*体、D-*threo*体、D-*erythro*体をそれぞれ調製することを目的とした。
【方法】HAのD-*threo*体とL-*erythro*体を選択的に分解する*Delftia* sp. HT23由来D-*threo*-HAデヒドラターゼ (D-THA DH) を用いて、DL-*threo*体およびDL-*erythro*体の光学分割を行った。組換えD-THA DHの大腸菌における発現量が光学分割に使用するには不十分であったため、発現系を検討した。またHAのL-*threo*体のみを特異的に分解する*Pseudomonas* sp. T62由来L-*threo*-HAデヒドラターゼ (L-THA DH) を用い、DL-*threo*体の光学分割も行った。組換えL-THA DHは*E. coli* JM109によって発現させた。酵素反応液は基質初濃度200 mMで調製し、酵素の添加により光学分割を開始した。GITC法を用いたHPLCおよびアミノ酸アナライザにより異性体比とその総濃度を調べ、反応の経時変化を追跡した。分割後のHAは反応液のpHを2.0に調整し、減圧濃縮後に4℃に放置することにより再結晶化させて回収した。
【結果】D-THA DH の発現宿主を放線菌 *Rhodococcus erythropolis* L88 に変更すると、粗酵素活性が 10 倍以上に上昇した。これより本発現系を用いて D-THA DH を調製し光学分割に用いた。DL-*threo* 体の光学分割の結果、反応開始 6 時間で D/L 比が 0 となり D-*threo* 体の分解が確認された。最終的に 38.9% (w/w) の収率で光学的に純粋な L-*threo* 体を取得した。D-THA DH の基質特異性を考慮すると、理論最大収率 50%に対しこの値は妥当である。DL-*erythro* 体の光学分割では、反応開始 10 時間で L/D 比が 0 となり L-*erythro* 体の分解が終了した。D-THA DH は D-*erythro* 体は分解せず、48.9% (w/w) の高収率で D-*erythro* 体を取得した。また L-THA DH による DL-*threo* 体の光学分割の場合は、12.2% (w/w) の収率で D-*threo* 体を取得した。他の 2 種類の光学分割に比べてこの値は低く、現在再結晶条件の改良中である。なお分割産物の光学純度は全て>99%*e.e.*であった。これらの酵素法による HA 異性体調製は、光学分割後は濃縮操作のみで HA を再結晶により回収でき、他の精製ステップを必要としない。本研究は酵素的光学分割を用いて HA の 3 種の異性体の作製に成功した初の例である。本研究は財団法人発酵研究所の助成を受けて実施した。



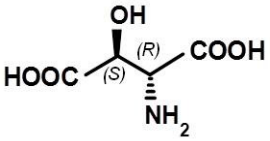
L-*threo*-HA



D-*threo*-HA



L-*erythro*-HA



D-*erythro*-HA

3-hydroxyaspartate, optical resolution, dehydratase

講演番号：3C23p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ C校舎23会場

Bacillus thuringiensis 2e2株由来Fe(II)/α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼによる光学活性スルフォキシド生産

Enzymatic production of chiral sulfoxides by an Fe(II)/α-ketoglutarate-dependent dioxygenase from *Bacillus thuringiensis* 2e2

○日比　慎、清水　昌[1]、横関　健三、小川　順[1]（京大院農・産業微生物、[1]京大院農・応用生命）
○Makoto Hibi, Sakayu Shimizu[1], Kenzo Yokozeki, Jun Ogawa[1] (Ind. Microb., Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ.)

【目的】

非対称なスルフォキシドにはスルフィニル基[−S(=O)−]の不斉に由来した立体異性が存在している。光学活性なスルフォキシドの中には有益な薬理活性を持った医薬品や機能性食品として利用されているものが知られている。スルフィドからスルフォキシドへの化学的な酸化反応は比較的容易であるが、反応産物であるスルフォキシドはラセミ体となり、光学活性スルフォキシドの取得のためには光学分割過程が必須であるという問題がある。

我々はこれまでに*Bacillus thuringiensis* 2e2株よりFe(II)/α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼスーパーファミリーの一種である酵素IDOを取得している。IDOはL-isoleucineの4位水酸化酵素として同定されたものであるが、IDOがこの水酸化反応に加えてL-methionineなどの含硫アミノ酸のスルフォキシド化反応をも触媒しうることを明らかにしてきた。重大なことに、このスルフォキシド化反応は厳密な立体選択性を持って進行する事が分かった。そこで本研究ではIDOを光学活性スルフォキシド生産にために有望な酵素触媒として利用できると考え、IDOの触媒するスルフォキシド化反応の詳細な特性を解析した。

【方法】

組み換え大腸菌により大量生産したIDOを各種カラムクロマトグラフィーで分離精製した後、様々なスルフィド化合物に対するスルフォキシド化反応活性を評価した。各基質に対する酵素活性は反応の進行に伴い生じるコハク酸の生成量を測定することで評価した。さらにIDO反応により生成したスルフォキシドは高速液体クロマトグラフィーおよび質量分析計により化学構造や立体構造を決定した。

【結果】

IDOはL-methionineの他にも、L-ethionine、L-homocysteineなどと反応した。L-methionineに対する相対活性はそれぞれL-ethionineにおいては73%、L-homocysteineにおいては104%であった。IDOはL-methionine を L-methionine-(*S*)-sulfoxide へ 、そ し て L-ethionine を L-ethionine-(*S*)-sulfoxide へ99%ee以上のエナンチオマー過剰率でスルフォキシド化した。一方で今回用いた分析系においてはL-homocysteineの反応産物を確認することができなかった。現在多種多様なスルフィド化合物に対するIDO活性の評価と反応産物の構造決定を引き続き実施している。

Fe(II)/α-ketoglutarate-dependent dioxygenase, chiral sulfoxide, stereoselective sulfoxidation

講演番号：3C23p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎23会場

アミノ基修飾酵素と水酸化酵素を共役させたβ-ヒドロキシアミノ酸生産系の開発

Production of β-hydroxy amino acids by coupling of amino group-modifying enzyme and hydroxylase

日比　慎、○笠原　拓也[1]、河嶋　隆志[1]、清水　昌[1]、横関　健三、小川　順[1]（京大院農・産業微生物、[1]京大院農・応用生命）

Makoto Hibi, ○Takuya Kasahara[1], Takashi Kawashima[1], Kenzo Yokozeki, Sakayu Shimizu[1], Jun Ogawa[1] (Ind. Microb., Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ.)

【目的】β-ヒドロキシアミノ酸は医薬品などの原料として有用なアミノ酸であるが、多くの場合分子内に複数の不斉炭素をもつため、立体選択的な有機合成は困難である。本研究では、微生物由来のアミノ酸水酸化酵素を用いたβ-ヒドロキシアミノ酸の立体選択的な生産方法の検討を行った。

【方法】本研究室が取得した*Burkholderia ambifaria* AMMD株由来のSadAは、α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼに属し、これまでに*N*-置換アミノ酸を基質としうることを見出していた。このSadAを、種々の*N*-置換アミノ酸と反応させることにより基質特異性解析及び反応生成物の同定を行った。また、*sadA*の近傍にコードされているスクシニルグルタミン酸デスクシニラーゼ/アスパルトアシラーゼ(SGD)の相同タンパク質の機能解析も試みた。

【結果】SadAと種々の*N*-置換アミノ酸を反応させた結果、SadAは*N*-スクシニル-L-イソロイシン、*N*-スクシニル-L-ロイシン、*N*-スクシニル-L-ノルバリンや*N*-スクシニル-L-ノルロイシンなどの、比較的側鎖が疎水的な*N*-スクシニルアミノ酸を基質として、そのβ位が水酸化された*N*-スクシニルアミノ酸を生成することが分かった。また、反応生成物の立体を解析したところ、>99 % ee で*threo*体を生成していることが明らかになった。また、SGD相同タンパク質は、アミノ酸のアミノ基に対して、スクシニル基の付加及び脱離反応を触媒することが分かった。これら両酵素のカップリング反応によるOne-potでのβ-ヒドロキシアミノ酸生産の可能性を模索した。

Fe(Ⅱ)/α-ketoglutarate-dependent dioxygenase, β-hydroxy amino acids, succinylglutamate desuccinylase/aspartoacylase

講演番号：3C23p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎23会場

コリネ型細菌を用いたプトレシンの生産

○岡井 直子、畑田 一樹[1] 高橋 千尋[1] 荻野 千秋[1] 近藤 昭彦[1]（神戸大・自・研究環、[1]神戸大院・工）

○Naoko Okai, Kazuki Hatada[1], Chihiro Takahashi[1], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[1] (Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., [1] Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

【目的】化石資源は有限であり、将来は繊維・プラスチックの原料についてバイオマスからの生産が必要となることが予測される。本研究ではナイロンの原料を糖から微生物により生産することを目的とし、動植物および微生物体内に微量に含まれる炭素数４のジアミンであるプトレシンに着目した。このプトレシンはアジピン酸と重合することによってナイロン-4,6を構成することが可能な有用な化合物である。プトレシンは微生物体内ではオルニチン脱炭酸酵素（ODC）の作用により生合成される。そこで、コリネ型細菌のオルニチン生産株に大腸菌由来のODCを導入することにより、糖からプトレシンの発酵生産系の構築を行なった。

【方法】大腸菌由来のODC遺伝子をコリネバクテリウム-大腸菌シャトルベクターpCHのHCEプロモーター下流に組み込みクローン化を行なった。次に*Corynebacterium glutamicum* オルニチン生産株を宿主としてODC発現用プラスミドを導入し、得られた形質転換体の菌体内画分についてウェスタン解析を行なった。*C. glutamicum* ODC導入株についてグルコース40g/Lを添加したCGXⅡ培地を用いて30℃で好気的に培養し、培養上清を経時的に採取してプトレシン、オルニチン、糖濃度を分析した。また、培養条件の諸検討を行なった。

【結果】大腸菌W3110株の二種のODC遺伝子、*speC* および*speF* をクローン化し、構築プラスミドをそれぞれpCH-speC、pCH-speF とした。各プラスミドを*Corynebacterium glutamicum* オルニチン生産株に導入し、形質転換体の菌体内画分についてODCの発現を確認した。*C. glutamicum*の各形質転換体をグルコースを含むCGXⅡ培地で培養したところ、pCH-speC導入株の培養24時間後の上清にプトレシンの生産が認められた。さらにpCH-speC導入株をグルコース40g/Lを含むCGXⅡ培地を用いて好気的に培養したところ、72時間で2.5g/Lのプトレシンを生産した。このときpCH-speC導入株では培養上清のオルニチンは殆ど認められず、一方でコントロールとしたpCH導入株では8g/Lのオルニチンを生産していた。さらに培地組成を検討し、ジャーファーメンターによる発酵試験を行なったところ、pCH-speC導入株はグルコース50g/Lから96時間で3.7g/Lのプトレシンを生産した。これらにより、コリネ型細菌を用いた糖からプトレシンの直接生産方法を構築した。

Putrescine, Corynebacterium glutamicum, Ornithine decarboxylase

講演番号：3C23p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎23会場

生もと由来 *Lactobacillus sakei* のグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子導入 *Corynebacterium glutamicum* を用いるD-グルタミン酸生産

D-Glutamate production using *Corynebacterium glutamicum* harboring glutamate racemase gene of *Lactobacillus sakei* isolated from “*Kimoto*”

○矢野 正博，老川 典夫（関大・化学生命工）
○Masahiro Yano, Tadao Oikawa (Kansai Univ.・Life Sci.& Biotech.)

【目的】先にわれわれは、生もと由来乳酸菌*Lactobacillus sakei* NBRC 15893のグルタミン酸ラセマーゼ（*Ls*-MurI）がGluに高い触媒活性と基質特異性を示すことを明らかにした。また*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032は、L-Gluを菌体外に著量生産することが知られておりL-Gluの工業的生産に利用されている。そこで本研究では、*C. glutamicum* ATCC 13032に遺伝子工学的手法を用いて*Ls*-MurI遺伝子(*Ls-murI*)を導入し、*C. glutamicum* ATCC 13032が生産するL-GluをD-Gluに変換しD-Glu生産へ応用することを目的としている。
【方法】*Ls-murI*を発現ベクターにライゲーション後、エレクトロポレーションで*C. glutamicum* ATCC 13032に形質転換した。得られた*C. glutamicum* ATCC 13032/pEKEx3-*Ls-murI*を、グルコースを唯一の炭素源とするCGXII培地で30℃で培養し、培養液の濁度(A_{600})と上清のD-及びL-Glu濃度を経時的にキラル誘導体化法を用いたHPLCで測定し定量した。また、L-Glu高生産培地として報告されているGH培地を用いて同様に培養し、培地中に存在するD-及びL-Glu濃度を定量した。さらに、L-Gluの輸送タンパク質の一つであるNCgl1221を欠損させた*C. glutamicum* ATCC 13032:: NCgl1221を調製し同様に培養し、*C. glutamicum* ATCC 13032:: NCgl1221/pEKEx3-*Ls-murI*の培地中に存在するD-及びL-Glu濃度を定量した。
【結果及び考察】*C. glutamicum* ATCC 13032/pEKEx3-*Ls-murI*をCGXII培地で150時間培養したところ、培地中にはL-GluとD-Gluがそれぞれ10.7 mM、11.8 mM存在することが明らかとなった。また、同菌体を300時間培養したところ、培地中にはL-GluとD-Gluがそれぞれ2.83 mM、12.5 mM存在することが明らかとなり、培養時間に伴いL-Glu濃度は減少するがD-Glu濃度は減少しないことが明らかとなった。また*C. glutamicum* ATCC 13032/pEKEx3-*Ls-murI*を、Tween40を添加したGH培地で50時間培養したところ、培地中にはL-GluとD-Gluがそれぞれ48.5 mM、46.8 mM存在することが明らかとなった。さらに、*C. glutamicum* ATCC 13032:: NCgl1221/pEKEx3-*Ls-murI*を同培地で50時間培養したところ、培地中にはL-GluとD-Gluがそれぞれ16.7 mM、17.0 mM存在することが明らかとなった。以上の結果から、*C. glutamicum* ATCC 13032/pEKEx3-*Ls-murI*はD-Glu生産能を有することが明らかとなった。また、*C. glutamicum* ATCC 13032の菌体内で生産されたD-Gluの一部は、L-Gluと同様にNCgl1221によって菌体外に輸送されることが明らかとなった。
なお、本研究はイノベーション創出基礎的研究推進事業により実施したものである。

Corynebacterium glutamicum, glutamate racemase, D-glutamate

講演番号:3C23p16
講演日時、会場:3月24日16:54～ C校舎23会場

グルタチオンを高生産する大腸菌株の作成および直接醗酵法の開発

Construction of glutathione over producting *E.coli* strain and development of direct fermentation of glutathione

○関田 葵[1]、大西 晶子[2]、佐藤 郁恵[1,2]、佐藤 優理[4]、井塚 俊介[2]、梶本 陽子[2]、福井 啓太[3]、鈴木 秀之[1]（[1]京工繊大院・工科・応生、[2]京大院・生命科学・統生、[3]京大院・農学・応生、[4]京工繊大・工科・先端）

○Aoi Sekida[1], Akiko Onishi[2], Ikue Sato[1,2], Yuri Sato[1], Shunsuke Izuka[2], Yoko Kajimoto[2], Keita Fukui[3], Hideyuki Suzuki[1] ([1]KIT, [2,3]Kyoto Univ)

【目的】

グルタチオンは、好気的に生育する原核生物からヒトに至る生物が生成するペプチド性チオール化合物である。グルタチオンは細胞内においてほとんど(95%以上)還元型グルタチオン(GSH)の形で存在し、還元や解毒に働いている。GSHの製造法として、高グルタチオン含有酵母から抽出する方法、酵素法などが知られている。酵母はグルタチオンを液胞に蓄積するため、酵母菌体からGSHを抽出する精製工程が煩雑である。本研究では大腸菌を用いて菌体外にグルタチオンを生産することを試みた。

【方法】

GSHのトランスポーターであるYliABCD、GSH分解酵素であるGGTを欠損させることにより、細胞外のGSHの濃度を高めた。また、GSH合成経路に関わるGshA、GshBについても改善を試み、*gshA,B*の多コピープラスミドの導入、また*gshA*の開始コドンの変異を行った。さらにGSHの原料であるシステインを生産させるためCysB,Eに脱感作変異を導入した。

さらに、変異導入株を用いて培養条件の検討を行った。培養条件として振とう培養時の速度、また温度の他、グルコース濃度、またS源検討と、グルタミン酸濃度の検討を行った。

GSHを最少培地で培養し、各培養条件のもとで培養し、GSH量を測定した。GSH量はHPLCに装着したAminoNaカラムで分離後、*o*-フタルアルデヒドで修飾し、蛍光ディテクターで測定した。

【結果】

YliABCD、GGT欠損の導入により細胞外GSH量が多くなった。また、*gshA,B*の多コピープラスミドの導入により、GSH量をさらに高めることが出来た。*gshA*の開始コドンTTGをATGに変異させることにより、翻訳効率をあげた。

材料であるシステインを高生産させることを試み、CysB,Eの脱感作変異を導入したが、かえってGSH量は減少した。

また、培養条件の検討の結果、C源としてグルコースを0.5%、S源としてチオ硫酸ナトリウムを0.5 mM添加した培地で、37℃、140 rpmで振とう培養することにより、細胞外GSH蓄積量を増加させることに成功した。

GSH, *E.coli*, fermentation

講演番号:3C23p17
講演日時、会場:3月24日17:15～ C校舎23会場

h

リボソーム蛋白質L10をアダプターとするClpP型プロテアーゼによるリジン脱炭酸酵素の分解
Degradation of lysine decaboxylase by the ClpP protease accompanied with ribosomal protein L10 as an adapter

○ 沼子　仁志、李　耀召、金子　淳[1]、高塚　由美子、神尾　好是　(山形大院・理工、[1]東北大院・農)
○ Hitoshi Numako, Yaozhao Li, Jun Kaneko, Yumiko Takatsuka, and Yoshiyuki Kamio. (Graduate School of Bioscience Bioengineering,Yamagata Univ, [1]Graduate School of Agriculture Science, Tohoku Univ.)

【目的】

生物界で遊離型でのみ存在すると言われてきたポリアミンの一種のカダベリンは、グラム陰性細菌 *Selenomonas ruminantium* において細胞膜酵素 lipid intermediate: diamine transferase の触媒により細胞壁ペプチドグリカンに共有結合し、外膜-PG 間の強固なアンカーへと変貌する。一方、本菌における遊離カダベリンの合成に必須なリジン脱炭酸酵素（LDC）は、カダベリン合成終了直後に「原核生物では存在しない」とされていたアンチザイム（AZ）を介した ATP 依存性セリンプロテアーゼにより分解される。さらにリボソーム蛋白質 L10 が AZ として機能している。本研究で我々は、本 ATP 依存性セリンプロテアーゼの実体を明らかにするとともに、本酵素の精製を試みその特性を明らかにし、L10 を介した LDC 分解制御機構を解明する。昨年本大会において、*S. ruminantium* の全ゲノム配列を参考に本プロテアーゼ候補遺伝子を3遺伝子に絞り込み、その中でも特に真核生物 ODC 分解に関わるプロテアソームの原型ともされている、ClpP 型遺伝子に着目し、その遺伝子をクローニングした。今回、本菌の LDC は、L10 をアンチザイムとする ClpP 型プロテアーゼにより分解されることを明らかにしたので報告する。

【方法】

(1) ClpP および ClpX の発現および精製、活性の確認: 陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した。さらに蛍光基質を用いてペプチダーゼ活性を測定した。

(2) ClpP および ClpX 複合体による L10 依存的な LDC 分解活性の確認： LDC の抗体により LDC の減少を測定。

【結果】

clpP 遺伝子を大腸菌にクローニングして大量発現系を構築し可溶性画分に得られた 24 KDa の目的蛋白質（ClpP）を精製し、ペプチダーゼ活性を確認した。さらに *clpX* を大腸菌にクローニングして大量発現系を構築し可溶性画分に 46 KDa の蛋白質（ClpX）を得た。ClpP および ClpX 存在下で、L10 依存的な LDC 分解活性を測定した。その結果 LDC が ATP 依存的に分解されることが明らかになった。また、L10 や ClpX などの非存在下では LDC は分解されないことが分かった。

Keyword1, ribosomal protein L10　Keyword2, lysine decarboxylase　Keyword3,ClpP protease

講演番号:3C23p18
講演日時、会場:3月24日17:26～ C校舎23会場

オカラからの機能性食品素材の開発

Development of functional food materials from okara

○浜中大夢、小山和貴、綱達也、尾関健二、大箸信一、川嶋正男[1]、斉藤道夫[1]、
藤原英二[1]、武春美[2]、中村静夫[2]
(金沢工大・ゲノム研、[1] 羽二重豆腐、[2] 石川県工試)
○Hiromu Hamanaka, Kazuki Koyama, Tatsuya Tsuna, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi,
Masao Kawashima[1], Michio Saito[1], Eiji Fujiwara[1], Harumi Take[2], Shizuo Nakamura[2]
(KIT,[1]habutae Co.,[2]IRII)

【目的】オカラは保存性の悪さからそのほとんどが廃棄物として処理されている。食品加工用酵素剤を各種組合せ、オカラ中のヘミセルロースの構成糖である血糖値上昇抑制作用などの機能性がある L-アラビノース、D-キシロースとして可溶化し、同時にセルロースをグルコースまでセルラーゼ剤を用いて酵素分解する条件を検討する。オカラ可溶化物を各種酵母で発酵し、非発酵性の L-アラビノースおよび D-キシロースを濃縮および酵母菌体の機能性を付与した食品素材の開発を目指している。

【方法および結果】生オカラの 10%程度は不溶性の食物繊維であり、その 75%がヘミセルロース、20%がセルロースである。ヘミセルロースを食品加工用のヘミセルラーゼ剤を組合せることで L-アラビノースだけ選択的に可溶化できる条件を確立した。同時にセルラーゼ剤でセルロース分解を行い、グルコースなどの発酵性糖に分解できる 2 段階酵素反応条件を決定した。このオカラ可溶化物を各種酵母で発酵することにより、L-アラビノースは資化できなく濃縮され、酵母数が増加する発酵が良い酵母をスクリーニングした。現在酵母のβ-グルカン量、官能評価などで最適な酵母を決定し、二糖類分解酵素阻害活性、抗酸化能などの各種機能性の評価を行っている。

Okara, L-arabinose, Yeast

講演番号：3C23p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ C校舎23会場

有機溶媒耐性が向上したニトリラーゼ変異体の構造特性

Structural analysis of nitrilase mutants tolerant against organic solvents

○吉田　豊和、大原　祐樹、満倉　浩一、長澤　透（岐阜大・工）
○Toyokazu Yoshida, Yuki Ohara, Koichi Mitsukura, Toru Nagasawa (Gifu Univ.)

【目的】ニトリラーゼはニトリルを効率的に対応するカルボン酸とアンモニアに加水分解する。ニトリラーゼに有機溶媒耐性を付与することができれば、疎水性・難水溶性のニトリルを効率的に加水分解させることが可能となる。今回は、我々がすでにある程度の有機溶媒耐性を示すことを報告している*Arthrobacter* F73のニトリラーゼを用い、ランダム変異の導入によって有機溶媒耐性を向上させることを検討し、変異酵素の構造特性を明らかにすることを目的とした。
【方法】*Arthrobacter* F73ニトリラーゼを大腸菌において発現させ、エラープローンPCRによってランダム変異を導入した。まず、野生型酵素の有機溶媒耐性プロファイルにもとづき、2-プロパノールを選択し、有機溶媒耐性の向上を検討した。変異体を形質転換した大腸菌ライブラリーを培養後、2-プロパノールを培養液に添加し加温した。その後、反応基質として3-ピリジンアセトニトリルを加えて、休止菌体反応で残存するニトリラーゼ活性を調べた。この時、生成するアンモニアをイソインドール誘導体として発色させ、ライブラリーから耐性が向上した変異体をスクリーニングした。
【結果】有意に耐性が向上したニトリラーゼ変異体を一つ得た。変異点を解析した結果、C末端近傍において塩基欠失が起こり、フレームシフトによって酵素タンパク質のC末端領域のアミノ酸配列全体が置換され、さらにサブユニット分子量も大きくなっていた。そこで、野生型酵素および変異型酵素のそれぞれのC末端領域の欠失変異体を種々作成し、有機溶媒耐性および熱耐性の変化を調べた。その結果、*Arthrobacter* F73の野生型ニトリラーゼのC末端から40残基程度を欠失させることが、2-プロパノール耐性の向上に効果的であった。また、この欠失体はその他の有機溶媒に対する耐性も向上していた。

Nitrilase, mutation, organic solvent

講演番号：3C24a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ C校舎24会場

分裂酵母の胞子発芽の分子メカニズムの解析

Molecular dissection of spore germination in fission yeast

○東谷 未来、今田 一姫、中村 太郎（大阪市立大・院理・生物地球）
○Miku Higashitani, Kazuki Imada, Taro Nakamura (Osaka City Univ.)

【目的】分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の胞子は様々な環境ストレスに対しての耐性を持つ休眠細胞である。胞子は適切な栄養源の存在下で発芽し、再び栄養増殖を開始する。この発芽のプロセスは静的なＧ0期から動的な増殖サイクルへの変遷という非常に興味深い現象である。これまで、発芽は暗色化、膨潤(拡大成長)、突起形成、隔壁形成というプロセスで進行することがわかっているが、その分子メカニズムはほとんどわかっていない。本研究は、１，胞子発芽を生細胞でタイムラプス観察　２，胞子発芽欠損変異株を取得・解析　することにより、胞子発芽の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。
【方法・結果】１，タイムラプス観察により、発芽の各プロセスの詳細な変化を観察した。２，胞子発芽に欠損のある変異株の取得を試みた。これまで、約80000コロニーからさまざまな発芽のプロセスに欠損のある変異株を約20取得した。

Fission yeast, spore germination

講演番号：3C24a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ C校舎24会場

タイトル　分裂酵母の低浸透圧ショック応答に必要な機械受容チャネル

Title　Mechanosensitive channels essential for the hypo-osmotic shock response in fission yeast

○中山 義敬、飯田 秀利（東学芸大・教育･生命科学）

○Yoshitaka Nakayama, Hidetoshi Iida (Tokyo gakugei university)

【目的】機械受容チャネルは浸透圧応答において、センサー分子として中心的な役割を担っている。酵母細胞は低浸透圧ショックにさらされると一過的に細胞内Ca^{2+}を上昇させる。しかし、低浸透圧ショック時にはたらく機械受容チャネルの分子実体は明らかにされていない。原核生物では低浸透圧ショック時に細胞の破裂を防ぐ安全弁として機能する機械受容チャネルとしてMscSが知られている。一方、真核生物のMscSホモログは浸透圧応答との関連は見つかっていない。そこで本研究では分裂酵母の低浸透圧ショック応答にはたらく機械受容チャネル候補としてMscSホモログの機能の解明を目指した。

【方法】分裂酵母の２つのMscS様タンパク質(Msy1、Msy2と命名)の遺伝子破壊株を作製し、低浸透圧ショック時の生存率、細胞体積、細胞内Ca^{2+}レベルの変化を調べた。

【結果】WTと*msy1*$^{-}$遺伝子破壊株は低浸透圧ショック後の生存率において変化は見られなかった。一方、*msy2*$^{-}$遺伝子破壊株と*msy1*$^{-}$*msy2*$^{-}$二重遺伝子破壊株は低浸透圧ショック後に生存率が低下した。細胞の体積変化を調べるためにGFPを発現させ、蛍光顕微鏡観察下で体積変化を調べた。*msy2*$^{-}$遺伝子破壊株と*msy1*$^{-}$*msy2*$^{-}$二重遺伝子破壊株は低浸透圧ショックにより、細胞体積が顕著に増大した後、急激に減少した。細胞膨張と細胞内Ca^{2+}レベルの関係を調べるためにカメレオンを用いたCa^{2+}イメージングを行った。低浸透圧ショック後、細胞が膨張した時に一過的な細胞内Ca^{2+}レベルの上昇がみられた。*msy1*$^{-}$*msy2*$^{-}$二重遺伝子破壊株はWTに比べて、大きな体積変化と細胞内Ca^{2+}レベルの上昇を示した。これらの結果はMsy1とMsy2が低浸透圧ショック応答における細胞体積と細胞内Ca^{2+}レベルの制御にはたらくことを示唆する。

mechanosensitive channel, osmotic response, fission yeast

講演番号：3C24a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎24会場

分裂酵母プロテインキナーゼＡの新規機能の確立

Establishment of new function for Protein kinase A in fission yeast

山家雅之、川向　誠、○松尾安浩（島根大・生物資源・生命工）
Masayuki Yamaga, Makoto Kawamukai, ○Yasuhiro Matsuo (Shimane Univ.)

【目的】分裂酵母において、cAMP/PKA経路はこれまでに有性生殖過程への移行の制御、グルコース応答、塩化カリウムストレス応答などいくつかの機能が知られている。今回我々は分裂酵母のcAMP/PKA経路における破壊株を用いて、いくつかの薬剤に対する感受性テストを行い、そこで得られた表現型を解析することでcAMP/PKA経路の新たな機能を確立することを目的として研究を行った。
【方法及び結果】分裂酵母におけるcAMP/PKA経路の破壊株を用いた薬剤感受性テストの結果、cAMP/PKA経路の破壊株は微小管重合阻害剤であるThiabendazole(TBZ)およびCarbendazim(MBC)に感受性を示すことを新たに見出した。そこで、微小管重合阻害剤への応答はPka1の活性化が重要であるかを調べるために、*cyr1Δ cgs1Δ*の二重破壊株を用いて感受性テストを行った。*cyr1Δ*の示す表現型はcAMPの添加もしくは*cgs1Δ*によるPka1の活性化によって回復することがこれまでに明らかになっている。結果として、*cyr1Δ*では微小管重合阻害剤に対して感受性を示したが、*cyr1Δ cgs1Δ*の二重破壊株では示さなかった。以上のことから微小管重合阻害剤に対する感受性はPka1の活性に依存していることが示唆された。*cyr1Δ*や*pka1Δ*が微小管重合阻害剤に対して感受性を示すため、TBZ存在下でこれらの株が細胞周期を停止しているのかそれとも細胞が死んでいるのかを生存率によって調べた。その結果、野生株と*cgs1Δ*は生存率に変化は見られなかったが、*cyr1Δ*や*pka1Δ*では生存率が低下していることが明らかになった。以上のことから微小管重合阻害剤の存在下では細胞が生育するためにPka1が重要な役割を担っていることが示唆された。

これまでに分裂酵母で微小管重合阻害剤に感受性を示す株は幾つか報告されているが、その中でもスピンドルチェックポイント因子に注目した。スピンドルチェックポイントは細胞周期の有糸分裂期の中期から後期に移行する際に重要な細胞周期制御機構で、姉妹染色分体の動原体への微小管の結合を監視し、染色体分配が正しく行われるのに必要である。Pka1がスピンドルチェックポイントに関係するかを調べるために、酵母ツーハイブリッド法を用いてタンパク質間の相互作用を解析した。その結果、触媒サブユニットであるPka1はスピンドルチェックポイント因子の中でMad2、Bub1およびSlp1と相互作用したが、調節サブユニットであるCgs1はスピンドルチェックポイントのどの因子とも相互作用しなかった。また、*pka1Δ mad2Δ*および*cgs1Δ mad2Δ*二重破壊株を作製し解析を行ったところ、微小管重合阻害剤に対して*pka1Δ mad2Δ*二重破壊株では*pka1Δ*と同程度の感受性を示し、*cgs1Δ*は*mad2Δ*の感受性を相補できなかった。以上のことから、Pka1が微小管重合阻害剤ストレスに応答してスピンドルチェックポイント因子であるMad2を介して何らかの制御をしている可能性が示唆された。

Pka1, Mad2, fission yeast

講演番号：3C24a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎24会場

メタノール資化性酵母 Msn5p はホルムアルデヒド耐性機構に関与する

Msn5p is involved in formaldehyde resistance mechanism in the methylotrophic yeast.

◯ ZHAI Zhenyu、由里本　博也、阪井　康能（京大院農・応用生命）
◯ Zhenyu ZHAI, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】メタノール資化性酵母は、メタノールを単一の炭素源・エネルギー源として生育できる。本酵母のメタノール代謝は、ペルオキシソーム内のアルコールオキシダーゼ（AOD）によるメタノールの酸化で始まるが、このとき生じるホルムアルデヒドと過酸化水素は、すべての生物にとって有害な毒性化合物である。我々はこれまでに、本酵母におけるホルムアルデヒド代謝（グルタチオン依存性ホルムアルデヒド酸化経路）や、過酸化水素とこれから派生する活性酸素種を消去する抗酸化酵素（カタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ）の生理機能を解明し、特にグルタチオン代謝が、ホルムアルデヒド代謝と抗酸化代謝の両方に重要であることを明らかにしてきた。ストレス応答性転写因子PpYap1pはグルタチオンレドックス系の酵素遺伝子を正に調節していることが報告されたが、メタノール代謝時に細胞が受けるストレスとその応答機構についてまだ多くの点がわかっていない。本研究では、出芽酵母で様々な転写因子の核外輸送に関与するMsn5p（importin-βファミリーに属する核外輸送体）のメタノール資化性酵母における役割を、*Candida boidinii* と*Pichia pastoris* を用いて明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】*C. boidinii* および*P. pastoris* のドラフトゲノム情報を基に、CbMsn5pおよびPpMsn5pをそれぞれ同定し、遺伝子破壊株（*Cbmsn5Δ*および*Ppmsn5Δ*株）を作成した。両遺伝子破壊株では、メタノールやメチルアミンなどホルムアルデヒドを代謝中間体として生じる化合物を含む培地での生育遅延が観察されたが、AODなどメタノール代謝酵素の遺伝子発現レベルは低下しなかった。また両遺伝子破壊株ともに、野生株と比較してホルムアルデヒド感受性が高まったが、過酸化水素感受性については野生株と同等であった。黄色蛍光タンパク質（YFP）を付加したCbMsn5pの細胞内局在を観察したところ、高濃度ホルムアルデヒドまたはエタノール処理時には細胞質に拡散し、過酸化水素処理時には主に核に局在した。以上の結果から、メタノール資化性酵母Msn5pは、ホルムアルデヒド耐性機構には関与するが、過酸化水素耐性機構には関与していないことが示唆された。

methylotrophic yeast, Msn5p, formaldehyde

講演番号：3C24a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ C校舎24会場

リボソームの不完全性は大腸菌に塩耐性をもたらす

Loss of integrity of the ribosome confers salt resistance on *Escherichia coli* cells.

○樽澤武房、長谷要一、武藤あきら、姫野俵太（弘前大農学生命・応用生）
○Takefusa Tarusawa, Yoichi Hase, Akira Muto, Hyouta Himeno (Hirosakidai)

【目的】細胞は外界の浸透圧が変化すると、浸透圧ストレス応答を示す。外界の浸透圧が高い時は水分子の流失を防ぐため、K^+イオンや抗浸透圧物質（osmolyte, osmoprotectant）を細胞内に取り込んで圧力を平衡化させる。逆に細胞内の浸透圧が高い時は細胞溶解を防ぐため、チャネルタンパクを開放し膨圧を減少させる。このような応答は膜タンパク質の構造変化による早期応答と、そのシグナルで活性化される転写因子による転写レベルの応答に分けて理解されてきた。近年、バクテリアの浸透圧ストレスで活性化される遺伝子には、これまで考えられていた一般的なストレス応答転写因子のσ^Sの制御だけでなく、細胞膜の恒常性に関わるσ^Eや熱ショックに応答するσ^Hの制御を受けているものが見つかってきている。
我々はバクテリアリボソームの小サブユニットで活性化される新規のGTPaseであるRsgAタンパク質について研究してきたが、この過程で*rsgA*遺伝子欠損株（Δ*rsgA*）が高濃度の塩に対して耐性を示すことを発見した。このタンパク質はリボソーム生合成因子のひとつであると考えられており、Δ*rsgA*株は通常の培養条件下では生育速度は野生型よりも著しく遅く、未成熟なリボソームを細胞内に蓄積する。
本研究では、まず同様の浸透圧耐性が*rsgA*欠損以外のどのような遺伝的背景で引き起こされるのかを調べた。また、高塩濃度下におけるストレス応答因子の発現を解析することにより浸透圧耐性の機構の解明を目指した。
【方法】リボソーム生合成因子あるいはリボソームタンパク質遺伝子欠損株の、高濃度NaCl存在下での増殖を測定した。また、qRT-PCRを用いていくつかの遺伝子についてmRNA量の経時的変化を測定した。さらに野生株の培養液に翻訳を阻害する抗生物質を添加し、同様の実験を行った。
【結果】今回の研究で、*rsgA*欠損株で発見されていた塩耐性表現型が、30Sサブユニットの生合成因子に加え、50Sサブユニットの生合成因子やnon-essentialなリボソームタンパク質など、リボソームに関与するさまざまな因子の遺伝子の欠損によっても確認された。また、翻訳阻害剤の中には、*rsgA*の欠損と同様の塩耐性をもたらすものが数種類見つかった。さらに、リボソーム不全変異株や翻訳阻害剤処理株では、膜の安定性に関わる因子がNaCl添加後において、野生株以上に迅速な活性化を示すこともわかった。

ribosome, salt stress.

講演番号：3C24a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ C校舎24会場

抗菌剤処理で生じるスーパーオキシドストレスの細菌細胞死滅への影響

Influence of the superoxide stress caused by antibacterial agents on cell death in *Escherichia coli*.

○中田訓浩[1]、富田安哉子[2]、松村吉信[1,2]（[1]関西大・ORDIST、[2]関西大・化学生命工）
○Kunihiro Nakata, Ayako Tomita, Yoshinobu Matsumura (Kansai Univ.)

【目的】清潔志向や健康志向の高まりとともに、人々は敏感に微生物汚染に対応するようになり、様々な抗菌剤や抗菌化処理がヒト環境で施されるようになった。また、薬剤耐性菌株による院内感染や食中毒等の問題も注目され、より高活性な抗菌剤の需要が高まり、より高度な耐性菌の出現が懸念されている。このため、高度な耐性菌株を出現させない効果的な殺滅法の開発が期待され、抗菌剤の作用機序や耐性菌の耐性機構の詳細情報が必要となっている。当研究室では、抗菌性界面活性剤である臭化セチルトリメチルアンモニウム塩（CTAB）に対して耐性を獲得した大腸菌OW66株を自然突然変異法で取得し、野生型OW6株との比較ゲノム構造解析でOW66株の染色体の7ヶ所に変異が確認された。これら変異の中で、スーパーオキシドストレス適応に重要であるセンサータンパク質をコードする*soxR*の変異が*soxS*や*soxRS*レギュロンの発現を構成性にし、このことがOW66株の高い界面活性剤耐性に関与していた。また、野生型OW6株では、CTAB処理が活性酸素ストレス応答能の低下と活性酸素ストレスの増大に導くことも見いだした。本研究では、新たに取得した大腸菌CTAB耐性株を含む抗菌性界面活性剤耐性菌株のCTABストレス適応や抗生物質を含むその他の抗菌剤処理で生じる活性酸素ストレスについて調査した。
【方法】供試菌には、大腸菌OW6株およびOW66株、新たに自然突然変異法で単離した新規CTAB耐性変異株を用いた。大腸菌細胞の抗菌剤耐性能はMIC法で調査した。細胞内で発生したスーパーオキシドや過酸化水素、ヒドロキシルラジカルは、それぞれの蛍光プローブであるBES-So-AMやBES-H_2O_2-Ac、hydroxyphenyl fluoresceinを用いて蛍光顕微鏡観察やフローサイトメリー分析で検出した。細胞の生理状態は2D-PAGEによる細胞内タンパク質のプロファイリング解析で調査した。
【結果】非致死濃度のCTABで処理したOW6株で活性酸素の過剰な発生が確認された。しかしながら、CTAB耐性変異株ではCTAB処理による活性酸素の発生は野生株ほど顕著に観察されず、CTAB耐性能の増強とともに活性酸素発生量の減少が観察された。また、新規CTAB耐性変異株の細胞内タンパク質プロファイリング解析を行った結果、OW66株と同様に、*soxRS*レギュロンメンバーのタンパク質合成量の増加が認められた。これらの結果は、大腸菌細胞における抗菌性界面活性剤耐性に活性酸素ストレス、特にスーパーオキシドストレスに対する適応・応答能の向上が重要であることを示し、抗菌性界面活性剤の抗菌活性発現に活性酸素の関与が強く示唆された。さらに、殺菌型抗生物質であるアンピシリンやシプロフロキサシンで処理したOW6株においても活性酸素の過剰な発生が認められ、スーパーオキシドストレスは抗菌剤の殺滅活性に重要となる共通因子と考えられた。

soxRS regulon, oxidative stress, antibacterial agent

講演番号：3C24a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎24会場

コネクター分子SafAを介した大腸菌二成分制御系PhoQ/PhoPの活性化分子機構の解明

The activating mechanism of bacterial two-component signal transduction system PhoQ/PhoP by a connector, SafA

○石井　英治、江口　陽子、内海　龍太郎（近畿大・院・農・バイオ）
○Eiji Ishii, Yoko Eguchi, Ryutaro Utsumi (Dept. of Biosci., Grad.Sch. of Agric., Kinki Univ.)

【目的】細菌における情報伝達系の一つ、二成分制御系を介する情報伝達研究は単純なHK-RRによるリン酸化―リン酸基転移反応による標的遺伝子発現研究として展開されてきた。近年、複数の二成分制御系間で働くコネクター因子の存在が報告されている。その一つであるSafAは、大腸菌二成分制御系EvgS/EvgAに制御され、別の二成分制御系のヒスチジンキナーゼPhoQのペリプラズム領域で作用し、PhoQ/PhoP系を活性化している。PhoQペリプラズム領域のセンサードメインには二価の陽イオンや抗菌性ペプチドなどの因子が作用し、その制御を行っていることが明らかになっている。では、なぜSafAは様々な因子が関わるペリプラズム領域からPhoQを制御するのか。本研究では、TCS間で働くコネクター因子による制御機構に焦点を当て、SafAとPhoQ間の作用メカニズムを明らかにしつつ、細菌情報伝達ネットワーク間で働くコネクター因子の役割を分子レベルで明らかにすることを目的とする。
【方法】これまでの研究により、SafAのペリプラズム領域(41-65 aa)がPhoQの活性化に重要であることが明らかとなっておりその領域のみでもPhoQを活性化することも確認している。また、そのR53A変異体はSafAのPhoQ活性化能を著しく低下させる。そこで、これらの合成ペプチドを用い表面プラズモン共鳴法による分子間相互作用解析を行なった。更に、PhoQの全長を再構成したプロテオリポゾーム及びPhoQとSafAを過剰発現した膜画分を用い、SafAによるPhoQ/PhoP系のリン酸化調節機構の解明を行なった。
【結果】表面プラズモン共鳴法による解析においてSafA(41-65 aa)ペプチドは濃度依存的な結合を示し、その結合が単純な1：1の結合でないことまたその解離が遅いことが明らかとなった。それに比べ、細胞質領域(1-19 aa)ペプチドでは結合が見られず変異体R53Aペプチドではその結合様式が1：1の結合になり解離が速いセンサーグラムを示した。このことから、SafAがPhoQと直接結合しそのR53残基が二つのタンパク質の相互作用に大きく関わっていることが示唆された。また、また、リン酸化PhoQからPhoPへのリン酸基転移実験においてSafA存在下で、PhoPのリン酸化量の増大が見られたことから、SafAはPhoQのリン酸基転移の促進及びPhoPへの脱リン酸化の抑制を制御していることが示唆され、現在詳細な解析を行なっている。

stress response, proteoliposome, surface plasmon resonance

講演番号：3C24a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ C校舎24会場

大腸菌鉄（Fe^{3+}）応答性二成分制御系 BasS/BasR に対する新規調節因子 YibN の機能解析

Functional analysis of a novel factor, YibN, modulating BasS/BasR, a Fe^{3+} responding two-component system in *Escherichia coli*.

○植田 健陽，石井 英治，江口 陽子，仲宗根 薫[1]，内海 龍太郎(近大院・農・バイオ，[1]近畿大・工・生化工)

○Katsuya Ueda, Eiji Ishii, Yoko Eguchi, Kaoru Nakasone[1], Ryutaro Utsumi[1] (Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Agric., Kinki Univ. [1]Dept. of Biotechnol and Chem., Faculty of Engineering., Kinki Univ.)

【目的】地球上には様々な環境ストレスがあり、細菌にはそれらに適応する能力の一つとして情報伝達機構である二成分情報伝達制御系（Two-component system, TCS）が広く保存されている。この機構は、環境ストレスを感知するヒスチジンキナーゼ(HK)とそのストレスに応じた遺伝子発現の制御を行うレスポンスレギュレーター(RR)の二つのタンパク質から構成されている。近年、細菌においてTCSのHKを修飾する膜タンパク質 Sensor modifying membrane protein（SMP)が報告されている。しかしながら、SMPの既知数は少なく、SMPが他に存在していると考えられる。そこで、Bacterial-two hybrid 法を用いて新たな大腸菌SMPの探索を行った。その結果、鉄(Fe^{3+})に応答し、外膜修飾に関わるニ成分制御系BasS（HK）と機能未知であるYibNに強い相互作用が見られた。そこで本研究では、BasSと相互作用を示したYibNの機能解析を目的とした。

【方法】YibN過剰発現時における、BasS/BasR制御下の遺伝子で、Fe^{3+}添加後、誘導される*arnB* 遺伝子の発現に与える影響を定量的リアルタイムPCR及び*lacZ*を用いたレポーターアッセイにより検討を行なった。また、YibNのBasSに対する作用領域を特定するため、YibNのペリプラズム側領域（YibN, 1-12aa）及び細胞質内領域(YibN, 36-143aa)を含む大腸菌において、 鉄イオン誘導性*arnB*遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた。

【結果】鉄含有大腸菌培養液において、YibNを過剰発現させたとき、*arnB*の発現が抑制されることが、定量的リアルタイムPCR及び*arnB-lacZ*レポーター株を用いて、明らかにされた。またBasS/BasRによって、正に制御されている*arnB*以外の遺伝子(*arnT*, *pmrC*)の鉄誘導性発現も、YibNの発現によって、抑制された。これらの結果からYibNはBasSと相互作用することで、BasSの活性を制御し、BasS/BasRを介するFe^{3+}誘導性遺伝子群の発現を抑制することが示された。さらに、YibNのペリプラズム、細胞質内領域を用いてレポーターアッセイを行った結果、ペリプラズム側領域（YibN, 1-12aa）を含む大腸菌において、鉄誘導性*arnB*の遺伝子の発現は抑制されるが、細胞質内領域(YibN, 36-143aa)を含む大腸菌では、その抑制効果を見られなかった。このことからYibNのペリプラズム領域がBasSに作用していることが示唆された。

Two-component system, Bacterial-two hybrid system,

講演番号：3C24a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎24会場

大腸菌二成分制御系 EvgS/EvgA 系のセンサー EvgS におけるシグナル認識領域の解析

Signal recognition by the sensor EvgS of the EvgS/EvgA two-component signal transduction system in *Escherichia coli*

○江口 陽子、村上 絵津、内海 龍太郎（近畿大農・バイオ）
○Yoko Eguchi, Etsu Murakami, Ryutaro Utsumi (Dept. Biosci. Facul. Agri., Kinki Univ.)

【目的】細菌に広く保存される二成分制御系 (TCS) は、環境の変化をシグナルとして認識し、その情報を菌体内部へと伝えることで環境変化への適応に関わる。シグナルを最初に認識するセンサーは、ヒスチジンキナーゼ活性および対となるレスポンスレギュレーターへのリン酸基転移活性をもち、シグナルを感知するとこれらの酵素活性を活性化あるいは抑制することで情報を伝達する。さらに、センサーが複数のシグナルを認識する場合や第三のタンパク質によって修飾される場合もある。ところが、これらのシグナルや修飾タンパク質がセンサーのどの領域で感知され、シグナル感知後どのようなメカニズムでセンサーの酵素活性が変化するかはほとんど解明されていない。

本研究では大腸菌 TCS EvgS/EvgA 系のセンサー EvgS に着目した。EvgS/EvgA 系は低 pH を感知して活性化し、酸耐性化に関連する遺伝子群の発現を誘導することで菌に酸耐性能を付与する。当研究グループでは、EvgS の活性化には、低 pH 以外に高濃度の K^+ あるいは Na^+ も必要であることを報告してきた（昨年度本大会）。本研究では、EvgS がこれらのシグナルをどの領域で感知するのかを決定し、EvgS の活性化メカニズムを解明することを目的とした。また、EvgS/EvgA 系の活性化には RcsC/RcsD/RcsB 系のレスポンスレギュレーターである RcsB が必要であることが報告されている。両 TCS の関わりも EvgS の活性化メカニズム解明に必要であると認識し検討した。

【方法】シグナル感知領域の特定のために、EvgS と PhoQ (PhoQ/PhoP TCS のセンサー) のキメラセンサーを構築し、EvgS が感知するシグナルへの応答を検討した。また、RcsC/RcsD/RcsB 系の各因子の欠損株を作製し、EvgS/EvgA 系の活性化に与える影響を検討した。

【結果】キメラセンサーを用いて検討した結果、EvgS は高濃度の K^+ のシグナルをペリプラズム領域あるいは膜貫通領域で、pH の変化を膜貫通領域と DHp (二量体化)領域の間のリンカー領域で感知することが示唆された。この結果は、EvgS が２種類のシグナルを異なる領域で感知、統合して活性化することを示す。また、RcsC/RcsD/RcsB 系の各因子の欠損株を検討した結果、EvgS/EvgA 系の活性化には RcsB のみが必要であることが示された。EvgS/EvgA 系の活性化に *rcsC* 欠損は影響がないことから RcsB のリン酸化は必要ないものと予想され、実際、RcsB D56A (リン酸化されない変異型 RcsB)によって *rcsB* 欠損株が相補されることを確認した。RcsB が菌体内のどのような因子と相互作用をしているのかを、現在、探索中である。

two-component system, sensor histidine kinase, EvgS

講演番号:3C24a10
講演日時、会場:3月24日10:49～ C校舎24会場

イネ苗立枯細菌病菌*Burkholderia plantarii*における植物毒素トロポロンの生産制御に関する二成分制御系遺伝子の解析

Studies on the mechanism involved in regulation of tropolone production in rice-seedling blight pathogenic bacteria, *Burkholderia plantarii*

○紀平　絵梨、岡本　尚、仲宗根　薫[1]、関根 光雄[2]、藤田 信之[2]、波多野 和樹[3]、五十嵐 雅之[3]、内海 龍太郎（近畿大院農・バイオ、[1]近畿大工・生化工、[2]NITE、[3]微化研）

○Eri Kihira, Sho Okamoto, Kaoru Nakasone1, Mitsuo Sekine2, Nobuyuki Fujita2, Masaki Hatano3, Masayuki Igarashi3, Ryutaro Utsumi (Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Agric., Kinki Univ. 1: Dept. of Biotechnol and Chem., Faculty of Engeneering. Kinki Univ. 2: Dept. Biothechnol., NITE 3: Microb. Chem. Inst.)

【目的】*Burkholderia plantarii*はイネへ感染し、イネ苗の立ち枯れ細菌病を引き起こす。本菌は植物毒素としてトロポロンとよばれる化合物を産生する。トロポロンは、三価の鉄とキレート化し赤褐色のトロポロン第二鉄錯塩を形成するといった特徴を有する。このことから、本菌が感染するとイネ内の鉄とトロポロンとが錯体を形成し、鉄が欠乏することでイネの発根、根の伸長・緑化が阻害され特徴的な病徴を発現すると考えられているが、病原性に関与する遺伝子やそのメカニズムの詳細は解明されていない。そこで本研究では、*B. plantarii*の全ゲノム解析情報をもとに他の*Burkholderia*属とのアミノ酸の相同性から推定された二成分制御系のヒスチジンキナーゼ(HK) 遺伝子群(54個)とレスポンスレギュレーター(RR)遺伝子群(69個)に着目し、網羅的にそれらの遺伝子破壊株を作製し、それら破壊株のトロポロン産生と病原性に及ぼす影響を明らかにした。

【方法】相同組換えにより部位特異的に破壊株を作製し、これらを鉄含有寒天培地に植菌し、コロニー内に形成される錯体の有無でトロポロン産生抑制株のスクリーニングを行なった。また、トロポロン産生抑制株における遺伝子について、その遺伝子が二成分制御系遺伝子としての活性(HKの自己リン酸化、HKからRRへのリン酸基の転移)を有するかを確認するため、タンパク質を精製し*in vitro*で自己リン酸化・リン酸基転移の活性評価を行なった。

【結果】網羅的な破壊株作製によって、46のHK破壊株と12のRR破壊株が得られた。これらの破壊株について、鉄含有寒天培地においてトロポロン産生抑制株のスクリーニングを行なった。その結果、染色体1に存在するHK3遺伝子の破壊株において、トロポロンの産生が検出されなかった。また、HK3遺伝子に隣接する2つのレスポンスレギュレーター遺伝子(RR1とRR2）の破壊株においても、同様にトロポロン産生の抑制が確認された。HK3はアミノ酸残基467で、SMRATを用いたドメイン解析によって2つの膜貫通領域を有する細胞膜タンパク質、またHK3と対をなすRR1とRR2は、それぞれアミノ酸残基225と227のDNA結合タンパク質であった。これら遺伝子産物を用いて、*in vitro*で自己リン酸化活性を評価した結果、HK3は自己リン酸化活性を有していることが明らかになった。これらの結果は、HK3, RR1, RR2はトロポロン産生制御に関与している新規な二成分制御系であることを強く示唆した。

Plant pathogen, Two-component system, Tropolone

講演番号：3C24a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ C校舎24会場

リポポリサッカライド修飾と二成分糸御系の活性化状態を繋ぐsmall gene

Unveiling a small gene that wires statuses of the lipopolysaccharide modifications and a bacterial two-component regulatory system

○加藤 明宣、Groisman, Eduardo[1]（近畿大院・農、[1]イェール大・医・HHMI）
○Akinori Kato, Eduardo Groisman[1] (Kinki University, [1]Yale University HHMI)

細菌は、外界の環境変化を感知し、そのストレスに対し適応する。その際、センサー機能及び情報伝達を担う二成分制御系は、それが統制するレギュロン構成メンバーのうち、ストレス刺激を取り除く働きを持った主要遺伝子を欠いたとしてもrobustな振舞を示す。我々は、サルモネラにおいて、細胞外Fe^{3+}に応答し鉄耐性とポリミキシン耐性を誘導するPmrA/PmrB二成分制御系についてそのinputとoutputの関係性に着目した。本研究において、PmrAにより調節される細胞表層リポポリサッカライド（LPS）を修飾する遺伝子群を段階的に欠損させることで、外膜生理状態に連動し、複数のフィドバックループを繋ぐ新しいsmall geneについての知見を得たので、報告する。

PmrAレギュロンの高度統制における分子機構の更なる知見を得るため、サルモネラ染色体シーケンスからPmrAのDNA結合サイトと、PmrAに直接的に制御される未知遺伝子を探索した。その結果、*pmrCAB*オペロンのうちセンサー遺伝子*pmrB*の下流に新たなPmrA 結合サイトが見付かった。高Fe^{3+}・低Mg^{2+}条件下で、PmrA依存的なsmall RNAの*pmrT*が*pmrB*コード領域に向かって転写されること、更にこのsmall RNAがペプチド因子PmrRをコードすることを見出した。PmrAにより誘導されるLPS修飾遺伝子の*ugd*や*pbgP*の欠損株において、同時に*pmrR*遺伝子が欠失するとPmrA/PmrB系の活性化レベルが高まることから、PmrRもLPS修飾酵素の一つを調節することが示唆された。実際にPmrRは、PmrC依存的lipid A修飾に対し、同じ部位（1位）を拮抗的にビスホスフェート（1-PP）で修飾するLpxTと相互作用しその活性を抑制、細胞表層の負電荷を減じることで、鉄耐性の表現型を付与する機構が見出された。また、*pmrT*がPmrBのタンパク質レベルを局所的に抑制する一方、Ugd/PbgP依存的LPS修飾及び、PmrR/LpxT依存的LPS修飾は、高Fe^{3+}に応答するPmrA/PmrB系の多段階フィードバック調節を執り成していることが明らかとなった。

two-component system, membrane peptide, feedback loop

講演番号:3C24a12
講演日時、会場:3月24日11:21～ C校舎24会場

枯草菌二成分制御系多重破壊株の構築と解析

Multiple gene disruption of histidine kinases in *Bacillus subtilis.*

○美浦裕介[1]、加藤孝弘[1]、高田啓[1]、朝井計[2]、吉川博文[1]
（[1]東京農大・応生科・バイオ、[2]埼玉大・理工学・分子生物）
○Yusuke Miura[1], Takahiro Kato[1], Hiraku Takada[1], Kei Asai[2], and Hirofumi Yoshikawa[1]
(Dept. Biosci, Tokyo Univ. Agric [1], Dept. Mol. Biol, Saitama Univ [2])

【目的】バクテリアは、外界の様々な環境変化に対応するためのシグナル伝達システムを発達させてきた。その中で主要なシグナル伝達システムである二成分制御系(TCS)は、環境シグナルを感知するヒスチジンキナーゼ(HK)と、そのシグナルを受け取り遺伝子制御に関わるレスポンスレギュレーター(RR)によって構成されている。枯草菌では今までに36個のHKと34個のRRが同定されている。しかし一方で、それらの機能が明らかになっているものは半分程度であり、残り半分の機能は依然として不明である。また、単一の環境シグナルに対し、複数の二成分制御系(TCS)が情報伝達に関与している例も報告されている。このような例を考慮すると、単一の遺伝子破壊によってその機能を特定することは容易ではない。そこで我々は、胞子形成や必須性に関わるHKを除く全30種のHKを対象とした多重破壊株の構築を目的とした。さらに、これらの株を用いた表現型の解析により、単一の遺伝子破壊では観察することのできない、新規のストレス経路を探索することを本研究の目的とした。

【方法・結果】本研究では、マーカーレス破壊法(1)を用いて TCS 多重破壊株の構築を試みた。この方法は、従来の薬剤耐性遺伝子を用いたカセット破壊法とは異なり、最終的に薬剤耐性遺伝子がマーカーとして残らない。この破壊法を用いる利点として、（１）破壊遺伝子の数に制限がないという点、（２）薬剤耐性遺伝子の強発現プロモーターが周辺遺伝子に影響を与える可能性がないという点があげられる。我々は、この手法を用いることで 30 種の HK を破壊した TCS 多重破壊株（Δ30 株）を作製することに成功した。Δ30 株を作製する段階で取得した各 TCS 多重破壊株において、複数の TCS 破壊による合成致死性は観察されなかった。本大会では、Δ30 株を用いた、熱、低温、塩、アルカリ、酸ストレスといった各種ストレスに対する耐性解析を行った結果を報告する。

（１）Takuya Morimoto, et al,.(2009) *Genes Genet.Syst.*, 84, pp315-318

Bacillus subtilis ,two-component system,stress

講演番号:3C24a13
講演日時、会場:3月24日11:32～ C校舎24会場

枯草菌のシグマ因子SigIによる細胞壁溶解酵素遺伝子群の転写調節機構

Transcriptional regulation of the genes for the cell wall hydrolases by sigma factor SigI in *Bacillus subtilis*

○朝井　計、市島 睦生、中風呂　裕樹、関口 順一[1]（埼玉大院・理工、[1]信州大・繊維）
○ Kei Asai, Ichishima Mutsuki, Nakaburo Yuuki, Sekiguchi Junichi[1] (Saitamadai, [1]Shinshudai)

【目的】枯草菌のシグマ因子の一つSigI は熱ストレス応答シグマとして見出された。また*sigI*遺伝子は*rsgI*遺伝子とオペロンを形成し、RsgIは膜に局在しSigIの活性化を負に制御するアンチシグマと考えられている。SigIのレギュロンとしてこれまで、*mreBH*（枯草菌のアクチンアイソフォームの一つ)、や*bcrC*（バシトラシン耐性遺伝子）が知られている。最近SigIが*lytE*（細胞壁溶解酵素の1種、ペプチドグリカンのDL-endopeptidaseをコードする遺伝子）を制御していることが報告された(Tseng et al. 2011 Arch. Microbiol. 193:677)。このような背景から、SigIは細胞表層の変化を感知し、表層の構造に関わる因子の発現制御に関わると考え解析をはじめた。

【方法と結果】枯草菌ではこれまで、細胞壁ペプチドグリカンの主要なDL-endopeptidaseとして、CwlO, CwlS, LytE, LytFの4つが知られている。それぞれの構造遺伝子の上流のプロモーター部位を含むと思われるDNA断片と*lacZ*遺伝子との転写フュージョンを作製し、SigIをコードする遺伝子の発現を人為的に変化させた時の、DL-endopeptidase遺伝子のプロモーター活性を測定した。その結果、LytEだけでなく、それ以外のDL-endopeptidase遺伝子の転写にSigIが関与することが示唆された。

CwlOとLytEの欠失は細胞の伸長阻害をまねき、合成致死になる。そこで、SigIと各DL-endopeptidaseの2重破壊株を作製し、その増殖を観察すると、合成致死となる組み合わせが存在した。DL-endopeptidase遺伝子の転写にはSigI以外のシグマ因子も関わっていて、特にCwlOとLytEは低G+Cグラム陽性細菌に広く保存され、増殖に必須である2成分制御系WalK/WalRで正に制御されており、SigIを欠損しただけではその転写は無くならない。そこで、SigI破壊が各DL-endopeptidaseの発現にどの程度影響するかを免疫ブロット法により調べるために、DL-endopeptidaseのC末端にFLAGタグを融合した株を用意した。

SigIで転写を制御される他の遺伝子についても、DL-endopeptidaseとの合成致死性に影響する可能性も考えられた。そこで、マイクロアレイ解析で選出したSigIレギュロン候補遺伝子についても解析を行った。

Keyword1　*Bacillus subtilis*, Keyword2　DL-endopeptidase, Keyword3 sigma factor

講演番号：3C24a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ C校舎24会場

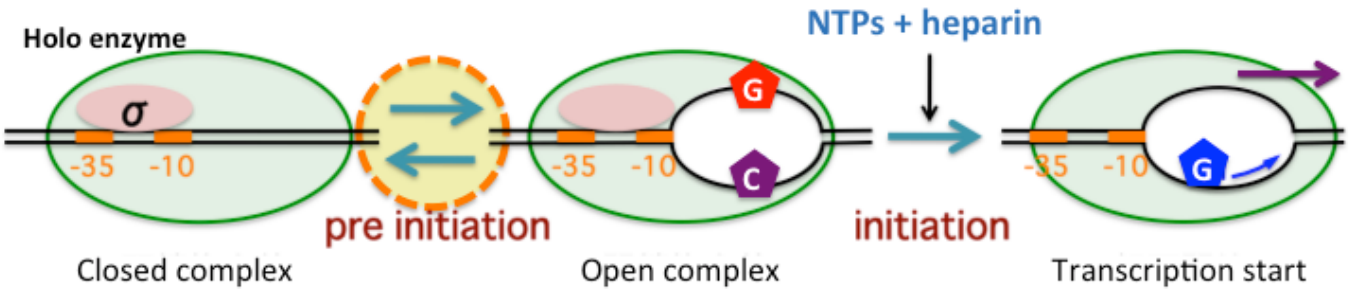
枯草菌における転写開始点に依存した新規熱ショック応答機構の解析

Analysis of novel heat shock response mechanism mediated by the initial nucleotide of transcription.

○佐藤絢、小林郷菜、小川陸雄、渡辺智、千葉櫻拓、吉川博文（東京農大・応生科・バイオ）
○Aya Sato, Satona Kobayashi, Michio Ogawa, Satoru Watanabe, Taku Chibazakura, and Hirofumi Yoshikawa (nodai)

【目的】当研究室において、枯草菌のSigAに依存したプロモーターからの転写量が熱ショックにより上昇するということが見出された。しかし、熱ショック下でも細胞内シグマAの量に顕著な変化は見られず、また既知の転写調節因子の関与はないことがわかっている。そのため、SigAプロモーター配列上には熱ショックによる転写量の上昇を規定している要因があると考えた。種々の解析の結果、この現象が転写開始点(+1)の塩基に依存している事を見出した。そこで、転写開始点の塩基が熱ショック下における転写開始機構に及ぼす影響を解明する事を本研究の目的とした。

【方法・結果】純粋にSigAにのみ制御される*sigA* P2プロモーターに着目して、+1領域を種々の塩基に置換し、*in vivo*での熱ショック応答を耐熱性βガラクトシダーゼを用いたリポーターアッセイにより検証した。その結果、+1のGをAに置換すると熱ショック応答の強度が下がり、TまたはCに置換すると基盤レベルの転写量の減少が見られたことから、転写開始点のGが重要であることが明らかになった。さらに+1に依存した熱ショック応答の分子機構を明らかにするため、RNAポリメラーゼを精製し*in vitro*転写実験により詳細な解析を試みた。その結果、+1のGに依存した転写量の増加にはpre-initiationにおける高温処理が重要であった。また、開鎖複合体を定量する過マンガン酸フットプリントを行ったところ、高温において開鎖複合体の量が増加した。これらの結果から、転写開始点に依存した新規熱ショック応答は、RNAポリメラーゼの温度依存的な開鎖複合体の形成と転写開始におけるGTPとのアフィニティーによる相乗的効果ではないかと考察する。



transcription, heat shock, open complex

講演番号:3C24a15
講演日時、会場:3月24日11:54～ C校舎24会場

耐熱性酵母の高温下における細胞応答と発酵特性

Response of heat-tolerant yeasts to high temperature and fermentation property

○古田 雅一、荒井 尊裕、松永 祐一、石川悦子、小池佳都子、Leelavatcharamas Vichai[1]、岸田 正夫[2]（阪府大院･理、[1]Khon Kaen Univ.、[2]阪府大院･生環）

○Masakazu Furuta, Takahiro Arai, Yu-ich Matsunaga, Etsuko Ishikawa, Kazuko Koike, Leelavatcha ramas Vichai[1], Masao Kishida[2] (Grad. School, Science, Osaka Pref. Univ., [1]Khon Kaen Univ., [2]Grad. School, Life, Environ., Science, Osaka Pref. Univ.,)

【目的】ガソリンなどの代替燃料としてバイオマスエタノールが生産されており、その生産過程でも酵母が利用されている。現在バイオエタノールの生産では原料を加水分解するときの温度が90℃であり、後の酵母による発酵工程においては25℃前後に温度を下げる必要があり、その冷却コストに費用を要することが問題点として指摘されている。

最近熱耐性酵母として発見された*Kluyveromyces marxianus*は*Saccharomyces cerevisiae*よりも高温下で生育が可能であるため、同時に十分な発酵も期待される。本研究においては高い酵母熱抵抗性変異体や耐熱性酵母の熱抵抗性の機構を明らかにするためにパン酵母と耐熱性酵母の高温下での増殖特性や細胞応答について比較検討した。

【方法】酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* BY4741株、協会7号株、熱抵抗性KKU01株、*Kluyveromyces marxianus* IFO 0482を用い、通常の培養温度（*S. cerevisiae*: 30℃、*K. marxianus*: 40℃）よりも高温下での増殖挙動をフローサイトメトリーにおり評価するとともにYPD平板培地を用いたコロニー計数法により生残率を求めた。さらにMTTアッセイ、トリパンブルー染色により、熱処理後の細胞の状態を検討した。発酵特性は10%グルコースに菌体（～10^7 CFU/mL）を添加し、各温度でしんとう培養し、溶液中のエタノール含量を酵素法(E-液状キット エタノール、Diasys Diagnostics System GmbH) にて定量した。

【結果】熱耐性酵母は*S. cerevisiae*BY4741株が増殖できない40℃以上の温度でも増殖することが分かった。MTTアッセイの結果、熱抵抗性酵母は*S. cerevisiae*BY4741に比べてどの熱処理条件においても代謝活性が上回っていた。トリパンブルー染色による細胞膜の損傷についても同様に、どの処理条件においても熱耐性株の方が耐性を示す傾向がみられた。

発酵特性に関しては30℃以下においては*Kluyveromyces marxianus* IFO 0482株は*Saccharomyces cerevisiae* 協会7号株と同等の発酵力を示したが、43℃では*Saccharomyces cerevisiae* 協会7号株、BY4741株よりは発酵力が強く培養開始から10時間程度は30℃と同程度の発酵力が維持されていた。

Kluyveromyces marxianus 、heat tolerance, ethanol production

講演番号：3C24p01
講演日時、会場：3月24日13:49～ C校舎24会場

酵母における一酸化窒素の下流経路の解析

Analysis on the downstream pathway of nitric oxide in yeast

○真砂裕紀、西村 明、高木博史（奈良先端大・バイオ）
○Yuki Manago, Akira Nishimura, and Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は真核生物のモデルとしてだけでなく、パン類、酒類、バイオエタノールなどの製造に重要な微生物である。酵母は実際の発酵生産環境において、冷凍、乾燥、高温、高浸透圧、高濃度エタノールなどに曝されており、細胞内はミトコンドリア膜の損傷や抗酸化酵素群の変性などに伴って活性酸素種（ROS）が蓄積する「酸化ストレス」状態にある。したがって、過酷なストレス下では、酵母の有用機能（エタノール生産、炭酸ガス発生、味・風味物質の生成など）の発現が制限されている。当研究室では最近、酵母において酸化ストレスに応答し、プロリンからのアルギニン合成が亢進されること、また増加したアルギニンから一酸化窒素（NO）が NO 合成酵素（NOS）様タンパク質である Tah18 に依存的に生成され、細胞の酸化ストレス耐性に寄与していることを見出した。NO は哺乳類においてシグナル分子として細胞の酸化ストレス応答や耐性に重要な働きを担っていると報告されているが、酵母などの真菌類における NO の生理機能、特に NO が関与するストレス耐性機構は不明である。そこで本研究では、酵母の細胞内におけるＮＯの下流経路に着目し、ＮＯの機能解析を行うことを目的とした。

【方法・結果】本研究では NO によるタンパク質のニトロソ化について解析を行った。酵母 *S. cerevisiae* S288C 系統の野生株を使用し、非酵素的な NO 発生ドナー（SNAP）で処理した細胞と未処理の細胞について DNA マイクロアレイ解析を行い、NO による網羅的な転写量変化を調べた。また、標的遺伝子の転写については、リアルタイム PCR を行い、マイクロアレイ解析の再現性を確認した。その結果、酵母の銅イオン代謝に関与する転写因子 Mac1 の制御下にある遺伝子群（*CTR1, FRE1*, *FRE7* など）の転写量が増加していることが判明した。Mac1 は分子内にシステイン残基を多く含む 2 つのモチーフが存在する転写因子で、銅イオンの取り込みを促進し、銅依存的な superoxide dismutase 1（SOD1）の活性化などの調節を行っている。そこで、酵母の細胞抽出液を用いて、SNAP による NO 処理後の銅の取り込み量、および SOD1 活性を測定した。その結果、NO 未処理に比べ、NO 処理後では細胞内の銅含量が上昇していることが明らかとなった。また、SOD1 の活性も NO 未処理のものと比べ増加していた。Mac1 の遺伝子破壊株では SOD は活性を持たないので NO 処理後においても変化は見られなかった。以上の結果から、我々は NO によるシステイン残基のニトロソ化を介して Mac1 が活性化され、Cu^{+}イオンの取り込みを促進することで SOD1 活性が上昇し、酸化ストレス耐性を獲得するという仮説を考えている。現在、*in vitro* と *in vivo* の系で NO による Mac1 の活性制御機構を解析している。

yeast, nitric oxide, copper uptake

講演番号：3C24p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ C校舎24会場

サルモネラRcsC/RcsD/RcsB系の活性化に関わるコネクター様因子RcsGの単離と解析

Isolation and characterization of RcsG, a novel connector like factor that activates the RcsC/RcsD/RcsB system in *Salmonella*

○ 萩原 慧、加藤 明宣、内海 龍太郎（近畿大院・農）
○ Kei Hagihara, Akinori Kato, Ryutaro Utsumi (Kinki University)

【目的】 細菌が外界を感知し、応答する情報伝達機構として二成分制御系が知られる。最近、サルモネラ（*Salmonella typhimurium*）の病原性調節ネットワークにおいて、複数の二成分制御系間を繋ぐスモールタンパク質“コネクター”がそのネットワーク形成に重要な役割を担うことが明らかとなって来た。そこで、このネットワークに関わる更なる未知コネクター因子の単離と分子機構の解明を目的とした。

莢膜多糖合成遺伝子群を活性化する RcsC/RcsD/RcsB 系は、ヒスチジンホスフォトランスフェラーゼ (HPt) ドメインを単独のリン酸基転移部位として保持する RcsD が、ヒスチジンキナーゼ (HK) RcsC とレスポンスレギュレーター (RR) RcsB の間でリン酸リレーを中継する、変則的な二成分制御系を形成している。RcsC を構成的に活性化したサルモネラの変異株は、その病原性を減弱させることがこれまでに報告されている。本研究では、この RcsC/RcsD/RcsB 系の活性化に関わる新規調節因子の単離を試みた。

【方法と結果】まず、RcsB によって制御されている *wzc* 遺伝子に *lacZ* を融合させたレポーター株を作成した。次に、サルモネラ染色体上で 130aa 以下のタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)として選択し、発現ベクターに組み込むことで small ORF ライブラリーを作成した。*wzc-lacZ* レポーター株にこのライブラリーを導入・発現し、*lacZ* の発現を上昇させるクローンを探索し、LB/X-gal プレート上で青色を呈するコロニーから pKH1 を単離した。シーケンス解析の結果、pKH1 が 100 aa から成る可溶性タンパク質をコードする ORF を含むことが予測され、その遺伝子を *rcsG* とした。*rcsC*、*rcsD*、*rcsB* それぞれの欠損株では RcsG の過剰発現による *wzc-lacZ* の活性化は確認されなかった。よって、RcsG による *wzc* の活性化は RcsC/RcsD/RcsB に依存的であることが示され、リン酸リレーの関与が示唆された。また、RcsG の直接的な標的を調べるため bacterial two-hybrid system (BACTH) 法による解析を行ったところ、RcsD と RcsG 間で相互作用が検出された。さらに、*rcsG* は phospho-transferase system (PTS) や PTS regulation domain (PRD)といった、他のスモールタンパク質をコードする遺伝子などとオペロンを形成していることが予測され、それらの遺伝子欠損による *wzc* 発現への影響が調べられた。その結果、アンピシリンを含む LB 培地において、顕著な発現低下が認められた。

two-component system, connector, network

講演番号：3C24p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ C校舎24会場

絶対嫌気性菌のO_2存在下における生育とH_2O_2の影響

Growth of obligate anaerobes in the presence of O_2 and H_2O_2

○山本 聖也、鈴木 一平、熊井 康人、上條 真紀子、小野寺 央、新村 洋一、川崎 信治（東農大応生科・バイオ）

○Seiya Yamamoto, Ippei Suzuki, Yasuhito Kumai, Makiko Kamijou, Onodera Akira, Youichi Niimura, Sinji Kawasaki (TUA, Bioscience)

【目的】絶対嫌気性菌はO_2存在下で生育が阻害されるが、生育阻害の分子機構は不明である。代表的な絶対嫌気性菌の*Clostridium*属細菌において、O_2と活性酸素を同時に、かつ高速に消去する優れた酵素複合体の存在が明らかとなり[1)]、その生育阻害要因はO_2毒性防御酵素の脆弱性によるものではないことが推測される。そこで本研究では、様々な絶対嫌気性菌を供試菌として用い、異なるO_2濃度下での生育の観察と、生育を停止する要因の解明を目的として、H_2O_2に着目して研究を行った。

【方法・結果】絶対嫌気性菌として、*Clostridium*属細菌、硫酸還元菌、メタン生成菌を供試菌として用い、異なるO_2濃度下での生育を観察した。また、生育停止要因の１つとしてH_2O_2に着目し、嫌気培養下でH_2O_2濃度の生育への影響を観察した。現在、生育停止に伴う分子機構の解析を行っている。

1) Kawasaki et al. AEM 75:1021-1029(2009)

Clostridium, oxidative stress, anaerobe

講演番号：3C24p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎24会場

嫌気性菌ビフィズス菌の生育に及ぼす環境要素

Enviromental factor on the growth of *Bifidobacterium* strains

○熊谷　菜生子、小島　裕貴、伊集院　奨、田中　邦房、新村　洋一、　川崎　信治（東農大応生科・バイオ）

○Naoko Kumagai, Hiroki Kojima, Susumu Ijyuuin, Kunifusa Tanaka, Youichi Nimura, Shinji Kawasaki (TUA, Bioscience)

【目的】ビフィズス菌のO_2存在下における生育阻害要因の解明と、各種環境要素による生育促進機構の解明を目的として研究を行っている。現在までにビフィズス菌のO_2存在下での生育阻害要因が、ビフィズス菌自身が生成するH_2O_2に起因することを推定している[1)]。また平板培養法においてO_2とCO_2による生育促進効果が観察されている[2)]。これらの研究は、栄養源の豊富なMRS培地を用い行った。

本学会では、目的以外の環境要素の影響を軽減するために、半合成培地を用いた培養法の確立と、本培地を用いて各種環境要素の影響を解析したので報告する。

【結果】半合成培地を用いて、数種のビフィズス菌を培養したところ、一部の菌株が良好に生育した。良好に生育した菌株を用いてO_2とCO_2の生育に及ぼす影響を観察したところ、CO_2と低濃度O_2による生育促進効果に関して再現性が得られた。さらに、H_2O_2分解速度の遅い半合成培地を作製し、嫌気条件下でH_2O_2の生育を観察したところ、H_2O_2濃度に応じた生育の阻害が観察された。現在、各種環境要素下での生理解析を行っている。

1)2)　Kawasaki.*et al*, AEM. 73: 7796-7798 (2007) 、AEM. 75:629-636 (2009)

Key word1,*Bifidobacterium*　Key word2,Oxidative stress

講演番号：3C24p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ C校舎24会場

トランス型脂肪酸高利用性プロバイオティクスの探索とその特性解析

Search for probiotics with high utilization ability of trans-fatty acid and their characterization analyses.

○有友亮太、鈴木将憲、川井　泰、北澤春樹、齋藤忠夫　（東北大院・農）
○ Ryota Aritomo, Masanori Suzuki, Yasushi Kawai, Haruki Kitazawa, Tadao Saito (Tohokudaiin)

【目的】トランス脂肪酸を多量に摂取すると、動脈硬化などの生活習慣病リスクが上昇する。そのため欧米では食品中含量の表示が義務化されている国が増えている。本研究では培地中に添加したそのトランス型脂肪酸（エライジン酸）利用性の高いプロバイオティクス（乳酸菌）を選抜した。乳酸菌には培養時に脂肪酸を必要とする「脂肪酸要求株」、および必要としない「脂肪酸非要求株」が存在したので、両タイプにおいて培地中に添加した脂肪酸の経時的な利用性の差異を明らかにすることを目的とした。

本研究ではトランス脂肪酸高利用性乳酸菌の温度ストレス下における添加脂肪酸および細胞膜脂肪酸組成の関係を精査するため、脂肪酸要求株である *Lactobacillus gasseri* ME-265、非要求株である *Lactobacillus salivarius* ME-269（脂肪酸利用性の異なる 2 菌株）について、エライジン酸、オレイン酸の 2 種類の脂肪酸を様々な温度条件で培養を行い、各菌体脂肪酸組成の分析を行った。

【方法】オレイン酸およびエライジン酸の経時的な利用特性から選抜した脂肪酸要求株*L. gasseri* ME-265、脂肪酸非要求株*L. salivarius* ME-269の2菌体を、0.02%オレイン酸およびエライジン酸添加した変法MRS培地（MRS培地よりBeef ExtractおよびTween80を除いたもの)、また対照区として変法MRS培地（OLL2771に関してはMRS培地）で25℃、37℃、42℃にて24時間培養した。また37℃で培養したのち4℃にて24時間保存したもの、その後さらに25℃もしくは37℃で静置し、培養上清と菌体に分画した。菌体から菌体膜構成脂質である極性脂質（糖脂質＋リン脂質）画分および中性脂質画分を調製した。培養上清および両画分をガスクロマトグラフィー（GLC）分析し、各菌体の脂肪酸利用性および菌体膜脂肪酸組成について調べた。

【結果】脂肪酸要求株である*L. gasseri* ME-265、非要求株である*L. salivarius* ME-269において低温条件での適応性に差異があることが明らかになった。

L. gasseri ME-265（脂肪酸要求株）では膜組成の変化は中温環境での培養時のみであり、培地中に添加した脂肪酸の取り込みは全温度条件で確認された。 *L. salivarius* ME-269（脂肪酸非要求株）では膜組成の変化は培養時、培養後問わず菌体が中温から低温条件におかれた際に確認された。また、その後通常の生育適正温度に静置することで、膜組成の回復がエライジン酸添加培地において確認された。培地中の脂肪酸の取り込みは中温での培養時のみ確認されなかった。このことから培地中からエライジン酸を有効に除去または低減するには、菌体の脂肪酸利用性が温度ストレスに左右されない脂肪酸要求株*L. gasseri* ME-265が有用であると考えられた。

Keyword1 probiotics, Keyword2 fatty acid, Keyword3 gas chromatography

講演番号：3C24p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ C校舎24会場

乳酸菌のコール酸耐性へのResveratrolの効果、及びサーチュインホモログの解析

Effects of Resveratrol on the Cholate Tolerance of Lactic Acid Bacteria and Molecular Characterization of Their Sirtuin Homolog Proteins

○新　穂高、藤村　朱喜、田中　尚人[1]、岡田　早苗[1]、中川　純一
（東農大院・食科、[1]東農大・菌株保存室）
○Hotaka Atarashi, Shuki Fujimura, Naoto Tanaka[1], Sanae Okada[1] and Junichi Nakagawa
Dept. Food Sci. and Technol. Grad., Tokyo Univ. Agric. [1]Culture Collection Center, Tokyo Univ. Agric.

【目的】乳酸菌は腸内フローラのバランスを調整するプロバイオティクスとして注目されている。しかし、乳酸菌がその機能を発揮するためには、胃酸や胆汁酸等に耐え、腸管まで到達する必要がある。そこで本研究では、胆汁酸の主成分であるコール酸に対する耐性能を解析する。また、*Lactobacillus casei* 株はSirtuin型HDAC(以下サーチュイン)のホモログを保有することから、真核生物で知られるエピジェネティック制御のプロトタイプの存在が期待される。そこで、乳酸菌のコール酸耐性能獲得に伴う遺伝子発現調節にエピジェネティック様の制御が関与する可能性について解析する。
【方法・結果】検討対象として3株の*Lactobacillus casei* 株、即ち、チーズ由来NRIC 0644株、サトウキビワイン由来NRIC 1917株、コンポスト由来NRIC 1981株(以下NRIC省略)を用い、MRS培地に終濃度0.2～5.0 mMのコール酸を添加し、生育への影響を検討した。その結果、5.0 mMのコール酸濃度では1917株、1981株、0644株の順にコール酸耐性が高い事が明らかになった。一方、これら3株の全ゲノム配列を解析したところ、3株全てがサーチュインホモログを保有することが明らかになった。*L. casei* 3株に存在するサーチュインホモログ配列の相同性は非常に高く、更に1981株においては*Lactobacillus rhamnosus*型のサーチュインホモログ配列についてもその存在が見出され、1981株が0644株、1917株とは異なり、2つのサーチュインホモログを保有していることが示された。次に、コール酸耐性能獲得にエピジェネティック制御が関与するかを検討するため、サーチュインの賦活剤として報告されている、Resveratrolを乳酸菌に作用させ、コール酸添加MRS培地中での生育を観察した。その結果、Resveratrol未処理のものと比較し、良好な生育が観察され、コール酸耐性能が向上したことが示された。これらの結果は、乳酸菌でも真核生物のエピジェネティック制御に類似の環境応答機構が存在する可能性を示唆していると考えられる。そこで、それぞれのサーチュインホモログ遺伝子をクローニングし、大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質を生産し、アフィニティ―カラムで精製した。その結果、*L. casei* 3株のサーチュインホモログはSDS PAGEによって29 k Daの単一バンドとして検出された。また、1981株の*L. rhamnosus*サーチュインホモログは34 k Daの単一バンドとして検出された。これらの組換えタンパク質の詳細な性質について現在、解析を行っている。

Lactobacillus casei,Sirtuin,Cholate-tolerance

講演番号：3C24p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎24会場

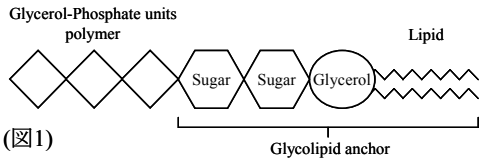
Lactobacillus gasseri JCM1131^T のリポテイコ酸：胆汁酸適応への関与

Lipoteichoic acid in *Lactobacillus gasseri* JCM1131^T and its involvement in bile acid adaptation

○白石宗、冨田理[1]、田中尚人[2]、吹谷智、森田直樹[3]、横田伸一[4]、岡田早苗[2]、横田篤 (北大院農・応生科、[1]NIZO food research、[2]東農大・応生科、[3]産総研・生物プロセス、[4]札医大医・微生物)

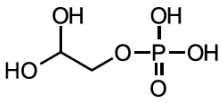
○Tsukasa Shiraishi, Satoru Tomita[1], Naoto Tanaka[2], Satoru Fukiya, Naoki Morita[3], Shin-ichi Yokota[4], Sanae Okada[2], Atsushi Yokota (Hokkaido Univ., [1]NIZO food res., [2]Tokyo Univ. Agr., [3]AIST, [4]Sapporo Med. Univ.)

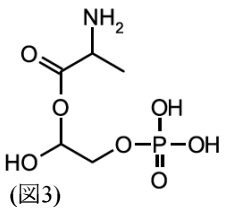
【背景と目的】 腸管内に生息する *Lactobacillus gasseri* はプロバイオティクスとして実際に利用される乳酸菌である。我々は *L. gasseri* JCM1131^T の胆汁酸に対する適応現象を発見した。胆汁酸適応とは、胆汁酸の主な構成成分であるコール酸を非致死濃度 (4 mM) 含む培養液に、細胞を短時間 (30分) 暴露させることで、致死濃度 (15 mM) のコール酸ストレスに対して耐性を獲得する現象である。我々は、この適応現象のメカニズムの解明を目指し、適応現象に細胞膜脂質が関与することを明らかにしている。本研究では細胞膜に結合する細胞表層多糖であるリポテイコ酸 (LTA) に着目した。LTAは、一般的にグリセロールリン酸ユニットで構成される主鎖を持ち、細胞膜の糖脂質を介して結合する (図1) 。また、表層電荷の要因にもなり、LTAの構造の一部を修飾変化させることで、表層電荷を調節し、電荷を持つ抗菌物質への物理的防御として機能すると報告される。本研究ではマイナス電荷を持つコール酸への適応現象とLTAの関与を明らかにすることを目的とする。



(図1)

【方法と結果】 コール酸適応株と非適応株からブタノール抽出法によりLTAを抽出後、疎水性クロマトグラフィーによってLTA画分を得た。得られた両者のLTA画分は、NMR (^{1}H, ^{13}C, COSY, HMQC, HMBC) による構造解析を行い、LTAのユニット構造の変化を観察した。その結果 *L. gasseri* JCM1131^T は、グリセロールリン酸 (図2) とグリセロールの2位にアラニンを持つ2-アラニルグリセロールリン酸 (図3) ユニットの2種のユニットをLTA分子中に持つことが明らかになった。しかし、適応による構造変化は確認されなかった。また、Native PAGEによってユニット鎖長を、水層と有機溶媒層への分配で表層極性を比較するヘキサデカン法や表層電荷を観察するゼータ電位の測定によって表層電荷の変化を観察したが、ユニット鎖長、表層性状に変化は観察されなかった。さらに、LTAの疎水部位である脂肪酸の構成変化をGCで観察したが、両者に変化は見られなかった。なお、現在LTA特異的抗体を使用したイムノブロット法によるLTAの細胞当たりの量の変化を観察中である。


(図2)


(図3)

【考察】 本研究では腸管乳酸菌 *L. gasseri* JCM1131^T の LTA のユニット構造を初めて明らかにした。また、コール酸適応によって、LTA の構造や鎖長、それに伴う表層性状に変化は確認されず、これまでのところ LTA はコール酸適応機構には関与していないと考えられた。

Lactobacillus gasseri, Bile acid, Lipoteichoic acid

講演番号：3C24p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎24会場

過酷な環境に生息する藻類の探索と環境ストレス応答

Isolation and characterization of microalgae living in the severe environments

○水口 佳祐、佐藤 大、二ノ宮 千夏、甫木 隼貴、高橋 妙華、川崎 信治
（東農大応生科・バイオ）
○Keisuke Mizuguchi, Masaru Sato, Chinatsu Ninomiya, Junky Hoki, Taeka Takahasi
Shinji Kawasaki(Department of Biosciences, Tokyo University Agriculture)

【目的】光合成生物は、強光が付随する高塩濃度、乾燥、高温や低温などの環境ストレスが混在する過酷な環境下では、光合成反応が阻害され生育は困難である。当研究グループでは、生物の生存が一見不可能かと思われる真夏のアスファルトや砂漠土壌などの、自然界の様々な過酷な環境から藻類の単離に成功した。単離された藻類はその分離源の特徴から、高度なストレス耐性機構を有していることが推察された。本学会では過酷な環境に生育する藻類の探索と、単離された藻類のストレス耐性期の分子応答に関して報告する。
【方法 結果】過酷な環境から表層土壌を採取し、太陽光を増強した強光条件下でスクリーニングを行った。単離された藻類のうち、培養に成功した菌体を使用して強光条件下で乾燥ストレス、塩ストレスを付与しその経過を観察したところ、モデル藻類であるクラミドモナスが白色化し死滅したが、単離株は長期間生存し、その後の回復実験で緑色に回復した。現在は単離株中でも特に優れたストレス耐性能を示したKI-4株を用いて、ストレス耐性期のプロテオーム解析を行い、ストレス耐性機構の推定を行っている。

microalgae, protein, 2D

講演番号：3C24p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎24会場

過酷な環境から単離された藻類の環境ストレス耐性機構

Mechanism of environmental stress tolerance of microalgae isolated from severe environments

○佐藤　大、水口　佳祐、甫木　隼貴、二ノ宮　千夏、三島　直、新村　洋一、川崎　信治、(東農大応生科・バイオ)

○Masaru Satou,Keisuke Mizuguchi,Junki Hoki,Chinatsu Ninomiya,
Nao Mishima,Youichi Nimura,Shinji Kawasaki
(Department of bioscience,Tokyo University of Agriculture)

【目的】藻類は光エネルギーを利用した光合成により生育するが、強光が付随するストレス環境下では生育が阻害される。当研究室で真夏のアスファルトや砂漠など環境ストレスが混在する過酷な環境から単離した藻類は、強光下の水分欠乏状態で長期間の生存が可能であった。このことから、単離された藻類には優れた環境ストレス耐性機構の存在が推察される。本研究ではこれら藻類の生体成分解析を通して、環境ストレス耐性機構の解明を目的とする。
【方法・結果】真夏のアスファルトや塩堆積土壌、砂漠土壌から単離された真核性の藻類、またクロレラやクラミドモナスなどモデル真核藻類を供試菌とし、強光条件下で乾燥ストレスや塩ストレス付与を行なった。ストレス経時的に菌体を集菌し、ブライダイヤー法により色素や脂質、糖、アミノ酸などの生体成分を分画抽出した。HPLC やガスクロマトグラフィーにて成分組成の定性・定量解析を行ったところ、個々の菌株に応じた特有の組成変化が観察された。

microalgae,carotenoid,fatty acid

講演番号：3C24p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎24会場

高圧力に耐える深海微生物のべん毛運動

Flagellar motility of deep-sea bacterium under high pressure conditions

○仲宗根　薫[1]、山野　由美子[1]、加藤　千明[2]、西山雅祥[3]（[1]近畿大・院・システム工学、[2]海洋機構、[3]京都大・院・理）

○Kaoru Nakasone[1], Yumiko Yamano[1], Chiaki Kato[2], Masayoshi Nishiyama[3]

([1]Kinki Univ., [1]JAMSTEC, [1]Kyoto Univ.)

琉球海溝の深海（約5,110m）底泥より単離された*Shewanella violacea* DSS12株は、8℃、30MPaに生育至適条件をもつ、グラム陰性の好冷好圧性細菌である。低温・高圧の環境に適応する本菌株は、大気圧と高圧下での生育に大きな違いはなく、細胞から分子レベルまで様々な生物学的現象が解析可能なモデル深海微生物である。高圧への適応の分子メカニズムを理解していくことは本微生物や生体物質の産業応用へと繋がる可能性を秘めているが、高圧や低温環境下における生物学的現象にどのようなタンパク質が、分子・原子レベルで適応しているかという理解は進んでいない。本研究では高圧下における深海微生物のべん毛運動に着目し研究を行った。これは、多くのタンパク質複合体が共調することで機能を発現し、細胞から分子レベルでの解析が可能なシステムであることが、研究対象にした主な理由である。

本実験では、高圧顕微鏡を用い、様々な圧力条件下で、DSS12 株のべん毛の回転数(Hz)と遊泳速度(V)のを測定した。具体的には 0.1MPa（常圧）から 100MPa まで加圧、その後圧力を 0.1MPa（常圧）まで下げながら連続的に加圧と減圧を行う条件で、細胞運動の観察を行った。回転数は全圧力下でほぼ一定である事が明らかとなった。また遊泳速度は 60MPa まで一定であったが、80MPa,100MPa では速度が低下した。遊泳運動は停止することはなく減圧過程においては初期の遊泳速度に近い値を示した。回転数及び遊泳速度は 60MPa まではほぼ一定であったにも関わらず、60MPa 以降では遊泳速度の低下が観察された。この現象は外部要因（例：高圧力による培養液の変化）と内部要因（例：べん毛装置自体の影響）の二つの要因に分けて考察することが可能であり、この現象の解釈について議論を行う。また、本菌株にコードされる全てのべん毛関連遺伝子の構造解析も同時に行い、べん毛関連遺伝子の破壊株の作成も試みているので併せて報告したい。

deep-sea bacterium, high pressure conditions, flagellar motility

講演番号：3C24p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ C校舎24会場

酢酸菌*Tanticharoenia sakaeratensis*の有する高濃度グルコース耐性に対するゲノム解析

Genome analyses for hyper glucose tolerance of an acetic acid bacterium, *Tanticharoenia sakaeratensis*.

○波多野 裕美、平川 英樹[1]、松下 一信[2]、武部 聡、東 慶直（近畿大院・生物工、[1]かずさDNA研、[2]山口大・農）

○Hiromi Hadano, Hideki Hirakawa[1], Kazunobu Matsushita[2], Sou Takebe, Yoshinao Azuma (Grad. Sch. BOST, Kinki Univ., [1]Kazusa DNA Res. Ins., [2]Faculty of Agr., Yamaguchi Unv.)

【目的】酢酸菌はα-proteobacteriaに属する細菌群であり、自然界の中では果実や花の蜜などといった糖が蓄積されているニッチに広く分布している。酵母と共棲する場合が多く、酢酸菌の特徴として、酵母が生産するエタノールを酢酸へと代謝する能力を有する。また、多くの酢酸菌は比較的高い糖濃度下で増殖し、特に*T. sakaeratensis*はグルコース30%下でも増殖可能である(Yukphan et al. BBB 2008)。その*T. sakaeratensis*のゲノムDNA配列解析をはじめとするゲノム解析により、*T. sakaeratensis*が有する高濃度グルコース環境下で増殖を可能としている機構および遺伝子群を明らかにする。

【方法】*T. sakaeratensis*のゲノムDNA配列解析にはイルミナ社の次世代シーケンサーを用い、ドラフト配列から全遺伝子を決定した。プロテオーム解析には、*T. sakaeratensis*をグルコース0.5%および30%を含む培地で培養し、可溶性タンパク質、細胞膜結合型タンパク質および細胞膜タンパク質の3種類に分画した後、一次元および二次元電気泳動により分離したタンパク質に対して、エドマン分解法によるN末端のアミノ酸配列を決定し、それぞれのタンパク質をコードする遺伝子を決定した。

【結果】*T. sakaeratensis*はグルコース（0.5%から30%）の濃度に従い、その増殖速度は低下する。しかし、電子顕微鏡観察では顕著な形態的変化は見られなかった。また、*T. sakaeratensis*はグルコース30%下での培養ではその浸透圧に抵抗性を示すだけではなく、急速にグルコースを消費し、酸性産物を生成していた。グルコース0.5%および30%下での*T. sakaeratensis*のタンパク質プロファイルの比較および数十のタンパク質のアミノ酸配列の決定を行い、コードする遺伝子を同定した。特にグルコース30%下ではピルビン酸代謝を行う遺伝子産物の蓄積や特定の外膜タンパク質の減少が観察された。

【考察】グルコース30%下でグルコースを消費していることとピルビン酸代謝を行う遺伝子産物pyruvate decarboxylaseの蓄積が観察されたことから、高濃度グルコースを代謝する際に過剰に生成されたピルビン酸を、*T. sakaeratensis*はpyruvate decarboxylaseを使用することでアセトアルデヒドを経て酢酸へと代謝していることが示唆された。pyruvate decarboxylaseが高濃度グルコース環境に適応するための一つの手段になっていると思われる。本学会ではトランスクリプトーム解析等の結果も踏まえ、発表する。

Acetic acid bacteria, stress response, genomics

講演番号:3C24p12
講演日時、会場:3月24日16:10～ C校舎24会場

超好熱始原菌のリボソーム画分に存在する高温依存的なタンパク質の解析

Physiological roles of heat inducible proteins found in ribosomal fraction of *Thermococcus kodakarensis*

○青木 俊[1,2]、大西 優介[1,2]、秀瀬 涼太[2]、細川 桂一[3]、跡見 晴幸[4]、今中 忠行[5]、藤原 伸介[1,2] ([1]関学大院・理工・生命科学、[2]関学大院・理工・生命環境科学研セ、[3]関学大院・理工・化学、[4]京大院・工・合成生化、[5]立命館大・生命科学・生物工学)

○Shun Aoki[1,2], Yusuke Onishi[1,2], Ryota Hidese[2], Keiichi Hosokawa[3], Haruyuki Atomi[4], Tadayuki Imanaka[5], Shinsuke Fujiwara[1,2]

([1] Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Sci. and Tech., Kwansei Gakuin Univ.
[2] Res. Cent. for Environ. BioSci., Grad. Sch. of Sci. and Tech., Kwansei Gakuin Univ.
[3] Dept. of Chem., Grad. Sch. of Sci. and Tech., Kwansei Gakuin Univ.
[4] Dept. of Synth . Chem. and Biol. Chem., Grad. Sch. of Eng., Kyoto Univ.
[5] Dept. of Biotech., Coll. of Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【目的】超好熱性始原菌 *Thermococcus kodakarensis* は60℃から100℃の幅広い温度で生育でき、至適生育温度は85℃である。至適生育温度(85℃)及び高温(93℃)における遺伝子の転写動態を調べるためにマイクロアレイ解析を行った。この結果、高温誘導型のユニークな遺伝子クラスター(*TK0482-TK0488*)が見つかった。このクラスターを構成する遺伝子のホモログはバクテリアやユーカリアには存在せず、*Thermococclaes* 目に属する一部の超好熱菌のみに存在する。*T. kodakarensis* における *TK0482-TK0488* や他の菌が有する遺伝子ホモログの生理的意義や機能は未解明である。これらのことから、*T. kodakarensis* 等の超好熱菌においては、至適生育温度より高温での生育にこの遺伝子クラスターが関与していると予測し、生体内での役割について知見を得ることを目的とした。
【方法】まず *TK0482* の培養温度依存的な発現量変化を調べるため、60℃、85℃及び93℃で培養した*T. kodakarensis* から抽出したRNA及び細胞質画分を用いてqRT-PCRとWestern blotting 解析を行った。つぎに、生理的役割について知見を得るために4種の遺伝子破壊株(Δ TK0482, Δ TK0482-TK0485, Δ TK0486-TK0488, Δ TK0482-TK0488)を作製した。取得した破壊株と野生株を60℃、85℃、93℃で培養し生育特性の違いを調べた。また抗TK0482抗体を用いて、細胞内局在を明らかにした。さらにショ糖密度勾配遠心分画による検討を行い、リボソームへの結合を調べた。
【結果と考察】qRT-PCR 及びウェスタンブロッティング解析により、高温ストレス環境下(93℃)で TK0482 の発現が促進されることが分かった。そして多重遺伝子破壊株を作製して生育特性解析を行った結果、クラスター内の全遺伝子を破壊した株 (Δ TK0482-TK0488)では、高温での生育が阻害された。つぎにTK0482の細胞内局在を調べた結果、粗リボソーム画分に局在していることが分かった。そして粗リボソームを各サブユニットに分画して検討した結果から、 TK0482 は30Sサブユニットに結合していることが明らかとなった。これらの結果から、TK0482-TK0488 は高温においてリボソームの機能に必須な因子であることが考えられた。

Keyword1 Archaea, Keyword2 growth-temperature dependency, Keyword3 ribosome

講演番号：3C24p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎24会場

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 のバイオフィルム形成に関与するポリアミン合成酵素系の検討

Contribution of polyamine synthetic enzymes to biofilm formation in *Synechocystis* sp. PCC 6803

○七谷圭[1]、佐伯千香[1]、冨永昂[1]、東恭平[2]、五十嵐一衛[2]、古川壮一[3]、森永康[3]、赤井政郎[1]、魚住信之[1]（[1]東北大・院工、[2]千葉大・院薬、[3]日本大・生資科）

○KEI NANATANI[1], CHIKA SAEKI[1], AKIRA TOMINAGA[1], KYOHEI HIGASHI[2], KAZUEI IGARASHI[2], SOUICHI FURUKAWA[3], YASUSHI MORINAGA[3], MASAROU AKAI[1], NOBUYUKI UOZUMI[1] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. of Pharm., Chiba Univ., [3]Col. of Bio. Sci., Nihon Univ.)

【目的】ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 は比較的高い塩濃度でも生育し、昼間は光合成を行う変化の大きな環境で生育できることから、多様な環境適応機構を有していることが推定される。本研究グループは、これまでに塩ストレス環境で *Synechocystis* がバイオフィルムを形成することを報告している。バイオフィルムは、細胞外多糖類（exopolysaccharide）を基本成分として、タンパク質、核酸などからなり、細菌、真菌、藻類、原生生物など様々な微生物が形成し、薬剤抵抗性、乾燥耐性の獲得に関与することが知られている。しかしながら、 *Synechocystis* のバイオフィルム形成に関する知見は乏しく、形成メカニズム関する研究は、ほとんどなされていない。そこで、本研究では、浸透圧ストレスが *Synechocystis* のバイオフィルム形成を誘導することを明らかにし、さらに、細胞分裂や DNA の複製、各種ストレス適応などにおいて重要な役割を果たしているポリアミンとバイオフィルム形成の相関を明らかにするためポリアミン生合成関連酵素に着目して、ポリアミンのバイオフィルム形成への関与を検討した。

【方法】*Synechocystis* sp. PCC6803 の *adc1*、adc*2* の単独欠損株、二重欠損株を BG11、250mM、500mM の NaCl を添加した BG11 で 8 日間培養し、クリスタルバイオレット染色法によるバイオフィルム形成定量および吸光度測定による生育測定を経時的に行った。また、培養 7 日目の培養液中および細胞中のポリアミン量を、高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

【結果】*Synechocystis* 野生株では培養 6 日目にバイオフィルム形成のピークが見られたが、*adc2* 欠損株、*adc1,adc2* 二重欠損株は塩ストレス非存在下で培養初期からバイオフィルムを形成していた。細胞内ポリアミン量は、*adc1* 欠損株と *adc1,adc2* 二重欠損株で、細胞内スペルミジン(SPD)が減少していた。また、すべての株で塩ストレスにより細胞内 SPD が減少し、細胞外 SPD が増加していた。培養 7 日目のバイオフィルム形成量との比較から、細胞内 SPD が減少もしくは細胞外 SPD が増加すると、バイオフィルムが増加することが示唆された。そこで培地に SPD を添加し、同条件でバイオフィルム形成量を測定した。しかし添加量と形成量に相関が見られないことから、細胞内 SPD によってバイオフィルム形成量が調節されていることが示唆された。

cyanobacteria, biofilm, polyamine

講演番号：3C24p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎24会場

シアノバクテリア*Synechococcus elongatus* PCC7942の増殖機構

Proliferation mechanism of cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC7942.

○渡辺　智[1]、黒田　恵[1]、大林　龍胆[1]、兼崎　友[2]、千葉櫻　拓[1]、吉川　博文[1,2]
([1]東京農大・応生科・バイオ、[2]東京農大・ゲノム解析セ)
○Satoru Watanabe[1], Megumi Kuroda[1], Ryudo Ohbayashi[1], Yu Kanesaki[2], Taku Chibazakura[1], Hirofumi Yoshikawa[1,2] ([1]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]NGRC, Tokyo Univ. Agric.)

【目的】*Synechococcus elongatus* PCC7942 （以下*S.* 7942）を始めとする淡水性シアノバクテリアは、一細胞当たり複数コピーのゲノムを持つ（Binder, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995; Griese, *FEMS Microbiol. Lett.,* 2011）。このようなゲノム倍数性は高度好熱菌、放射線耐性菌の他、*Buchnera*属、*Azotobacter*属等さまざまな種で報告されている (Ohtani, *J.Bacteriol*, 2010; Hansen, *J. Bacteriol*, 1978; Komaki, *J. Mol. Evol*., 1999; Robson, *J. Gen. Microbiol*, 1984) が、ゲノムを複数コピーもつ生物における複製、増殖メカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究ではシアノバクテリア*S.* 7942を材料とし、各増殖ステージにおける遺伝子発現量、ゲノムコピー数について解析を行った。
【方法】明暗周期により同調培養した*S.* 7942を長期培養し、各増殖ステージにおける（1）遺伝子発現、（2）ゲノムコピー数、（3）複製活性について解析した。(1)遺伝子発現は、主要シグマ因子RpoD1、分裂因子FtsZ、分子シャペロンDnaK2、転写因子RpaBの発現量について各タンパク質に特異的な抗体を用いて解析した。（2）ゲノムコピー数は細胞に含まれるDNAをSytox-Greenで蛍光標識し、フローサイトメトリー（FACS）を用いて検出した。(3)新規合成されたDNAはチミジンのアナログであるBrdUで標識した。抗BrdU抗体を用いた免疫蛍光観察法によりBrdU蛍光をもつ細胞の割合を算出し、分裂の頻度と比較した。
【結果】（1）RpoD1、FtsZの発現は明条件移行後、対数増殖期前期にかけて一過的に増加し、その後、対数増殖期後期より減少した。その一方でDnaK2、RpaBは常に発現しており、発現量の変化はみられなかった。（2）*S.* 7942のゲノムコピー数は対数増殖期初期に一過的に増加するが、対数増殖期後期、定常期では減少した。(3) 各増殖ステージの複製と分裂の頻度を比較すると、対数増殖期初期ではゲノム複製の頻度が細胞分裂に比べて高く、対数増殖期後期、定常期では複製の頻度は分裂に比べ低いことも明らかとなった。大腸菌、枯草菌等のシングルコピーゲノムのバクテリアは複製と分裂が共役しているため、細胞あたり1コピーのゲノムが分配、保持される。一方、シアノバクテリアは複製-分裂間の共役が大腸菌、枯草菌ほど厳密ではなく、増殖ステージによって複製と分裂の頻度が変化することでゲノムコピー数の増減が起こると考えられた。

DNA replication, Division, Cyanobacteria

講演番号：3C24p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎24会場

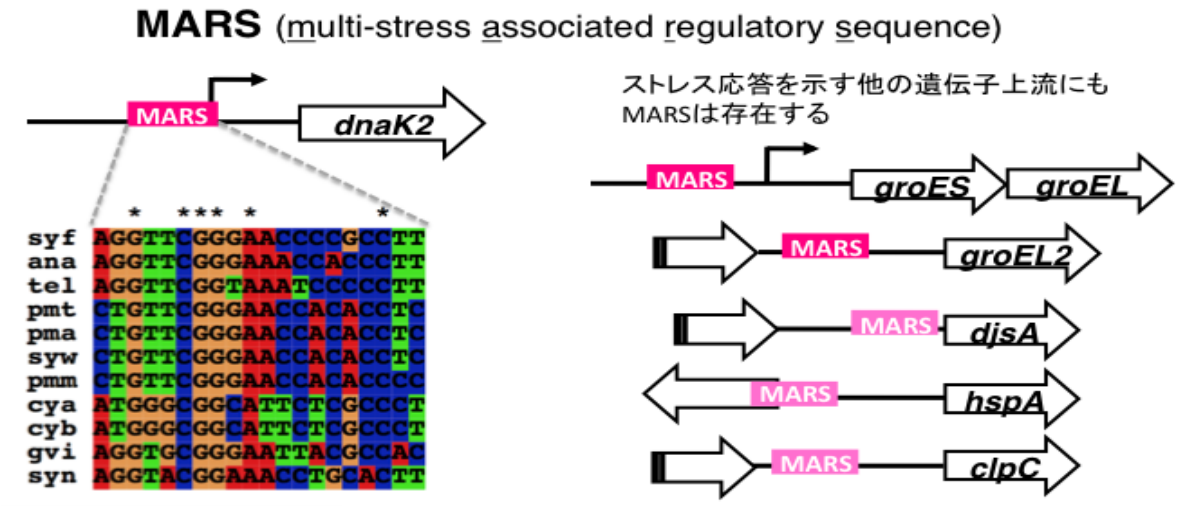
シアノバクテリアにおける分子シャペロン *dnaK2* のストレス応答機構の解明

Expression analysis of *dnaK2* gene in cyanobacteria *Shynechococcus elongates* PCC 7942

○小林一幾、佐藤真純、渡辺智、千葉櫻拓、吉川博文（東京農大・バイオ）
○Ikki Kobayashi, Masumi Sato, Satoru Watanabe, Taku Chibazakura, Hirofumi Yoshikawa (Dept of Biosci,, Tokyo Univ of Agric)

【目的】

分子シャペロンは、ストレスから細胞を保護する働きを持つ一群のタンパク質である。シアノバクテリア*Synechococcus elongatus* PCC 7942 株(以降 *S.* 7942)は、代表的な分子シャペロンであるHSP70ファミリーの*dnaK*遺伝子を3つ持つ。この内、*dnaK2*遺伝子は生育に必須であり、熱ショックストレスに応答することが知られている。多くのバクテリアにおいて*dnaK*遺伝子のストレス応答機構は良く研究されており、σ^{32}, CIRCE配列による制御が知られている。しかし、*S.* 7942の*dnaK2*遺伝子上流にはこれら既知のストレス応答に関与する配列は見出されず、全く新しいストレス応答機構の存在が示唆された。我々はゲノム情報を用いた比較解析から複数種のシアノバクテリア*dnaK2*遺伝子上流に保存された20bpの配列(MARS配列:multi-stress associated regulatory sequence)を見出し、*dnaK2*のストレス応答がMARSに依存することを突き止めた。本研究では*dnaK2*のストレス応答におけるMARS配列の機能解明を目的とし、より詳細な解析を行った。



【方法・結果】

*lacZ*を用いたレポーター解析により、MARS配列は*dnaK2*の発現に必須であることが示された。そこで、PCRによりMARS配列内にランダムに変異を導入し、温度感受性を示す変異株(TS11)を取得した。熱ストレス条件下における*dnaK2*の発現量を比較した結果、TS11では野生株に比べ*dnaK2*のストレス応答が低下した。さらにこの株から温度感受性を抑圧するサプレッサー変異株を複数取得し、表現型の解析を行った。これらの株は野生型株、温度感受性株と比べ顕著に細胞の肥大、伸長、形態異常などを示した。現在、サプレッサー変異のマッピングを行っている。

Shynechococcus elongates PCC 7942, dnaK, stress

講演番号：3C24p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎24会場

Staphylococcus aureus の産生する *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing 阻害物質の同定と阻害効果

Identification of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibitor produced by *Staphylococcus aureus*

○皆川周，新野啓介，山田裕美，老川綾，藤井健二[1]，鹿山鎭男[2]，加藤文紀[2]，奥田潤，北山隆[1]，菅井基行[2]，後藤直正（京都薬大・微生物・感染制御学，[1]近畿大院・農・バイオ，[2]広島大院・医歯薬・細菌）

○Shu Minagawa[1], Keisuke Shinno[1], Hiromi Yamada[1], Aya Oikawa[1], Kenji Fujii[2], Shizuo Kayama[3], Fuminori Kato[3], Jun Okuda[1], Takashi Kitayama[2], Motoyuki Sugai[3], Naomasa Gotoh[1] ([1]Dept. Microbiol. Infect. Cont. Sci., Kyoto Pharm. Univ., [2]Dept. Adv. Biosci. Grad. Sch. Agric., Kinki Univ., [3]Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. Sci., Hiroshima Univ.)

【目的】*Pseudomonas aeruginosa* と *Staphylococcus aureus* は、混合感染症や菌交代症などを引き起こすことから、宿主内での相互関係が示唆されている。*P. aeruginosa* の quorum-sensing（QS）制御下の LasA による溶菌や *Pseudomonas* quinolone signal（PQS）の類似体である 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide (HQNO)による抗菌作用が *S. aureus* の増殖抑制能に重要なことが知られている。一方、*S. aureus* は、*P. aeruginosa* の quorum sensing（QS）を介した増殖抑制作用に抵抗するために、QS 阻害物質を産生していることが示唆されたので、この QS 阻害物質を同定し、QS 抑制能の解析することを目的とした。

【方法】*P. aeruginosa-S aureus* 共培養系により *P. aeruginosa* による *S. aureus* 増殖抑制を調べた。*S. aureus* 培養上清を酢酸エチル抽出後、silica-GC により分画し、NMR により QS 阻害物質を同定した。*P. aeruginosa* の QS 制御下にある LasB エラスターゼやピオシアニン、*Pseudomonas* quinolone signal (PQS) を指標に QS 阻害効果を解析した。

【結果・考察】*P. aeruginosa-S aureus* 共培養系において *P. aeruginosa* が *S. aureus* の増殖を抑制した。しかしながら、*S. aureus* 優位の共培養系において、*S. aureus* は *P. aeruginosa* による増殖抑制に抵抗した。*S. aureus* 培養上清から 4 種類の cyclic-dipeptides（CDP）を同定した。これらの CDP は *P. aeruginosa* の QS 制御下にある LasB エラスターゼ活性が抑制された。さらに、ピオシアニンや PQS の産生が抑制された。以上の結果から、*S. aureus* 優位の *P. aeruginosa-S aureus* 共培養系において CDP を産生し *P. aeruginosa* の QS を阻害することで *P. aeruginosa* による増殖抑制作用を妨害していることが明らかとなった。

講演番号:3C24p17
講演日時、会場:3月24日17:15～ C校舎24会場

アンチセンスRNAによる*Rhodopseudomonas palustris*のQuorum sensing活性調節

An antisense RNA that affects *Rhodopseudomonas palustris* quorum sensing-signal receptor activity

○平川秀忠, Amy L. Schaefer, Caroline S. Harwood, E. P. Greenberg (Department of Microbiology, University of Washington)
○Hidetada Hirakawa, Amy L. Schaefer, Caroline S. Harwood, E. P. Greenberg (Department of Microbiology, University of Washington)

We have been studying the *Rhodopseudomonas palustris* RpaR-RpaI-*p*-coumaroyl homoserine lactone (*p*C-HSL) quorum sensing system. RpaR is a *p*C-HSL-responsive transcriptional activator and RpaI is a *p*C-HSL synthase. We recently used RNAseq to analyze the influence of quorum sensing on the transcriptome of *R. palustris*. One of the most strongly RpaR-activated RNAs was an *rpaR* antisense transcript (as*rpaR*). Here we show that as*rpaR* is approximately 300-450 bases in length. Transcription of the as*rpaR* depends on *p*C-HSL, RpaR and an RpaR-binding site that is also required for activation of *rpaI*, which lies adjacent to *rpaR* gene but is transcribed separately. The *asrpaR* start site mapped to 40 bp downstream of the RpaR-binding site. We used a plasmid to overexpress as*rpaR* and showed that overexpression reduced RpaR levels, *rpaI* expression and *p*C-HSL production. We also generated a chromosomal as*rpaR* mutant and although *rpaR* mRNA levels were not altered in this mutant it showed increased RpaR levels, and increased *p*C-HSL-dependent *rpaI* expression. There is an ORF coded in as*rpaR*, however proteomics data and mutational analyses indicate that as*rpaR* is not translated. The regulation of quorum sensing by as*rpaR* can be attributed to RNA-RNA interactions. We conclude that as*rpaR* inhibits *rpaR* translation, and this results in suppression of RpaR-dependent *rpaI* expression and *p*C-HSL production. We presume that as*rpaR* functions via base pairing with *rpaR* transcripts. Antisense regulation represents yet another layer of control that can be brought to bear on activity of the LuxR-family-type of quorum sensing transcription factors and represents an example of an antisense RNA where a clear function has been established.

Keyword; Acyl-homoserine lactone, AHL receptor, Antisense RNA

講演番号：3C24p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ C校舎24会場

タイトル: 結核菌でのプロチアゾン燐酸化の機能

Title: The Role of Proteasome Phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*

○Choong-Min Kang, Jaeil Han, Tripti Anandan, Heather Baun, Imjoo Jang, Min-Seon Kim, Seeta Nyayapathy, and Scott Fair.
Department of Biological Science, Wayne State University, Detroit, MI 48202, USA.

【目的】: Sensing and responding to environmental changes is an important aspect of mycobacterial physiology. For this, the *M. tuberculosis* genome contains a wide variety of signaling molecules including eleven eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases. We demonstrated that two of these kinases, PknA and PknB, are key components of a signal transduction pathway that regulates cell division. One substrate of PknA/B we identified is Wag31, whose phosphorylation plays an important role in regulating cell growth by controlling polar peptidoglycan biosynthesis. We recently identified two additional substrates of PknA and PknB: the α-subunit (PrcA) and the β-subunit (PrcB) of the proteasome, which is required for persistence of *M. tuberculosis* during the chronic phase of infection mice. While the proteasome appears to be important in persistence and latency related cellular processes, the molecular mechanisms by which the proteasome controls these processes remain largely unknown. We thus want to study how phosphorylation controls the function of proteasome in *M. tuberculosis*.

【方法】: To identify and confirm the phosphorylation sites in PrcA, we used 2-D SDS-PAGE, mass spectrometry, and mutational analysis. To study the effect of PknA on the assembly of proteasome, the formation of holo-proteasome from half-proteasome was tested in *M. smegmatis* or *E. coli* that co-expresses *pknA* and/or *prcBA*. Finally, the role of PknA on proteasome assembly and oxidative stress response, *M. smegmatis* cells expressing *pknA* and/or *prcBA* were treated with H_2O_2 and tested their survival by determining colony-forming units.

【結果】: We show that the α-subunit (PrcA) is phosphorylated by PknB at three Thr residues in a sequential manner both. Phosphorylation of PrcA appears to regulate substrate degradation *in vivo* in mycobacterial cell. In addition, the β-subunit (PrcB) is also phosphorylated by PknA, which affects the assembly of the proteasome complex. Finally, we found that the regulation of the proteasome assembly by PknA may contribute to mycobacterial resistance to oxidative stress, suggesting that proteasome phosphorylation plays an important role in persistence of *M. tuberculosis*.

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis*, proteasome, phosphorylation.

講演番号:3C24p19
講演日時、会場:3月24日17:37～ C校舎24会場

腸炎ビブリオのトキシン/アンチトキシンシステムの生化学的性質

Biochemical characterization of toxin-antitoxin system in *Vibrio parahaemolyticus*

○日野　まど香[1]、高木 久徳[2]、角田　佳充[2]、木村 誠[2]（[1]西九大・健、[2]九大院・農）
○Madoka Hino[1], Hisanori Takagi[2], Yoshimitsu Kakuta[2], Makoto Kimura[2] ([1]Faculty of Health and social welfare sci., Nishikyushu Univ., [2] Grad. Sch., Agr. Kyushu Univ.)

【目的】真生細菌や古細菌は環境ストレス条件下で、タンパク質の合成反応を抑制し自らの増殖を抑える調節因子・トキシン/アンチトキシンシステム（TAシステム）をもっている。本研究室では、食中毒菌である腸炎ビブリオ（*Vibrio parahaemolyticus*）が、低温、低栄養、低塩分環境下にさらされると、生きているが培養できない（Viable but nonculuturable;VBNC）状態に移行し、ストレス条件下でも生き延びることを報告している。最近、このVBNC状態への移行にTAシステムが関係していることが示唆されている。本研究では、腸炎ビブリオゲノム中にTAシステムを検索するとともに、それらの生化学的性質について検討した。
【方法】大腸菌TAシステムの6種の遺伝子（*dinJ-yafQ*、*yefM-yoeB*、*relB-relE*、*mazE-mazF*、*chpS-chpB*、*mqsA-mqsR*）を指標として、BLASTによりゲノム解析を行った。その解析によりTAシステムと推測された遺伝子について、発現ベクターpet22bまたはpGEX4T-3及び宿主大腸菌BL21(DE3)RILを用いて発現を試みた。発現できたタンパク質は、Glutathione Sepharoseカラムおよび陰イオン交換カラム、または、nikel-nitrilotriacetic acid agaroseカラムおよびゲルろ過カラムで精製した。得られたタンパク質のリボヌクレアーゼ活性測定は酵母RNAを基質として、タンパク質合成阻害活性測定は大腸菌の無細胞系を用いて行った。また、TAシステムの上流遺伝子への結合能は、ゲルシフトアッセイにより検討した。
【結果】これまで報告されているTAシステムと同じサイズで、2つの遺伝子がオペロンを形成しているものに絞ってゲノム解析をしたところ、2種のオペロン（*vp1829-1830*、*vp1842-1843*、）が*dinJ-yafQ*と相同性（identityは約20%）を示し、1種のオペロン（*vp1821-1820*）が*yefM-yoeB*と相同性（identityは約50%）を示した。そこで、これら3種のTAシステムを大腸菌を用いて組換え体を作製したところ、VP1829-1830を発現精製することができたが、VP1842-1843とVP1821-1820は発現することができなかった。

VP1829-1830複合体とVP1830タンパク質の性質について調べた結果、トキシンと推測されるVP1830は大腸菌トキシンRelEと同様にリボヌクレアーゼ活性はないが、タンパク質合成阻害活性があることが明らかとなった。また、ゲルシフトアッセイにより、他のTAシステムと同様にプロモーター上流100bpにVP1829-1830複合体が結合することもわかった。現在、VP1829-1830複合体の立体構造決定を目指して結晶化条件の検討を行っている。

toxin-antitoxin system, VBNC, *Vibrio parahaemolyticus*

講演番号：3C24p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ C校舎24会場

STM法で同定した土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616株の土壌環境下での生残に重要な遺伝子の解析

Analysis of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genes identified by using signature-tagged mutagenesis as important genes for survival in a soil

○石橋蓉子、千本木淳子、大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝（東北大院生命科）
○Yoko Ishibashi、Junko Senbongi、Yoshiyuki Ohtsubo、Yuji Nagata、Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

【背景・目的】細菌は複雑かつ複合的な物理・化学・生物学的要因に曝される自然環境下では、実験室環境下とは異なるふるまいをする。このことから、バイオレメディエーションなどの実際の環境中での細菌の応用利用の際に、実験室環境下で得られたデータから期待される効果が得られない、という問題が生じている。我々はこれまでの研究で、任意の環境中での生残に重要な遺伝子をゲノム全体から網羅的に探索するsignature-tagged mutagenesis（STM）法を土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616株に適用し、本株が土壌環境下での生残に重要な遺伝子を選抜した。本研究では、それら遺伝子の機能解析を行い、本株の土壌環境下でのふるまいの一端を分子レベルで解明することを目的とする。

【方法・結果】これまでに複数回の STM 法によるスクリーニングを実施し、ATCC 17616 株の土壌環境下での生残に重要な遺伝子として *fur*、*hrpA*、*deaD* を選抜した。これら遺伝子について再破壊株および相補株を作製し、各株の土壌における生残性を、菌体接種後一定期間培養した土壌から直接 DNA を抽出し、定量 PCR により目的株の存在を定量化する方法で確認した。その結果、*fur*、*hrpA*、*deaD* 全ての破壊株において生残性の低下が見られた。*fur* 遺伝子は相補株実験において生残性が回復したため、土壌環境下での生残に重要な遺伝子と結論した。*hrpA* と *deaD* 遺伝子に関しては、周辺遺伝子の関与の可能性も含めて、現在検討中である。一方、これら遺伝子の破壊株を用いて機能解析を行った。その結果、(i) *fur* 遺伝子破壊株は gentamicin、tetracyclin に対し高感受性を示すこと、(ii) *hrpA* 遺伝子破壊株は chloramphenicol に対し高感受性を示すこと、(iii) *deaD* 遺伝子破壊株は低温感受性を示すこと、が明らかになった。以上の結果に基づき、これら遺伝子の土壌環境における機能について考察する。

Keyword1: signature-tagged mutagenesis, Keyword2: *Burkholderia*, Keyword3: soil

講演番号：3C24p21
講演日時、会場：3月24日17:59～ C校舎24会場

超低栄養性細菌*Rhodococcus erythropolis* N9T-4が低栄養生育時に発現するシャペロンシステム

The chaperon system expressed under oligotrophic conditions by an extremely oligotrophic bacterium, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4

○毛戸 香織、吉田 信行、高木 博史（奈良先端大・バイオ）

○Kaori Kedo, Nobuyuki Yoshida, Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】当研究室で単離された*Rhodococcus erythropolis* N9T-4株は、有機炭素源を添加しない培地に良好に生育する超低栄養性細菌である。本菌は培養環境からCO_2を取り除くと生育を示さず、培地中に炭酸水素ナトリウム、あるいは*n*-テトラデカンを始めとする直鎖飽和アルカンを添加しておくとCO_2制限条件下でも生育する。従って、本菌はCO_2を生育に必要とすることは明らかであり、現在本菌の炭酸固定系について検討を進めている。これまでに、プロテオーム解析の結果から、本菌の低栄養生育時には、NAD依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素(ALDH)、メタノール脱水素酵素などのメタノール代謝関連酵素が強く発現していることが分かっており、これらの発現と低栄養生育との関連性などについて報告してきた。プロテオーム解析では上記酵素以外にDnaK、DnaJ、ClpBといったシャペロン関連タンパク質が特異的に発現していることも判明している。これらは大腸菌などで共同して働くシャペロンとして知られている。今回、これらシャペロンタンパク質の低栄養条件での役割を解明することを目的として、シャペロン遺伝子の構造、大腸菌内での発現を試みた。

【方法および結果】N9T-4株のドラフトゲノムを解析すると、*dnaK*、*grpE*、*dnaJ*、*clpB*遺伝子を含むオペロンが確認できた。これらは*Rhodococcus*属細菌の中ですでに全ゲノム配列が決定している*R. jostii* RHA1と高い相同性を示し、遺伝子の順序も一致した。低栄養最少培地とLB培地それぞれで培養した菌体を用い、マイクロアレイ解析を行なった結果、これらの遺伝子は低栄養条件で顕著に発現しており、プロテオーム解析の結果と一致した。

低栄養条件で顕著に発現するALDHを大腸菌で高発現させると、凝集体を形成し、可溶化は困難であった。また、N9T-4株でALDHを高発現させると凝集はしないが、酵素活性のあるタンパク質を得ることは出来なかった。そこで、上記シャペロンタンパク質がALDHのフォールディングなど正常な発現に関与している可能性を考え、ALDHとシャペロンタンパク質の共発現を試みた。

まず、すでに構築したALDH高発現プラスミドと複製起点を異にするプラスミドベクターpACYCDuet-1に*dnaK-clpB*オペロンを組み込み、大腸菌内でこれらタンパク質の共発現を試みたが、シャペロンタンパク質を大腸菌で発現させることが出来なかった。そこで、大腸菌のシャペロンタンパク質（DnaK、GlpE、DnaJ）発現プラスミドをALDH発現プラスミドと共に大腸菌に導入したところ、ALDH、シャペロンタンパク質共に発現を確認し、ALDHも一部可溶化した。これらの結果より、DnaKシャペロンシステムはN9T-4株のALDHのフォールディングに関与していることが示唆された。現在、コドン使用頻度を考慮に入れたN9T-4株のシャペロンシステムの構築を試みている。

Rhodococcus, chaperon, aldehyde dehydrogenase

講演番号:3C25a01
講演日時、会場:3月24日09:00～ C校舎25会場

環境中より分離した酵母からの *S. cerevisiae* の効率的二次スクリーニング法の開発

Development of secondary screening method for *S. cerevisiae* from environmental isolated Yeasts

○藤原秀彦、浅田貴美子、古川謙介、梶原康博[1]、高下秀春[1]（別府大学・食物栄養、[1]三和酒類（株））

○ Hidehiko Fujihara, Kimiko Asada, Kensuke Furukawa, Yasuhiro Kajihara[1], Hideharu Takashita[1] (Beppu Univ., [1]Sanwashurui)

【目的】環境中には様々な酵母が存在し、アルコール発酵能やコロニーの形状、顕微鏡観察等のスクリーニング法では、醸造・発酵産業に一般的に用いられる *S. cerevisiae* の判別は困難である。そこで本研究では、rDNA による同定の前ステップとして、醸造用 *S. cerevisiae* に特異的に存在するとされる 4 つの遺伝子に着目し、環境中より分離した酵母から効率的に *S. cerevisiae* を判別する二次スクリーニング法を開発することを目的とした。

【方法】環境中から網羅的に単離した酵母から清酒、焼酎、ワイン等の醸造酵母 *S. cerevisiae* のみを効率的に選択する手法として、同酵母に特異的に存在する遺伝子である *AWA1, BIO6, SSU1, FLO1* の 4 つの遺伝子を標的とし、ドットブロット法、PCR 法、MultiPlex PCR 法を用いた。判定に用いた菌株は NITE から購入した各標準株および、山梨大学で分離された *S. cerevisiae*、モンゴルから分離された未同定酵母、および本研究室所有の未同定酵母を用いた。ドットブロット解析では、代表的な清酒酵母である協会7号酵母 *S. cerevisiae* K7 株における 4 遺伝子それぞれのシグナル強度と各菌株のシグナル強度を比較し、判定した。また、PCR 法では 4 遺伝子の有無で判定し、Multiplex PCR 法では、4 遺伝子の有無と電気泳動パターンを比較することで判定した。

【結果】まず標準株を用い、二次スクリーニング系の確立を検討した。ドットブロット法を行った結果、シグナル強度 3.5 以上（K7 株のシグナル強度を 4 とする）で、*S. cerevisiae* を 89％の確率で検出できた。一方で、*S. cerevisiae* ではない株も 3 % 誤検出した。この結果から、ドットブロット法を用いた解析は、*S. cerevisiae* の効率的検出に有効であった。しかし本法は、検出までに至る操作等が煩雑であるため、PCR 法による判定を検討した。その結果、*S. cerevisiae* の検出率は 94 % で、誤検出率は 15 % であった。この結果から、PCR 法もドットブロット法と同様に *S. cerevisiae* の特異的検出に有効であった。そこで次に、より効率的な検出を行うために、MultiPlex PCR 法を用いて 4 遺伝子の増幅を試みた。その結果、今回試験した *S. cerevisiae* では 4 遺伝子の特異的な増幅が確認されたが、他の酵母では非特異的な増幅がみられたことから、電気泳動パターンにより *S. cerevisiae* を高い確率で検出できた。また本法では鋳型として DNA を用いた場合だけでなく、コロニー PCR をおこなった場合においても同様の結果が得られた。これらのことから、*AWA1, BIO6, SSU1, FLO1* の 4 遺伝子を標的としたコロニー PCR を MultiPlex PCR 法で行い電気泳動パターンを比較することで、効率良く醸造酵母 *S. cerevisiae* を検出できる系を確立することができた。

Keyword1, S. cerevisiae Keyword2, secondary screening Keyword3 MultiPlex PCR

講演番号:3C25a02
講演日時、会場:3月24日09:11～ C校舎25会場

タイトル　PCR-DGGEによるナチュラルチーズ細菌叢解析における培養依存的および非依存的手法の比較

Title Comparison of culture-dependent and -independent methods for microflora analysis in natural cheese evaluated by PCR-DGGE

○守重 美香、古座野 智弘、栃原 孝志、三浦豊史、山下昭芳、竹田 保之（酪農大・食科）

○Mika Morishige, Tomohiro Kozano, Takashi Tochihara, Toyofumi Miura, Akiyoshi Yamashita, Yasuyuki Takeda (Rakuno Gakuen University)

【目的】硬質系チーズの風味形成には乳酸菌をはじめとする種々の細菌が重要な役割を担っている。近年、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法をはじめとする分子生物学的手法により培養手法を用いることなくチーズ細菌叢の解析が可能となってきたが、非優勢菌種の解析には培養依存的な手法も必要と言われている。そこで今回、チーズ細菌叢の詳細な解析にはこれらの手法の特徴を十分把握することが重要と考え、チーズ試料から直接調製したDNAおよびRNA、ならびに種々の培養条件で得られたコロニー群から調製したDNAによるDGGE解析を行い、それぞれの構成菌種に関して検討を行った。

【方法】市販のエメンタール、ゴーダチーズおよび本学農場由来の生乳を用いて常法により製造したゴーダチーズを試料として用いた。2%クエン酸三ナトリウム溶液でチーズを懸濁し、各寒天培地(MRS、M17、RogosaおよびLBS)にて30℃または37℃で2日間培養した。菌数測定を行った後、各培地上のコロニーを懸濁液として回収した。このコロニー懸濁液からはDNAを、チーズ懸濁液からは遠心分離により菌体を回収し、DNA及びRNAを市販精製キット(QIAGEN)を用いて調製した。これらを鋳型としてU968GC/L1401、LACTO1GC/LACTO2、Lac1/Lac2GCの各プライマーペアを用い、PCR-DGGEおよびRT-PCR-DGGE解析を行った。

【結果】市販エメンタールの場合、いずれのプライマーペアを用いても培養非依存的手法によるPCR-DGGEパターンは、RT-PCR-DGGEパターンとは異なっていた。全てのプライマーペアにおいて、RT-PCR-DGGEパターンで特異的なバンドが認められた。PCR-DGGEに特異的なバンドはLACTO1GC/LACTO2プライマーペアにおいてのみ確認できた。30℃で培養したコロニー懸濁液を用いたPCR-DGGEパターンは、同一プライマーペア内で殆ど差は見られなかった。37℃で培養したものではMRS培地から得られたコロニー懸濁液において他のプレートのものとは異なるバンドが検出された。このバンドは30℃培養のMRSプレート上にも見られないものであった。また、コロニー懸濁液のPCR-DGGEパターンは、いずれのプライマーペアにおいても培養非依存的なPCR-DGGE及びRT-PCR-DGGEパターンと異なっていた。以上の結果より、チーズ中の細菌叢解析において、培養依存的なPCR-DGGEとRT-PCR-DGGEでは優勢菌種パターンが異なることが確認された。また、通常乳酸菌の分離に用いられている寒天プレートに出現する優勢菌種は、培養非依存的なDGGE上のそれとは行っており、チーズ中の相対的少数菌種の把握にはこれらのプレートを使用する意味があるものと考えられた。現在、他のチーズについても同様の解析を進めている。

Keyword1 natural cheese, Keyword2 PCR-DGGE, Keyword3 microflora

講演番号：3C25a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎25会場

PCR-DGGE を用いたかつお節かびの同定とその変遷解析

Identification and transitional analysis of *Katsuobushi* molds using PCR-DGGE

○小山　大、竹中　慎治[1]、土居　幹治（マルトモ㈱、[1]神戸大院・農）
○Dai Koyama, Shinji Takenaka[1] ,Mikiharu Doi, (Marutomo Co. Ltd., [1]Kobedai)

【目的】
かつお節の枯節（以下、枯節）は日本の伝統的な発酵食品であり、その製造にはかび付けと呼ばれる工程が存在する。かび付けは発酵段階と乾燥段階からなり、それらを数回繰り返したかつお節のみが枯節と呼ばれる。かび付けがもたらす効果としては匂いの変化などがあり、*Aspergillus* 属や *Eurotium* 属を中心としたかびの関与が報告されている。しかしこれらは培養工程を経て同定された菌種であり、これまでに枯節から直接かつお節かびを同定した報告はない。そのため実際のかび付け工程において、どのような種類のかびが関与しているのか詳細は不明である。
本報告ではかつお節かびを分子学的手法により培養を経ずに同定し、さらにかび付け工程におけるかつお節かび種の変遷を検出しようと試みている。枯節からかつお節かびが直接的に同定できれば、効率のよいかび付け条件の探索や枯節の品質向上に大きく貢献できる。

【方法】
同一の加工場で製造されたかび付け回数の異なる枯節よりかびを回収し、ゲノム DNA を抽出した。それらのゲノム DNA を鋳型とし、既報の PCR プライマーを用いてかび rRNA 遺伝子や ITS 領域を増幅した。PCR 増幅物を PCR-DGGE に供し、泳動後ゲルのバンドパターンを比較した。また検出されたバンドについてシーケンス解析を行い、BLAST 検索（http://www.ncbi.nlm.nih.gov）によって菌種を同定した。

【結果】
PCR-DGGE 解析の結果より、培養工程を経ない枯節からの直接的なかび種の検出に成功した。PCR-DGGE 泳動パターンの比較より、かび付け回数を重ねるごとにかつお節かび種が変遷している可能性が示唆された。PCR-DGGE バンドのシーケンス結果より子嚢菌類を 2 種類同定した。1 種類は既知のかつお節かびと高い相同性（≧99 %）を示し、もう 1 種類は既存のデータと低い相同性（≒92 %）しか示さなかったため新規な菌株である可能性が考えられた。また PCR-DGGE バンドのシーケンス結果からかび付けに関与している可能性のある不完全菌類を 1 株検出した。

Katsuobushi, PCR-DGGE

講演番号：3C25a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎25会場

ブナの森から分離した野生酵母と食品製造への利用

A wild yeast isolated from woods consist of beech tree and application of the yeast to food manufacture.

○蟻川幸彦、米持昭太郎[1]、水谷智洋、中澤久美子（長野県工技セ、[1]米持製菓）

○Yukihiko Arikawa, Syotaro Yonemoti[1] , Tomohiro Mizutani, Kumiko Nakazawa (Nagano pref. industrial tech. center, [1]Yonemoti seika. co)

【目的】酵母はアルコール飲料、パン、菓子等、食品製造において重要な微生物であるため、目的に応じて様々な育種がなされている。しかし育種のみで多様性を拡げることには限界があり、自然界から新たな特性を持つ株を分離する試みも多数なされている。そこで長野県内でも寒冷な地、飯山市にあり、ブナの森として知られる鍋倉山より実用性の高い酵母の分離を試みた。

【方法】鍋倉山のブナ樹皮、切り株、土壌、池等より100サンプルを採取し、クロランフェニコールを含むYPD培地に接種した。ガス発生が認められたサンプルから菌株を分離し、繰り返し発酵試験を行なうことで、香りや発酵性の優れた株を分離した。

【結果】分離した酵母の中の一株であるNo.18は中温領域（25度）で高い発酵性を示した。そこでそのrRNAのD2およびITS領域について解析を行ったところ、*Saccharomyces paradoxus*と一致した。*Saccharomyces paradoxus*は*Saccharomyces cerevisiae*と極めて近縁な種として知られており、北米の森のオークの切り株等から分離されている。国内でも北海道での分離が報告されている。病原性の報告はない。*Saccharomyces cerevisiae*と比べると、実用的にはほとんど用いられておらず、その結果として人による分散が限定されるため、野生酵母のモデルとして集団遺伝学の対象になっている。なお他に異なる3つのサンプルからエステル香を強く発生する酵母を分離したが、いずれも遺伝子解析において*Candida solani*と推定された。鍋倉山に広く生息する酵母と思われたが、発酵性が低く実用的ではなかった。

*Saccharomyces paradoxus*と推定される酵母を用いて、中温域で発酵を行うカリントウの製造を行ったところ、発酵性に問題はなく、品質的に優れた製品を得ることができた。なお他の食品飲料への適用も図っているので併せて報告する。

yeast, *Saccharomyces paradoxus*, food

講演番号：3C25a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ C校舎25会場

雪室保存の野沢菜漬けから分離した低温増殖性乳酸菌の特性

Isolation and identification of lactic acid bacteria from Nozawana (*Brassica rapa* var. *hakabura*) pickled in the snow cavern.

○西脇 俊和、下條 明、安藤 聡[1]（新潟農総研・食品研、[1]食総研）
○Toshikazu Nishiwaki, Sayaka Shimojo, Akira Ando[1] (Niigata Food Res. Center, [1]NFRI)

【目的】

二酸化炭素排出の低減、環境負荷軽減の気運の高まりから多雪地域では雪室への農産物・加工食品の保存が積極的に行われている。我々も雪室保存の有用性の検証を行っており、その中で新潟県魚沼地域の特産品である野沢菜漬けの雪室保存（0～7℃）を試みたところ、乳酸菌が優勢に増殖し、品質低下を及ぼす雑菌の増殖抑制が確認された。そこで、低温下で速やかに増殖し優れた食味や雑菌の繁殖抑制に寄与する乳酸菌の分離とその特性を検討した。

【方法】

雪室に4週間保存した野沢菜漬けから乳酸菌を80株分離し、ゲノムDNA多型性を利用したランダム増幅多型DNA(RAPD)分析により乳酸菌株のグルーピングを行った。各グループから菌株を選抜し、16S rDNAの塩基配列を解析し相同性検索により同定を行った。また、生育温度、糖類の資化性、培地中の食塩およびエタノールによる生育の影響を検討することにより特徴付けを行った。次にこれら分離株を糠床（米糠400g、5%(w/v)食塩水600ml）に接種し、4℃で保存した。これを経時的にサンプリングして微生物叢の解析を行った。

【結果】

RAPD分析の結果、分離した80株の乳酸菌は7グループに分類された。しかし、各グループより1株ずつ選抜し16S rDNAの部分塩基配列を解析して相同性検索を行ったところ、全て*Lactobacillus sakei*と推定された。このうち、多くの菌株（80株中63株）が属する3グループから数株ずつ選抜し糖類資化性について検討したところ、全てがマルトースを資化しない特徴を有したが、アミグダリン、メリビオース、β-ゲンチオビオースの資化性は各グループ間で異なった。

次にこの選抜株を糠床に接種し4℃で保存したところ、いずれも選抜株が優先的に増殖しカビ類や*Bacillus*属等の細菌類の増殖を抑制した。このことから、選抜株は低温下で速やかに増殖し雑菌の繁殖を抑制できるスターターとしての利用が期待される。

本研究の一部は、「独立行政法人科学技術振興機構 研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP) FSステージ 探索タイプ」による助成を受けて行ったものである。

lactic acid bacteria, low temperature, fermentability

講演番号：3C25a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ C校舎25会場

Fructobacillus 属細菌の糖代謝解析

Sugar Metabolism in the Genus *Fructobacillus*

○及川　容、田中　尚人[1]、佐藤　英一、岡田　早苗
（東農大応生科・化学、[1]東農大・菌株）
○Yo Oikawa, Naoto Tanaka[1], Eiichi Satoh, Sanae Okada
(Dept. Appl. Biol. Chem, Tokyo Univ. Agr., [1]NRIC, Tokyo Univ. Agr.)

【目的】近年、グルコースよりフルクトースを生育基質として好む好フルクトース乳酸菌の存在が遠藤らによって報告されている[1)]。その乳酸菌の１つである*Fructobacillus* 属細菌は他の好フルクトース乳酸菌とは大きく異なる性質を有することが知られている。それは、グルコースを基質とした際にフルクトースやピルビン酸、酸素等の生育基質以外の因子を必須とするという性質や、本属細菌はヘテロ発酵型の乳酸菌として分類されているが、培養条件に依らずエタノールの産生がないという性質である[2)]。乳酸菌においてエタノールの産生は酸化還元バランスの維持（NADHの再生）のために重要な役割を果たしており、前述の報告と併せ考えると、本属細菌は他の乳酸菌とは異なる糖代謝経路や酸化還元のバランス維持機構を有していることが推定された。そこで、本研究では本属細菌の糖代謝の特性について明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 *Fructobacillus* 属の 5 種の各基準株を供試菌株とした。また近縁種の *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NRIC 1541^{T}を比較対象株として用いた。グルコースを基質とした培地（GYP培地）に過去に報告された生育因子（フルクトース、ピルビン酸、酸素）を加え、各供試菌株の代謝産物をHPLCにより測定した。その結果、*Fructobacillus* 属においてピルビン酸添加GYPでは乳酸：酢酸＝3:1、フルクトース添加GYPでは乳酸：酢酸：マンニトール＝1:1:2、GYP好気条件では乳酸：酢酸＝1:1となった。このことは、GYP嫌気条件下で本属細菌はNADHからNAD^+への再生が不十分なために生育しないと考えられているが、各因子の添加により余剰となったNADHを酸化しているためこのような結果が得られたと予想された。したがって、菌体内の糖代謝は菌体外の因子の還元反応と関連性があると推察された。そこで、菌体外の因子の還元反応に関与すると考えられる酵素の活性測定を行った。その結果、この還元反応にはNADH の酸化反応が伴うことが明らかとなった。以上のことより、糖代謝の過程で行われる酸化還元反応と併せて菌体外の因子を用いた酸化還元反応も行われ、これにより菌体内の酸化還元バランスの保持が行われていることが示唆された。また、本属細菌の特徴である菌体外の因子に依存的な生育はこのような機構によるものであると考えられた。

[1)] A. Endo et al, *Syst. Appl. Microbiol.*, **32**, 593-600 (2009)
[2)] A. Endo, *Jpn. J. Lactic Acid Bact.*, **22**, 87-92 (2011)

Fructobacillus, sugar metabolism, NADH

講演番号：3C25a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎25会場

好フルクトース乳酸菌 *Fructobacillus* 属の分離

Isolation of fructophilic lactic acid bacteria

○田中　尚人、及川　容[1]、佐藤　英一[1]、岡田　早苗[1]
(東農大・菌株, [1)]東農大応生科・化学)
○Naoto Tanaka, [1)]Yo Oikawa, [1)]Eiichi Satoh, [1)]Sanae Okada
(NRIC, Tokyo Univ. Agr., [1)] Dept. Appl. Biol. Chem, Tokyo Univ. Agr.)

【目的】乳酸菌の生息環境中における役割は長年に渡り盛んに研究がされてきた。ヨーグルトやぬか漬け等の発酵食品の風味形成、腐敗防止などがその一例であるが、これは分離された菌株を検証することで明らかとされてきた。乳酸菌の分離を行う際はグルコースを基質とした培地を基本とし嫌気条件下で培養を行うことがセオリーとされているが、この方法では分離が困難な乳酸菌も数多くある。その中で上述の培養条件では生育が微弱であるが、フルクトースを添加することで生育が著しく向上するという特徴を有する乳酸菌の存在が近年報告されている。これらは好フルクトース乳酸菌として提唱され、その代表として花や果実に生息する *Fructobacillus* 属が知られている[1)]。また一部のヘテロ発酵型 *Lactobacillus* 属の中にも同じ性質を示す種がある。好フルクトース乳酸菌の生態に関してはまだ不明な点も多く、分離報告も少ない。そこで、本研究では *Fructobacillus* 属を始めとする好フルクトース乳酸菌を分離することを目的とした。
【方法・結果】2010年春から2011年冬にかけて関東地方を中心とした地域から、花や果実等のサンプル計739点を採取し実験に供した。過去に報告された方法[1)]を参考に、採取したサンプルから好フルクトース乳酸菌の分離を試みた。フルクトースを基質とする FYP 集積培地で培養した後、培養液を FYP 固体培地に画線塗沫しクリアゾーンを形成したコロニーを選抜株とした。各選抜株をグルコースを基質とした GYP 液体培地およびフルクトースを基質とした FYP 液体培地に植え継ぎ、嫌気条件下で培養した。そして、GYP 液体培地での生育が FYP 液体培地に比べ弱い 18 株を好フルクトース乳酸菌として選抜した。さらに、これらを16SrRNA遺伝子系統解析により簡易同定したところ、9 株は *Fructobacillus* 属（*F. fructosus* 4株、*F. pseudoficulneus* 2株、*F. ficulneus* 2株、*F. tropaeoli* 1株)、7 株は好フルクトース乳酸菌として報告のある *L. kunkeei*[2)] と高い相同性を示した。他は *L. brevis*, *L. sanfranciscensis* であり、いずれもヘテロ発酵型乳酸菌であった。

[1)]A.Endo et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**, 2195-2205 (2008)
[2)]Edwards. C.G. et al, *J. Appl. Microbiol.*, **84**, 698-702 (1998)

fructophilic, Fructobacillus

講演番号：3C25a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ C校舎25会場

MALDI-TOF MSを用いた*S10*-GERMS法による乳酸菌の分類

Classification of lactic acid bacteria by *S10*-GERMS method using MALDI-TOF MS

○堀田 雄大、山本 奈緒美、佐藤 浩昭[1]、細田 晃文、田村 廣人（名城大・農、[1]産総研・環境管理）

○Yudai Hotta, Naomi Yamamoto, Hiroaki Sato[1], Akifumi Hosoda, Hiroto Tamura (Meijo University, [1]AIST)

【目的】

細菌の同定法は、16S rRNA遺伝子配列解析による同定法が主流である。しかし、16S rRNA遺伝子配列法は、細菌同定に数日を要する。一方、近年開発された質量分析法による細菌同定は、迅速であるが、分析している物質（検出ピーク）の理論的根拠に乏しい。そこで、 我々は、リボソームタンパク質をコードする特定のオペロン（*S10–spc–alpha*オペロン）に着目し、プロテームとバイオインフォマティクスとの融合により、理論的根拠に基づき細菌を迅速同定する手法「*S10*–GERMS法」を確立した。そこで、本研究は、乳酸菌群の細菌のリボソームタンパク質データベースを構築し、理論的根拠に基づく*S10*–GERMS法により、乳酸菌群の細菌を亜種および株レベルで迅速同定することを目的とした。

【方法】

リボソームタンパク質データベースの構築

*Lactobacillus*および*Lactococcus*属細菌の*S10–spc–alpha*オペロンの塩基配列は、ゲノム解読株の塩基配列に基づき設計したプライマーを使用して決定した。リボソームタンパク質サブユニットORFは、決定した塩基配列からゲノム解読情報に基づいて決定し、その後、アミノ酸配列に置き換えた。それらのアミノ酸配列の理論分子量は、N-末端メチオニンロスを翻訳後修飾として考慮して算出し、リボソームタンパク質の理論分子量データベースを構築した。

***S10*–GERMS法による微生物同定**

*Lactobacillus*および*Lactococcus*属細菌は、リボソームタンパク質を精製することなく、MALDI-TOF MSに供され、そのマススペクトルは、構築したデータベースと比較されることで、菌種を同定した。MALDI-TOF MS測定には、マトリックス剤としてシナピン酸を使用した。MALDI-TOF MS測定は、ポジティブイオンのリニアーモードで、*m/z* 4,000 - 15,000の範囲を観測した。

【結果】

*Lactobacillus*および*Lactococcus*属細菌をMALDI-TOF MS測定した結果、*S10–spc–alpha*オペロンにコードされている13種のリボソームタンパク質を、有用なバイオマーカーとして決定した。次に、*Lactobacillus paracasei*および*Lactococcus lactis*の亜種の識別を検討した結果、*Lactobacillus paracasei*は、L23, L24およびS13、一方、*Lactococcus lactis*には、L18サブユニットが有効なバイオマーカーでありこれらを用いてそれぞれの亜種の迅速識別が可能となった。

MALDI-TOF MS, Lactic acid bacteria, Bacterial identification

講演番号：3C25a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎25会場

能登のなれずしの微生物フローラ～ピロシークエンス法による優勢菌種の解明～

Pyrosequencing survey of the microbial diversity of fermented food “Narezushi”

○小柳 喬、清原 正志[1]、松井 裕[1]、山本 恵子[1]、バルラ フローリン、武 春美[2]、勝山 陽子[2]、辻 篤史[2]、宮前 博人[3]、近藤 哲史[4]、中村 静夫[2]、榎本 俊樹、片山 高嶺[1]、熊谷 英彦[1]
石川県大・生資環・食品、[1]石川県大・資源研、[2]石川県・工試、[3]柳田食産（株）、[4]ISICO

○Takashi Koyanagi, Masashi Kiyohara[1], Hiroshi Matsui[1], Keiko Yamamoto[1], Florin Barla, Harumi Take[2], Yoko Katsuyama[2], Atsushi Tsuji[2], Hiroto Miyamae[3], Tetsufumi Kondo[4], Shizuo Nakamura[2], Toshiki Enomoto, Takane Katayama[1], Kumagai Hidehiko[1]
Dept. Food Sci., Ishikawa Pref. Univ., [1]Inst. Biores. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., [2]Indus. Res. Inst. Ishikawa, [3]Yanagida Syokusan Co., Ltd., [4]ISICO

【目的】我が国には、魚と米飯を原料に仕込まれ乳酸菌類の発酵により熟成が行われる「なれずし」が各地に存在し、近代日本の鮨の原形であると考えられている。石川県能登地方においては、主にアジを用いたなれずしの製造がおこなわれており、乳酸菌の単離などに関して報告がある。本研究ではなれずしの発酵菌叢を詳細に解明するため、大規模な解析母数が得られるピロシークエンス法により、なれずし中に含まれる 16S リボソーム RNA 遺伝子（16S rDNA）の塩基配列の解析を行った。
【方法】アジなれずし発酵中に滲出する上清液を経時的に採取し(仕込後7～41日、4点)、DNA抽出を行い16S rDNA配列中のV1・V2可変領域(約350bp)をPCRにより増幅した。増幅断片をGenome Sequencer FLX Systemを用いたピロシークエンス解析に供し、得られたリード(約8万)についてRDP classifierおよびBLASTによる系統学的解析を行った。また、なれずし中に含まれる16S rDNA量を定量PCR法にて測定し、そのコピー数から総細菌数の変遷を追跡したほか、実際に単離した菌株の16S rDNA配列とピロシークエンス解析にて得られたリードとの配列比較も行った。
【結果】ピロシークエンス解析により得られたリードを分類したところ、53属の細菌の存在が確認された。うち菌叢中において2％を超える比率を示したものは5種（*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Clostridium*）であり、その中でも*Lactobacillus*属細菌が最も優勢であった。本属は発酵期間全体にわたり菌叢の75～90％を占め続け、菌数も仕込み期間を通じて約11倍に増加することが明らかになった。BLAST解析により*Lactobacillus*属のリードを種レベルで分類したところ、95％以上が*L. plantarum*および*L. brevis*に占められ、その16S rDNA塩基配列は単離培養法により分離された株と100％一致していた。完成したなれずしからは乳酸(28mg/g)および酢酸(8.3mg/g)が多く検出され、これらの菌種により生産されたものと考えられた。アジなれずしの優勢菌種としては*L. acidipiscis*および*L. versmoldensis*も報告されており、本研究結果と異なるが、なれずしはスターターを添加せずに製造されることから主発酵菌種が製品レベルで異なる可能性が示唆された。

pyrosequencing, fermented food, microbiota

講演番号：3C25a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ C校舎25会場

突起を持った南極由来の新属新種細菌 *Rhodoligotrophos appendicifer*

Rhodoligotrophos appendicifer gen. nov., sp. nov., a bacterium with projections isolated from a lake in Skarvsnes, Antarctica.

○福田青郎、山田耕造、三吉祐輝[1]、奥野寛和、跡見晴幸[1]、今中忠行（立命館大・生命科学、[1]京大院・工）

○Wakao Fukuda, Kozo Yamada, Yuki Miyoshi[1], Hirokazu Okuno, Haruyuki Atomi[2], and Tadayuki Imanaka (Ritsumeikan Univ., [1]Kyoto Univ.)

A Gram-stain-negative, non-spore-forming, non-motile, irregularly circular, aerobic or microaerobic bacterium (strain 120-1^T) was isolated from Naga-ike, one of the freshwater lakes in the Skarvsnes ice-free area at Antarctica. Strain 120-1^T grew between 5 and 35°C, with an optimum of 30°C. The pH range of growth was between 6.0 and 9.0 with an optimum of approximately 7.0. The range of NaCl concentration allowing growth of strain 120-1^T was between 0 and 5.0%, with an optimum of 0.5-1.0%. Strain 120-1^T was able to utilize organic compounds such as glucose, arabinose, gluconate, adipate and malate. Red colonies were formed on the plate medium, and the carotenoids were present in the cells. Ubiquinone 9 and ubiquinone 10 were the major respiratory quinones. The major cellular fatty acids consisted of C16:0, C18:1 ω9c and C18:1 ω7c. The G+C content of genomic DNA was 61.1 mol%. Comparative analyses of 16S rRNA gene sequences and physiological characteristics of strain 120-1^T indicate that strain 120-1^T is a phylogenetically novel bacterium, and that strain 120-1^T should represent a novel genus in the order *Rhizobiales,* family *Rhodobiaceae.* Here, a new genus and species with the name *Rhodoligotrophos appendicifer* gen. nov., sp. nov., is proposed.

Antarctica, *Alphaproteobacteria*, Taxonomy

講演番号:3C25a11
講演日時、会場:3月24日11:10～ C校舎25会場

Induction of non-dividing cell in *Tomitella biformata* AHU 1821^T and its characterization

○Puspita Indun Dewi[1], 上原 萌[1], 片山 泰樹[2], 田中 みち子[1], 北川 航[12], 浅野 行蔵[1], 鎌形 洋一[12] ([1]北大院農・応生科、[2]産総研)

○Dewi Puspita Indun[1], Moe Uehara[1], Taiki Katayama[2], Michiko Tanaka[1], Wataru Kitagawa[12], Kozo Asano[1], Yoichi Kamagata[12] ([1]Grad. Sch. Agric. Hokkaido Univ., [2]AIST)

【Objective】It is well documented that only a small fraction of bacterial cells from the environment can be cultured using standard laboratory cultivation methods. One possible contributing factor is that these cells are in a non-dividing state that requires some growth factors for their resuscitation. We hypothesized that the non-dividing state is a common survival strategy used by non-spore forming bacteria in the environment, especially Actinomycetes. In this study we used *Tomitella biformata* AHU 1821^T, a novel Actinomycetes isolated from a permafrost ice wedge, to determine conditions that induce it into a non-dividing state.

【Method】Non-dividing state induction conditions tested were prolonged incubation under oxygen limited conditions, defined medium, and subzero temperature. Viability on non-dividing cells was confirmed using the Live/Dead Baclight kit that tests membrane integrity and the ability of cells to form colonies on agar media (CFU counts). Further, differences in cell morphology of dividing and non-dividing cells were determined using transmission electron microscopy.

【Result】After 30 days of oxygen limited incubation, membrane integrity indicated that more than 90% of the population were viable but these cells did not grow on solid medium. We defined these cells as being in a non-dividing state. After 60 days incubation, the other stress conditions did not induce cells into a non-dividing state. TEM image analysis showed that the cytoplasmic and cell wall morphology of non-dividing cells and dividing cells differed. These results suggested that at least one survival strategy used by environmental Actinomycete isolate under stress condition is to enter a non-dividing state.

Non-dividing cell, resuscitation, icewedge isolate

講演番号:3C25a12
講演日時、会場:3月24日11:21～ C校舎25会場

高温好気型堆肥における高度好熱菌*Calditerricola satsumensis*に関する研究

Study on extremely thermophilic bacterium *Calditerricola satsumensis* in high-temperature compost

○吉井 貴宏、森屋 利幸、大島 泰郎（共和化工・環微研）
○Takahiro Yoshii, Toshiyuki Moriya, Tairo Oshima (Kyowa Kako Co., Ltd)

【目的】鹿児島県の株式会社山有が開発した高温好気型堆肥発酵は従来の堆肥発酵よりも内部温度が高く、しばしば100℃に達する。このため、堆肥化に関与する微生物や生体高分子の加水分解酵素の多くは従来の堆肥から見出されるものよりも優れた性質（例えば耐熱性）を持つ。既に、我々はこの堆肥から新規の高度好熱菌*Calditerricola satsumensis*および*C. yamamurae*を分離しており(Moriya, 2011)、特に*C. satsumensis*の至適生育温度は約80℃と、近縁の*Geobacillus*属よりもはるかに高い。本研究では、堆肥発酵における*Calditerricola*属細菌の役割を明らかにするために、様々な堆肥化過程における本菌の存在について調べた。
【方法】堆肥化過程のどの時期に*Calditerricola*属が出現するのかを調べるため、堆肥化開始から終了までの試料から微生物ゲノムDNAを抽出し、16S rDNAおよびrRNA PCR-DGGEによる真正細菌の群集構造解析を行なった。また16S rDNA定量PCR法により、真正細菌に対する*Calditerricola*属の相対量の経時変化を調べた。次に*Calditerricola*属が資化できる有機物を推定するため、難分解性のタンパク質、脂質および多糖類をそれぞれ堆肥に添加して高温発酵させ、炭酸ガス発生量および微生物群集構造を調べた。
【結果】PCR-DGGEの結果、堆肥化の初期において*Calditerricola*属のバンドが強く検出された。シークエンス解析では*C. satsumensis*であった。しかし、堆肥化の中期以降は他の好熱菌が強く検出され、*Calditerricola*属は見られなくなった。定量PCRの結果、真正細菌に対する*Calditerricola*属の割合は発酵5日目において最も高く、20%以上を占めた。その後、緩やかに減少し、20日目以降は検出されなくなった。ゼラチン、ケラチン、デンプンおよびステアリン酸をそれぞれ堆肥に加えて78℃で培養したところ、発酵されて多量の炭酸ガスが生じた。この時の微生物群集構造を調べたところ、*C. satsumensis*が強く検出された。
　これらの結果から、*Calditerricola*属はタンパク質やデンプンなどの有機物を利用して、高温好気型堆肥の堆肥化初期にかけて優勢になると推測された。特に*C. satsumensis*は堆肥化過程初期の高温環境を作り出す上で重要な菌であると考えられる。

Moriya T., Hikota T., Yumoto I., Ito T., Terui Y., Yamagishi A., and T. Osima. 2011. *Calditerricola satsumensis* gen. nov., sp. nov. and *Calditerricola yamamurae* sp. nov., extreme thermophiles isolated from a high-temperature compost. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:631-636

compost, DGGE, Calditerricola satsumensis

講演番号:3C25a13
講演日時、会場:3月24日11:32～ C校舎25会場

氷楔単離株由来の覚醒因子は同環境下細菌のコロニー形成を促す

Resuscitation promoting factor from ice wedge isolate promotes the colony formation of bacteria in the same environment

○上原 萌[1]、Indun Dewi Puspita[1]、片山 泰樹[2]、田中 みち子[1]、北川 航[1,2]、浅野 行蔵[1]、鎌形 洋一[1,2]（[1]北大院農・応生科、[2]産総研）

○Moe Uehara[1], Indun Dewi Puspita[1], Taiki Katayama[2], Michiko Tanaka[1], Wataru Kitagawa[1,2], Kouzou Asano[1], Youichi Kamagata[1,2] ([1]Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ, [2]AIST)

【目的】*Micrococcus luteus* で最初に見つかった Resuscitation promoting factor (Rpf) は増殖中の細胞により産生され、休眠状態の細胞分裂を再び開始させるタンパク質であり、グラム陽性菌のゲノム上には同遺伝子の存在が知られている。休眠状態とは、無芽胞菌が貧栄養、低水分活性、長期氷点下および低酸素条件などのストレスを受けて、生きてはいるが分裂できない状態に陥ることとして研究を進めている。これまでの結果から永久凍土氷楔単離株のもつ *rpf* 遺伝子由来の組換え Rpf が単離株自身の増殖を促進することが明らかとなった。この単離株を休眠誘導し、Rpf を使ってこれを覚醒することおよび、休眠細胞が多いと予想される氷楔環境中の細菌のコロニー形成能に Rpf がどのような変化をもたらすのかを突き止めることを本研究の目的とした。

【方法】アラスカ氷楔単離株*Tomitella biformata* AHU1821^T(以下、*T. biformata*)を酸素制限下で培養し休眠状態に誘導した。得られた休眠細胞に*T. biformata*由来の*rpf*遺伝子を大腸菌を用いて発現させ精製した組換えRpfを培養開始時に添加し、生育の変化を調べた。また同様に、アラスカ永久凍土から採集した氷楔を表面殺菌したのち溶解し、これを段階希釈して平板培養をする際に組換えRpfを加えてコロニー形成数の変化を調べ、さらにコロニーの同定を行った。

【結果】培養開始時に添加した組換え Rpf は休眠状態にある *T. biformata* の生育を Rpf の濃度依存的に促進し、*T. biformata* の *rpf* 遺伝子産物が覚醒促進因子であることが明らかとなった。また、同様に溶解した氷楔に組換え Rpf を添加して平板培養を行った際に、*T. biformata* 以外の無芽胞放線菌のコロニー形成数を増加させた。これらの結果から、覚醒促進因子は自己だけでなく同環境下細菌のコロニー形成にも影響を与えることが予想された。

resuscitation promoting factor, ice wedge isolates

講演番号：3C25a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ C校舎25会場

深海サンプルからの放線菌の選択的分離法の確立

An examination of selective isolation method for deep-sea actinomycetes.

○堀内 俊輔、能木 裕一[1]（横浜市立大学院・生命ナノシステム科学研究科、[1]海洋研究開発機構）
○Shunsuke Horiuchi, Yuichi Nogi[1]（Yokohama City University, [1]JAMSTEC）

【背景・目的】深海の環境は陸上とは大きく異なり、深海の極限環境に適応した微生物が多く棲息している。その中の一つである放線菌は生理活性物質を生産していることが知られ、創薬のリソースとして注目を集めている。しかし放線菌は生育が遅いものが多い為、放線菌を分離する際にグラム陰性細菌が寒天培地を覆ってしまい効率的に分離できない問題があった。そのため陸上サンプルから分離する方法を参考に、グラム陰性細菌を抑え放線菌を効率よく分離できる方法の検討を行い、分離法を決定し実際に深海サンプルを用いてスクリーニングを行った。
【方法・結果】深海由来の放線菌と深海から良く分離されるグラム陰性細菌を用いて検討を行った。初めに前処理としてSDS 処理と熱処理を行う方法を検討した。SDS 処理を行うことによりグラム陰性細菌の生育を抑える事ができたが、SDS 処理は深海由来の放線菌の生育も抑制することもわかったため放線菌を分離する方法として適さないと示唆された。次に熱処理（30˚C、40˚C、50˚C）による影響を検討した結果、50˚C ではグラム陰性細菌にのみ生育抑制を示したので熱処理を前処理として用いることにした。さらに培地に抗生物質を添加する方法も検討した。ポリミキシンB、アズトレオナム、ナリジキシン酸をそれぞれ培地に添加しグラム陰性細菌と放線菌の生育にどのような影響を与えるのか試験を行った結果、ナリジキシン酸のみが放線菌の生育に大きな影響を与えず、グラム陰性細菌の生育を抑制することが確認できた。これらの事から実際に深海サンプルから放線菌を分離する際の処理として熱処理とナリジキシン酸添加を行うこととした。分離法が決定したので相模湾の深海サンプルを用いスクリーニングを行い、どのような属種の放線菌が分離されたか報告する。

actinomycetes, deep-sea, isolation

講演番号：3C25p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ C校舎25会場

潰瘍性大腸炎の炎症緩和効果を有するプロバイオティクスに関する基盤的研究（その１）
Basic study on probiotics with anti-inflammatory effects to ulcelative colitis.(part 1)

○佐藤 優理、坂本 光央[1]、小川 仁[2]、三浦 康[2]、柴田 近[2]、川井 泰、北澤 春樹、大熊 盛也[1]、堀井 明[2]、齋藤 忠夫（東北大院農・生物産業創成、[1]理研・BRC-JCM、[2]東北大病院・胃腸外科）
○Yuri Sato, Mitsuo Sakamoto[1], Hitoshi Ogawa [2], Koh Miura[2], Chikashi Shibata[2], Yasushi Kawai, Haruki Kitazawa, Moriya Ohkuma[1], Akira Horii[2], Tadao Saito(Tohokudaiin, [1]Riken, [2]Tohokudaibyouin)

【目的】潰瘍性大腸炎（UC）は大腸にびらんや潰瘍ができ、慢性的な炎症が起こる難病である。現在のところ、発症の原因は不明であり、完治に導く内科的療法もない。我々は、ヒト腸内細菌叢とUCの関係に着目し、炎症に最も関与していると考えられる大腸粘液層の細菌叢解析を行った。将来的には炎症の緩和を目指したプロバイオティクスの探索とその利用性の構築を目的としている。
【方法】東北大学附属病院から提供を受けたヒト大腸粘液より、全DNAを抽出し、細菌16SrRNA遺伝子に対するユニバーサルプライマーを用いて全細菌の16SrRNA遺伝子を増幅した。この遺伝子を①T-RFLP法②クローンライブラリー法にて解析し、腸内細菌叢を解析した。①T-RFLP法では、増幅された細菌16SrRNA遺伝子を5つの制限酵素で処理し、その際に得られる断片長の違いにより、UC患者とコントロール群の細菌叢の違いを調べた。②クローンライブラリー法では、より詳細に細菌の同定を行う目的で、増幅された細菌16SrRNA遺伝子を大腸菌に組み込み、クローンライブラリーを作成した。作成したライブラリーより16SrRNA遺伝子のシークエンスを解読し、菌種を同定した。
【結果】T-RFLP法の結果、得られた断片数が少ないことより、UC患者では健常者に比べて菌叢の多様性が減少していることが示唆された。さらに、クローンライブラリー法による菌種同定の結果、UC患者では明らかに菌種の多様性が減少しており、T-RFLP法の結果と良く一致した。
UC患者では健常者に比べてBacteroidetesおよびFirmicutesが多く存在し、細菌叢のバランスが崩れていた。また、特殊な菌種は検出されなかったが、UC患者において*Bacteroides caccae, Bacteroides fragilis, Enterococcus sanguinicola, Ruminococcus gnavus*が健常者に比べて極めて多く存在した。これらの細菌がUC患者の腸内細菌叢のバランスの破綻に関与していると考え、現在これらの細菌に対する当研究室の有用乳酸菌による付着阻害能等を検証している。すなはち、UC患者の炎症の悪化には細菌叢のバランスの崩壊が関与していると思われ、細菌叢の正常化を支援補助するようなプロバイオティクスの探索利用がUC患者の炎症緩和に役立つことが示唆された。

T-RFLP, ulcerative colitis, probiotics

講演番号:3C25p03
講演日時、会場:3月24日14:11～ C校舎25会場

マウス腸管内容物のメタボローム解析

Metabolic analysis for the contents of murine intestinal compartments

○山本優理[1,2]、中西裕美子[1,3]、村上慎之介[1,3]、野津量子[4]、植野昌未[4]、日置恭司[4]、高倉彰[4]、中東憲治[1,3]、平山明由[1]、杉本昌弘[1,3,5]、曽我朋義[1,2,3]、伊藤守[4]、野村達次[4]、冨田勝[1,2,3]（[1]慶大・先端生命研、[2]慶大・環境情報、[3]慶大・政策・メディア、[4]実中研、[5]京大・医）

○Yuri Yamamoto[1,2], Yumiko Nakanishi[1,3], Shinnosuke Murakami[1,3], Ryoko Nozu[4], Masami Ueno[4], Kyouji Hioki[4], Akira Takakura[4], Kenji Nakahigashi[1,3], Akiyoshi Hirayama[1], Masahiro Sugimoto[1,3,5], Tomoyoshi Soga[1,2,3], Mamoru Ito[4], Tatsuji Nomura[4], Masaru Tomita[1,2,3] ([1] Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2] Dept. Env. & Info. Studies., Keio Univ., [3] Grad. Sch. Media & Governance., Keio Univ., [4] Cent. Inst. Exp. Animal., [5] Grad. Sch. Med. and Fac. of Med., Kyoto Univ.)

【目的】腸内細菌叢（腸内フローラ）は宿主の代謝や免疫において重要な役割を担っており、腸管部位ごとに異なる腸内フローラは宿主に様々な影響を及ぼしていることも示唆されているが、腸内フローラの違いによる腸管内容物中の代謝物の変化を追った解析例は報告されていない。そこで、腸管内容物中の代謝物についてメタボローム解析を用い、腸内細菌と宿主の共利関係について理解することを目的としてメタボローム解析を実施した。さらに、無菌マウスと腸内細菌を定着させた2種類のマウスをそれぞれ比較することで、腸内細菌の有無、腸内フローラの違いによる代謝物の濃度や代謝物の変化について解析を行った。

【方法】5週齢及び12週齢の無菌(GF)マウス、79種の腸内細菌(CIEAフローラ)を定着させたCIEAマウス、及びSPFマウスの3種についてそれぞれ3匹ずつ、各個体から6ヶ所の腸管部位(胃、小腸上部、小腸下部、盲腸、結腸上部、結腸下部)の内容物を採取し、腸管内容物についてのメタボローム解析を行った。メタボローム解析にはキャピラリー電気泳動質量分析装置(CE-MS)を用いた。

【結果】腸管内容物中に含まれる代謝物は腸管部位ごとや群間ごとに特徴がみられた。腸内細菌由来の代謝物を特定するため、GFマウスとCIEAマウスの腸管内容物中の代謝物を比較した結果、CIEAマウスで同定できた物質数は237物質、GFマウスで同定できたものは127物質であった。胃では尿素回路上に関連する代謝物がGFマウスに比べCIEAで約5～6倍の濃度で蓄積していた。また、小腸上部、小腸下部、及び盲腸ではアミノ酸代謝に関連する代謝物がGFマウスに比べCIEAで蓄積していたことから、これらの代謝物は腸管部位特有に存在する腸内細菌が産生している可能性が考えられる。異なる腸内フローラの影響を調べるため、CIEAマウスとSPFマウスの腸管内容物中の代謝物を比較した結果、ビタミンや有機酸など腸内細菌が産生すると考えられる代謝物に違いが見られ、これらの代謝物が腸内フローラの違いを反映していることが予想された。

gut microflora, metabolomic analysis

講演番号：3C25p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎25会場

Feeding rats yacon powder increases intestinal fermentation and alters microbial community profiles

○Arya UTAMI Ni Wayan、田中 みち子、曾根 輝雄、中津 シンディ、浅野 行蔵 （北大院農・応生科）
○Arya UTAMI Ni Wayan, Michiko Tanaka, Teruo Sone, Cindy Nakatsu, Kozo Asano （Grad. Sch. Agr., Hokkaido Uni.）

【目的】Addition of foods with high fructooligosaccharides (FOS) to diets have been shown to improve large bowel health by increasing fermentation. Yacon is a tuber containing high amount of FOS however there is a little information on the physiological effects of yacon powder with high FOS in animal experiments. The objective of this study was to determine the differences in intestinal fermentation and gut microbial communities after feeding rats yacon powder.
【方法・結果】In vivo study used 30 four-weeks-old male Sprague Dawley (SD) rats that were randomly assigned into one of three treatment groups (n = 6/group) in which they were fed a control diet (AIN 93G modified + 8% cellulose), FOS diet (AIN 93G modified + 5% FOS), or yacon diet (AIN 93G modified + yacon powder equivalent to 5% FOS) for 28 d. Compared to the control dietary yacon powder and FOS significantly decreased cecal and fecal pH and increased cecum weight. Comparison of 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprint patterns of from cecum, colon and fecal DNA indicated microbial community structure in rats fed yacon were more similar to rats on the FOS diet versus the control diet. Our results demonstrated that yacon powder increased intestinal fermentation in a manner similar to the addition of pure FOS to the diet, which has been shown by many number of studies to be related to improve health. We suggest that yacon can be used as an alternative source of FOS to the diet.

yacon, fructooligosaccharides, DGGE

講演番号：3C25p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ C校舎25会場

牛乳中の優占種細菌がウシ乳腺上皮細胞の遺伝子発現に与える影響

Effect of predominant milk bacteria on gene expression in bovine mammary gland epithelial cells

○萩　達朗、麻生　久[1]、野村　将（農研機構・畜草研、[1]東北大院農・応生科）
○Tatsuro Hagi, Hisashi Aso[1], Masaru Nomura (NILGS, [1]Tohoku Univ.)

【目的】ウシ乳房は乳房内に侵入してくる病原菌に対し、免疫系を中心とした防御反応機構を起こすことがわかっている。一方、乳中には病原菌以外にも微生物が存在するにもかかわらず、それら常在細菌が宿主に与える影響は明らかではない。そこで本研究では、病原菌以外の乳中細菌と宿主との関係を解明するため、乳中で優占種である細菌がウシ乳腺上皮細胞(BMEC)の遺伝子発現に与える影響を調べた。
【方法】試験には、乳中で最も優占だった*Lactococcus lactis*をはじめ、顕著に検出された*Stenotrophomonas maltophila*、*Chryseobacterium sp.*、*Serratia sp.*、*Pseudomonas sp.*、*Microbacterium* sp.を用いた。BMECは20％FBS添加D-MEM培地を用いて12 well plastic plateでコンフルエントまで培養し、65℃、30分間熱処理した乳中細菌を各wellあたり10^7となるようにBMEC培養plateに接種した。接種してから6時間および24時間後にBMECのRNAを抽出し、病原菌によって強く誘導される炎症性サイトカインのIL-1βおよびIL-8遺伝子の発現量を定量PCRで調べた。さらに、最優占種である*L. lactis*を接種した時のBMECの遺伝子発現変動についてマイクロアレイで網羅的解析を行った。
【結果】*L. lactis*および*Microbacterium* sp.をBMECに接種することによって、炎症性サイトカイン遺伝子であるIL-1βおよびIL-8の発現量は細菌未接種のものと比べて1.5～2倍程度上昇した。一方、それら以外の４種については、接種することによって炎症性サイトカインの遺伝子発現量は数十倍に大きく上昇した。*L. lactis*接種後の遺伝子発現をマイクロアレイで解析した結果、27665個のウシ遺伝子のうち、353個の遺伝子が1.5倍以上に発現上昇し、334個の遺伝子が3分の2以下に発現抑制した。Gene Ontology 解析の結果、発現変動した遺伝子は主に細胞プロセス（主に、細胞内シグナル伝達）に関係するものであった。免疫関連遺伝子に着目すると、マイクロアレイの結果でも*L. lactis*によるIL-1βおよびIL-8遺伝子の発現量増加は1.5倍程度で、定量PCRの結果を反映するものであった。また、他の免疫関連遺伝子について、*L. lactis*の影響による顕著な発現量変化は観察されなかった。

Milk bacteria, bovine mammary gland epithelial cell, gene expression

講演番号：3C25p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ C校舎25会場

異なるメタン濃度により集積された微生物菌叢の大量配列解析

Microbial community analysis of methane-oxidizing enrichment cultures using pyrosequencing

○下村 義典[1]、山岸 卓弥[1]、北川 航[1,2]、片山 泰樹[3]、佐藤 朋之[2]、田中 みち子[1]、浅野 行蔵[1]、鎌形 洋一[1,2]（[1]北大院農・応生科、[2]産総研・生物プロセス、[3]産総研・地圏資源）

○Yoshinori Shimomura[1], Takuya Yamagishi[1], Wataru Kitagawa[1,2], Taiki Katayama[3], Tomoyuki Sato[2], Michiko Tanaka[1], Kozo Asano[1], Yoichi Kamagata[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ, [2] Bioproduction Res. Ins., AIST, [3]GREEN, AIST)

【目的】メタンは燃料資源として利用される一方、二酸化炭素に次いで寄与率の高い温室効果ガスである。メタンの多くは湿地や水田、反芻動物の消化管などから発生しており、その大部分は生物起源である。一方大気中へのメタン放出は、メタンの生物的酸化（消費）とのバランスによって規定されている。演者らは、メタンの生成と消費が起きている環境場において、どのようなメタン酸化微生物が存在しており、それらがメタン濃度に応じて、どのように種構成を変化させるのかを明らかにすることを目的に、次世代シークエンシング技術ならびに分離培養技術を用いてその多様性を解析した。

【方法・結果】北海道大学大野池より採取した堆積物を試料とし、メタンを唯一の基質とする培地を用いて集積培養を行った。集積にあたってはメタン濃度を0、0.1、10%に設定したfed-batch培養を行うとともに、メタン濃度10%で継代を行う系を確立した。メタン濃度はGCを用いて経時的に測定し、系内のメタンが検出限界に達するたびに上記濃度のメタンを添加（fed-batch）もしくは、新たな培地に継代した。およそ2ヶ月間の集積培養後、原試料及び各集積系の最終培養物から全DNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて16S rRNA遺伝子部分配列の大量配列解析を行った。その結果、メタン濃度の違いによりメタン酸化微生物群の劇的な種構成変化が認められ、メタン濃度が決定的な因子であることが明らかとなった。これらの集積培養からメタンあるいはメタノールを基質としてメタン酸化細菌ならびに関連細菌の単離を試みた。その結果、メタノール培養により、メタン酸化細菌及びメタノール資化性細菌を数株単離した。しかしながら、メタン培養ではメタン酸化細菌を単離することができなかったが、メタン酸化細菌を含む複数種の微生物が存在する状態では、安定的に培養及び継代が可能であることがわかった。現在、これらの細菌叢の構成種を明らかにするとともに異種微生物間相互作用について解析中である。

methane, methanotroph, methylotroph

講演番号：3C25p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎25会場

牛糞堆肥培養物に生育する好熱性微生物叢とその共生によるメタン生成能の解析

Analysis of thermophilic microbes community and symbiotic methanogenesis in cow manure compost culture.

○守 次朗、原 新太郎、前田 高輝[1]、橋床 泰之（北大院農・応生科、[1]北農研センター）

○Jiro Mori, Shintaro Hara, Koki Maeda[1], and Yasuyuki Hashidoko(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, [1]Hokkaido Agricultural Research Center)

【目的】牛糞堆肥は発酵過程において65～70°Cまで内部温度が上昇し、同時に大量のメタンを放出する。しかし、その原因となる好熱性メタン生成古細菌、およびメタン生成反応に基質を供給する好熱性真正細菌に関しては殆ど明らかになっていない。我々は、牛糞堆肥中の微生物の集積培養とDGGE法による菌叢解析を行い、高温(65°C)かつ微好気的条件に晒しても生存でき、かつ嫌気的環境下で活発に活動するメタン生成古細菌と、これに共生して水素あるいは酢酸を供給する好熱性真正細菌の同定によるメタン生成代謝制御系の解明を目指した。

【方法】Winogradsky無機塩をベースにN源として3.3 g L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$、C源として10.8 g L^{-1}グルコース、4.9 g L^{-1} CH_3COONaおよび9.6 g L^{-1}乳酸カリウム、さらにK,Ca,Mgの金属塩をそれぞれ加えた0.3%ジェランガムソフトゲル培地をガスクロバイアルに調製し、発酵１ヶ月目に採取、-80°C凍結保存した堆肥を接種して65°Cで静置培養した。培養日数ごとの培地ヘッドスペース(22.5 mL)のメタン濃度をFID-GC(Molecular sieve 5A plot, VARIAN)で測定した。また、堆肥およびその培養物からそれぞれ菌体DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子領域に対するDGGEによって各々の菌叢を解析した。検出された主要な古細菌、真正細菌についてそれぞれの特異的プライマーを作成し、16S rRNA遺伝子全長を解読した。

【結果】堆肥接種、65°C培養では培養10日目までにおよそ50万 ppmvのメタンがヘッドスペースに蓄積した。しかし、その培地を採取し同じ培地に継代すると同じ培養期間でのメタン生成量は50 ppmvに大きく低下した。37°Cや50°Cで培養するとメタン生成量は半分程度に抑えられた。また、長期間（＞1年）凍結保存した堆肥を接種するとメタン生成量が大きく減少したが、接種源の堆肥をあらかじめ50～65°Cで一晩プレヒートすると、再び多くのメタンを蓄積するようになった。接種源の堆肥やその培養物の菌叢を解析すると、堆肥および大量のメタンを蓄積した培養物では酢酸資化性メタン生成古細菌である*Methanosarcina*属が、メタン蓄積量が減少した培養物では水素･CO_2資化性の*Methanoculleus*属が主要な古細菌であることがわかった。また、酢酸生成細菌*Acetomicrobium faecale*（Bacteroidetes 門）、水素生成細菌*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*（Firmcutes 門）がそれぞれの古細菌と共存していたことから、*Methanosarcina*属は酢酸生成細菌との共生により活発なメタン生成能を発揮すると考えられた。これらの微生物の相互作用の直接的な証拠を得るため、現在、各々の特異的プライマーから作成したDNAプローブを用いてのFISH解析やSEM観察などを行っている。

methanogenic archaea, compost, DGGE

講演番号：3C25p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎25会場

*Methylobacterium*属細菌の植物への優占化機構の解析

Mechanism of predomination of *Methylobacterium* species in phyllosphere

○中村由貴、森泉、鈴木信弘、金原和秀[1]、谷明生（岡山大・植物研、[1]静岡大・工）

○Y. NAKAMURA, I. C. MORI, N. SUZUKI, K. KIMBARA[1], A. TANI (Inst. Plant Sci. Res. Okayama Univ., Faculty of Eng. Shizuoka Univ.[1])

【目的】植物は成長の過程で細胞壁に含まれるペクチンの分解によって産生するメタノールを気孔から放出しており、その量は地球上で年間 1 億トンにも及ぶ。世界中の植物の葉の面積は 10 億平方キロメートルともいわれ、その表面には様々な細菌が生息している。近年のメタゲノム解析の結果、*Methylobacterium* 属細菌は葉面細菌全体の約 10 %を占める優占種であることが示されている。本属細菌はメタノール資化性細菌であり、植物が放出するメタノールを利用して優占化していると考えられている。メタノールの初期酸化はペリプラズム局在性メタノール脱水素酵素(MDH)によって行われ、これは補酵素としてピロロキノリンキノン（PQQ）を含む。PQQ は強力な抗酸化活性を持ち、植物の生育を促進する作用があることが報告されている。当研究室が保有する約 200 株の植物由来 *Methylobacterium* 細菌ライブラリーを調べた結果、本属細菌は培地中に平均約 5 μM（最大 30-60 μM）の PQQ を蓄積することが示された。以上から、植物葉面で放出されるメタノールは本属細菌の MDH によって資化され、細菌由来の PQQ が植物細胞にも供給されると考えられた。一方、植物の気孔は病原性細菌を認識して閉じる機構を持っており、そのシグナル伝達は活性酸素の発生を伴う。抗酸化活性を持つ PQQ は、気孔応答に何らかの作用を持つと考えられた。そこで本研究では、*Methylobacterium* 属細菌の植物への優占化機構の一端を解明するため、PQQ が気孔開閉運動に与える影響を調べた。

【方法】植物としてシロイヌナズナ、ダイズ、ナスを用いた。切り取った葉をバッファーに 3 時間浮かべ、濃度を変えて PQQ を添加して一定時間後に破砕し、顕微鏡下で気孔開度を測定した。また、PQQ 存在下での光やアブシジン酸（ABA）に対する気孔の応答も検討した。

【結果と考察】シロイヌナズナ、ダイズ、ナスにおいて、PQQの添加によって気孔が有意に開くことを発見した。また、PQQは光による気孔開閉、ABAによる閉口には影響しないが、flg22（植物の自然免疫を活性化するMAMPsの一種で病原性*Pseudomonas*属細菌のフラジェリンタンパク質ペプチド）による気孔閉口を一部阻害した。植物の気孔は病原性細菌の侵入経路であり、病原性菌も気孔を開く物質を産生するが、常在菌が作る物質による開口現象は初めての発見である。また、それはメタノールを介する植物と常在菌との相互認識の存在を意味しており、植物に敵として認識されていないことを示唆する。現在、シロイヌナズナ変異体を用いて気孔開口のメカニズムを解析中である。以上から、PQQの分泌は本属細菌が植物表面で優占化するための一つのファクターであると考えられた。

PQQ, *Methylobacterium*, stomata

講演番号：3C25p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎25会場

花に生息する嫌気性菌の探索と特性

Identification and characterization of anaerobes living in flowers

○菅原　麻美、黒沢　佳奈、宮崎　真努華、世木田　勇気、加藤　幹雄、新村　洋一、川崎　信治（東農大応生科・バイオ）

○Asami Sugawara, Kana Kurosawa, Madoka Miyazaki, Yuki Sekita, Mikio Katou, Shinji Kawasaki, Youichi Nimura (TUA, Bioscience)

【目的】嫌気性細菌である乳酸菌やビフィズス菌は動物腸管内や発酵食品に広く分布しているが、O_2耐性能の高いビフィズス菌がミツバチの腸管から単離された報告もある。そこでミツバチの腸内細菌は花由来と推定し、糖源が豊富な蜜を含む花には特有の微生物相が存在すると推測した。本研究では花に生息する嫌気性細菌の生態分布の解明と新たな微生物資源の探索を目的とする。
【方法】花試料は2007年～2010年にかけ尾瀬国立公園を中心に日本全国で採取した。採取した花を嫌気置換したMRS液体培地中で潰し、その抽出液をMRS培地で混釈した。2～3日嫌気培養後、得られたコロニーをランダムに選択し、16S rRNA遺伝子解析を行った。また、同抽出液からビーズフェノール法によってDNAを抽出し、微生物叢解析を行った。
【結果】尾瀬国立公園等の人の生活圏外で採取した花からは*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Leuconostoc*属、*Carnobacterium*属の乳酸菌が単離され、多いもので花1輪あたり10^4～10^8ものコロニーが得られた。このうち既知の菌種と相同性が97%以下の株については同定試験を行い、新種の乳酸菌*Lactobacillus floricola*と*Lactobacillus ozensis*を提唱した[1)]。これらの菌が花に生息する意義を明らかにするため、生理的特性の解明を進めている。また、PCR-DGGE法やメタゲノム解析の手法を用いて、培養法との相関性を解析している。

1) Kawasaki *et al*. IJSEM 61:1356-1359 (2011), IJSEM 61:2435-2438 (2011)

Keyword1 anaerobe, Keyword2 lactic acid bacteria, Keyword3 flower

講演番号：3C25p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎25会場

シロイヌナズナ内生細菌の培養依存法・非依存法による群集構造解析

Culture-dependent and -independent community analysis of bacterial endophytes in *Arabidopsis thaliana*

○小田嶋 成徳、大塚 重人、磯部 一夫、妹尾 啓史（東大院農生科・応生化）
○Shigenori Odashima, Shigeto Otsuka, Kazuo Isobe, Keishi Senoo (Grad. Sch. of Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】植物体内にはさまざまな細菌が生息しており、それらの中には植物の成長を促進したり植物のストレス耐性を高めたりするもの、また、植物に病害をもたらすものなどが存在する。しかし、植物に与える作用が明らかになっている細菌はごく一部であり、大多数の植物内生細菌の機能は未解明のままとなっている。そこで本研究では、植物内生細菌の生態と機能に関する知見を深めるために、まずは植物体内に生息する細菌の組成を詳細に解析することを目的とした。すなわち、培養依存的手法および非依存的手法により、シロイヌナズナの植物体内に生息する細菌の群集構造を解析した。

【方法】来歴の違う3種類の農耕地土壌に、表面を滅菌したシロイヌナズナの種子を播種して育生した。約40日後に植物体を採取してすりつぶし、Ikeda et al. (Microb. Ecol., 58:703-714, 2009)の細菌濃縮法にて内生細菌を回収した。回収した細菌の半分からDNA抽出をし、16S rRNA遺伝子をPCR増幅してクローンライブラリーを作成し、塩基配列を解読した。残りの半分を、R2A Gellan Gum平板培地に接種して培養し、形成したコロニーを分離して、それらの16S rRNA遺伝子の塩基配列を解読した。得られた塩基配列から細菌の所属分類群の簡易同定を行った。

【結果】クローンライブラリー解析の結果、シロイヌナズナ内生細菌の組成は、使用した土壌によって差が見られた一方、土壌によらず*Sphingomonas*属、*Pseudomonas*属、*Acinetobacter*属などが共通して高い割合で検出された。これまでに植物ホルモンの生産能や病原菌に対する防御作用などをもつ*Sphingomonas*属細菌が知られており、本研究の結果からも、*Sphingomonas*属細菌が植物と何らかの相互作用をもつ可能性が示唆される。また、16S rRNA遺伝子塩基配列の相同性から、検出された*Sphingomonas*属内生細菌は、既知種と近縁でないものが多いことが示された。このことは、植物体内に未知の*Sphingomonas*属細菌が多く生息することを意味している。今後、これら未知の細菌の機能を解析することで、植物内生細菌の知られざる役割が解明されると期待される。

bacterial endophytes, community analysis, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：3C25p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ C校舎25会場

共生系におけるアルファルファ根粒菌のシグナルレセプターMcpS の機能

Function of McpS of *Sinorhizobium meliloti* in symbiosis

山本　裕，吉村　理，斎藤勝晴，○田渕　晃（信州大･農）
Yuu Yamamoto, Osamu Yoshimura, Katsuharu Saitou, ○Akira Tabuchi
(Faculty of Agriculture, Shinshu University)

【目的】アルファルファ *Medicago sativa* の根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* では，これまでに，９つの *mcp* 遺伝子(Methyl−accepting chemotaxis protein 遺伝子)，すなわち，*mcpS*, *mcpT*, *mcpU*, *mcpV*, *mcpW*, *mcpX*, *mcpY*, *mcpZ* および *icpA* が同定されている．私どもの研究室では，*S. meliloti* と *M. sativa* との共生系において Mcp が果たしている機能を明らかにすることを目的として，各 *mcp* 欠損変異株の解析を行ってきた．今回，私達は，*mcpS* 欠損株形成根粒をもちいて，窒素固定関連遺伝子である *fixN* 遺伝子の発現および窒素固定能について調べた．さらに，*mcpS* 欠損の相補試験を行う目的で，*mcpS* をもつプラスミドの *mcpS* 欠損株への導入を試みた．

【方法】*fixN* 遺伝子の発現解析を行う目的で，まず，*fixN* -*lacZ* 融合遺伝子をもつプラスミド pGMI931 を導入した *mcpS* 欠損株を *M. sativa* に接種し，22℃，24 時間明期の条件で約 30 日間培養した．次に，培養により形成された根粒から根粒破砕液の調製を行った．この根粒破砕液を用いて，o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG)を基質とする簡易 *lac* assay により，根粒中のβ−ガラクトシダーゼの活性測定を行った．

また，根粒の窒素固定能を調べる目的で，アセチレン還元法によりニトロゲナーゼ活性の測定を行った．まず，野生株および *mcpS* 欠損株を *M. sativa* に接種し，同条件で培養後，平均的な根粒数が形成された植物体 4 個体の根部を切り出した．次に，この植物体根部を 35 mL 容バイアルビンに入れ，気相の 1/10 量にあたる 3.5 mL のアセチレンを注入後，1.5 時間，3 時間におけるエチレン生成量を測定した．

さらに，*mcpS* 欠損の相補試験を行う目的で，*mcpS* をもつプラスミド pBS1059 を大腸菌 S17-1 に導入した後，この菌を用いて，接合伝達により，*mcpS* 欠損株への pBS1059 の導入を試みた。

【結果】β−ガラクトシダーゼ活性は，野生株と比較して，*mcpS* 欠損株では，約 1.6 倍の活性を示し，10%水準で有意差が確認された．また，窒素固定能に関しては，野生株と比較して，*mcpS* 欠損株では，ほとんどニトロゲナーゼ活性を示さず，有意に窒素固定能が低下していた．

Mcp, symbiosis, *Sinorhizobium meliloti*

講演番号：3C25p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ C校舎25会場

植物遺体食性土壌動物*Armadillidium vulgare*（オカダンゴムシ）排泄物の細菌群集解析

Bacterial community structure analysis of feces of dead plant feeding terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*.

○國則 成史[1,2]、飯田 敏也[2]、宇佐美 論[1]、大熊 盛也[2]（[1]東洋大院・工、[2]理研BRC-JCM）
○Masafumi Kuninori[1,2], Toshiya Iida[2], Ron Usami[1], Moriya Ohkuma[2]
([1]Toyo Univ., [2]RIKEN BRC-JCM)

【目的】植物遺体食性土壌動物は、陸上生態系における難分解性の植物遺体分解において大きな役割を果たしている。植物遺体が土壌動物に摂食されることで、植物遺体は細かく粉砕され、嫌気域を含む腸管内を通過して排泄されるが、その過程で微生物叢は大きく変動すると考えられる。さらに、排泄物中では土壌微生物による未消化植物遺体の分解活動が活性化すると考えられるが、そのような動物の排泄物に着目した微生物群集解析の報告例は少ない。そこで本研究では、土壌動物と微生物活動の関連性を探るため、植物遺体食性土壌動物*Armadillidium vulgare*（オカダンゴムシ）をモデル土壌動物として、その排泄物の細菌群集解析を行った。
【方法】理化学研究所構内で採取した土壌、サクラ落葉（純水で表面付着物を洗浄）、*A. vulgare*（約200匹）及びコンクリート製ブロックを飼育容器内に入れ、実験室内で飼育した。飼育開始後8及び22日目にブロック上の*A. vulgare*排泄物（以下Avfと記述）を除去し、その3日後（11及び25日目）にブロック上に蓄積されたAvfを採取した。また、飼育25日目に飼育容器内の一部の落葉及び土壌を採取し、落葉については純水で洗浄後液体窒素にて粉砕したものを検体とした。各検体からのDNA単離には、ISOIL for Beads Beating（Nippon Gene）を用いた。細菌の16S rRNA遺伝子のPCR増幅には、BSF343及び検体毎に異なるタグを付与したBSR926プライマーを用い、GS Junior（Roche）及びMothurにて塩基配列を解析した。
【結果・考察】高速シーケンサーによる16S rRNA遺伝子配列解析により、4検体に由来する86230配列が得られ、うち69977配列を解析に用いた。3%の差異に基づくOTU数は、落葉（1240）及び土壌（1539）に対してAvfは270前後と小さく、またα及びβ多様性の解析結果から、Avfにおいて細菌の多様性が低下している事が示された。分類群解析の結果、全検体で*Proteobacteria*門の細菌が優勢であった。しかし、落葉上で比較的優勢化していた*Bacteroidetes*門、*Acidobacteria*門、β-及びδ-*Proteobacteria*綱の細菌群はAvfにおいて存在比が大幅に低下し、また*Tenericutes*門、*Actinobacteria*門、γ-*Proteobacteria*綱の細菌群はAvfで優勢化していたなど、検体間の細菌叢に変動が認められた。また、陸生甲殻類*Porcellio scaber*で報告されている2種の中腸腺共生細菌（*Candidatus* Hepatoplasma及び*Candidatus* Hepatincola）に近縁な配列がAvfにおいて大きな割合を占めていたことから、これら共生細菌の他個体への伝播に排泄物の糞食行動の介在が示唆された。

Armadillidium vulgare, Litter transformer, bTEFAP

講演番号：3C25p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎25会場

メタ開裂酵素の多様性と新たなclassの提唱

The proposal of a new classification of extradiol dioxygenase

○石部 貴映、鈴木 敏弘[1]、岩田 健一、大森 俊雄
（芝工大・シ工・生科、[1]芝工大院・地域環境システム）
○Takaaki Ishibe, Toshihiro Suzuki [1], Kenichi Iwata[2] ,Toshio Omori[2]
(Department of Bioscience and Engineering, Shibaura Institute of Technology, [1]Graduate school of Regional Environment Systems, Shibaura Institute of Technology)

【目的】メタ開裂酵素は二つの水酸基を有する芳香族化合物を環開裂する酵素である。メタ開裂酵素は初期にclassI及びIIに分別された[1)]。Class Iメタ開裂酵素はclass IIメタ開裂酵素の先祖型であり遺伝子重複を経てclass IIへと進化したと考えられている[2)]。さらにclassI及びIIに当てはまらないメタ開裂酵素はclassIIIに分類された[3)]。Class IIIに属するメタ開裂酵素はclass Iやclass IIとの相同性がほとんど無く、活性中心を構成するアミノ酸残基の保存性も明確でない為、class Iやclass IIとは異なる進化をしてきたと考えられている[3)]。当研究室では環境中からカルバゾール分解遺伝子群（CAR cluster）を持つ菌株を多数単離し、その解析を行ってきた。その結果、それらにメタ開裂酵素が存在し、その多くが2subunit構造を持ち、従来の分類ではclassIIIに入る事が明らかになった。現在までにMampel、Nogalesらによってclass IIIの一部のサブクラスに関する提案[5)6)]は行われてきたが分類対象の少なさの為、現在のclassIIIはclassI・IIに分類されなかった集団の状態である。そこで、我々が海や陸から単離した11の菌株が持つメタ開裂酵素とそれらと同様のcar clusterを持つ菌株の2サブユニットメタ開裂酵素を加え、classIIIと新たなclassIVの提案を目的とした。

【方法】classIIIのメタ開裂酵素のsmallまたはlarge subunit、また二つを合わせたものそれぞれについて塩基、アミノ酸でのアライメントと系統樹作成を行った。2サブユニット構造でない酵素との比較は、活性に主に関わっているlarge subunitと行った。系統樹のアウトグループにはclassIまたはIIのメタ開裂酵素を用いた。

【結果】classIIIに分類されているメタ開裂酵素に関してアライメントを行ったところ、活性部位の一致が見られるグループの存在が確認された。作成した系統樹からはアライメントの結果と同様に、サブクラスの存在とclassIVに分類可能であろう酵素の存在が確認された。また、単環または二環芳香族化合物を基質とする酵素ごとに分かれたことは、Eltisらが作成したclassIIの系統樹においても同様の結果が見られた。

【参考文献】[1)] Harayama and Rekik 1989. [2)]Eltis and Bolin 1996. [3)]Spence et al.1996.
[4)] Mampel et al.2005. [5)]Nogales et al.2005.

meta-cleavage emzymes,classification,carbazole

講演番号：3C25p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎25会場

海洋性プロピレン資化性細菌の単離・特徴およびアルケン酸化関連遺伝子の比較

Isolation and characterization of propylene-assimilating bacteria and comparison of the alkene-oxidation related genes.

○鈴木 敏弘[1]、古松 星来[2]、森下 直紀[2]、布施 博之[2]（[1]芝工大院・地環システム、[2]芝工大・システム理工・生命）

○Toshihiro Suzuki[1], Seira Furumatsu[2], Naonori Morishita[2], Hiroyuki Fuse[2]（[1] Grad. School of Regional Environ. Systems. Shibaura Inst. Tech. [2] Coll. of Systems Eng. and Sci. Shibaura Inst. Tech）

【目的】メタンおよび非メタン炭化水素は、化学工業などで重要な役割を果たしている一方、メタンハイドレートや油田開発により、それらが海洋中へ漏出されることによる海洋環境の変動が懸念されている。我々はこれまでに、海洋におけるガス炭化水素循環に関与していると考えられている微生物の動態・分布・遺伝子の特徴を明らかにするために、海洋性ガス炭化水素資化性細菌を単離し、その性質を明らかにしてきた。アルケンの海洋中での存在比は、メタン・アルカンに比べて微量であるにもかかわらず、以前我々が海水から単離に成功したようにエチレン資化性細菌が海洋に存在するという知見は、アルケン資化性菌は海洋中でガス炭化水素の循環に何らかの関与をしていることを示唆している。本研究では、工業的利用の観点からもエチレン以外のアルケンとしてプロピレンに着目し、プロピレン資化性菌の単離、分解特性およびプロピレン代謝に関与する遺伝子について解析を行い、これまでに明らかとなっている海洋性および土壌性細菌の初発酸化酵素遺伝子との比較を行った。

【方法・結果】本研究では、東京湾の海洋表層から単離した新規海洋性プロピレン資化性菌PE-TB08W株を用いた。本菌株の16S rRNA遺伝子の塩基配列および系統樹解析を行ったところ、海洋性エチレン資化性菌 *Haliea* sp. ETY-MおよびETY-NAG株の属するクレードの近くに位置していた。しかし、塩基配列において、ETY-MおよびETY-NAG株との相同性は94%であったことから、本菌株は新属である可能性が示唆された。また、TEM解析およびGC/MSにより、本菌株はプロピレン生育菌体内に多量のPHBを蓄積していることも明らかとなった。本菌株のガス炭化水素およびアルコール資化能は、プロピレン、n-ブタン、1-ブテン、1-プロパノールおよび1-ブタノール以外は資化しないという特徴的な資化能を示した。これらの初発酸化酵素遺伝子をPCRおよびgene walkにより全塩基配列を決定したところ、他のアルケン資化性菌と同様に4個の*orf*から構成される全長約4 kbの可溶型モノオキシゲナーゼ(sMMO型)遺伝子であることがわかった。それらの各アミノ酸配列の相同性は、土壌性のグラム陽性プロピレン資化性菌と類似していたが、系統樹解析ではそれらと異なるクレードであった。それに加え、アルケン資化に関与するエポキシアルカンコエンザイムM転移酵素 (EaCoMT) 遺伝子も他菌株と同様に見いだされ、これに関しても土壌性アルケン資化性細菌と同じクレードであった。これらの知見をふまえ本発表では、これまでに明らかにされているアルケン資化性細菌との遺伝子の比較についても報告する。

Gas hydrocarbon, alkene, monooxygenase

講演番号：3C25p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎25会場

自然環境からの親水性イオン液体耐性菌及び耐性酵素の探索

Screening of hydrophilic ionic liquid-tolerant microorganisms and enzymes from natural environment.

○妹尾 文哉、戸山 真仁[1]、松原 千明[1]、倉田 淳志、岸本 憲明（近畿大院・農、[1]近畿大・農）

○Humiya Seno, Masahito Toyama[1], Chiaki Matsuhara[1], Atsushi Kurata, Noriaki Kishimoto (Grad. Sch. of Agric., Univ. of Kinki, [1] Fac. of Agric., Univ. of Kinki)

【目的】イオン液体はアニオンとカチオンから構成され、常温常圧で液体の塩である。水や有機溶媒とまざらない第 3 の溶媒である。不揮発性や難燃性を示すため安全性が高い。さらに溶媒リサイクル系の構築が容易であり、繰り返し利用が可能であるため環境調和に適合する。アニオンとカチオンの組み合わせを変化させることで、親水性や疎水性を示すイオン液体を調製可能である。疎水性イオン液体は非水系溶媒であり、合成反応に利用できる。親水性イオン液体 1-Butyl-3-methylimidazolium chloride（[BMIM][Cl]）は、セルロースやケラチンなどの難水溶性バイオマスを溶解できるため、バイオマス利用技術に応用されつつある。イオン液体は溶媒として有用性が高いが、高濃度の親水性イオン液体中では酵素が変性して失活する。さらに 1% イオン液体存在下で *Escherichia coli* の生育は阻害された。そのため高濃度の親水性イオン液体中で利用できる酵素や微生物の開発が期待されている。本研究では、自然環境から親水性イオン液体耐性細菌を探索した。また、得られた菌の培養液上清から、イオン液体存在下で活性を示す酵素の探索した。

【方法・結果】親水性イオン液体 [BMIM][Cl]、1-Ethyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate ([EMIM][CF_3SO_3])、1-Butyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate ([BMIM][CF_3SO_3])、疎水性イオン液体 [BMIM][NTf_2]、1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM][PF_6]) をそれぞれ用いて、81 種類の海水や土壌、塩分を含む食品サンプルを単離源として、10% イオン液体存在下で生育する微生物を探索した。その結果、親水性イオン液体である [BMIM][Cl] と [EMIM][CF_3SO_3]、疎水性イオン液体 である [BMIM][PF_6] 存在下で良好に生育する微生物群集をそれぞれ 7 種類、1 種類、1 種類得ることができた。10% [EMIM][CF_3SO_3] 存在下で生育した単離株 FSW1 株は、10% [BMIM][Cl]、10% [EMIM][CF_3SO_3]、10% [BMIM][PF_6] 存在下でそれぞれ良好に生育した。16S rRNA 遺伝子解析の結果、単離株は *Staphylococcus* 属細菌であると示された。10% [BMIM][Cl] 添加培地を用いて、本菌株の親水性イオン液体耐性を検討した。LC-MS を用いて、本菌株が良好に生育した培養液上清を分析した結果、[BMIM][Cl] 濃度は 10% であり減少していなかった。そのため、*Staphylococcus* sp. FSW1 は親水性イオン液体 [BMIM][Cl] 耐性細菌であることが示された。さらに単離株 SM16 株は 10% [BMIM][Cl] 存在下で生育した。本菌株の培養液上清においてプロテアーゼ活性を検出し、本酵素は [BMIM][Cl] 添加条件下においても活性を示した。

ionic liquid, microorganism, enzyme

講演番号：3C25p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎25会場

タイトル　深海底泥からのD-アミノ酸資化性菌の分離と解析

Title　Isolation and annalysis of D-amino acid metabolizable bacteria from deep-sea sediment.

○窪田高秋、小林徹、出口茂（海洋研究開発機構）

○Takaaki Kubota, Tohru Kobayashi, Shigeru Deguchi. (JAMSTEC).

【目的】知られている全ての生物は主にL-アミノ酸から構成されており、生体のD/L比は極めて低い。生物由来の有機物は微生物などによる生分解を経て最終的には無機物にまで分解されるが、その過程において分解されやすいL-アミノ酸は優先的に消費され残渣のD/L比は増加する。

海洋において、地表からの流入や浅海で生産された有機物は主に浅層域で生分解を受け、その残渣でありD-アミノ酸を著量に含む難分解性有機物の一部は沈降によって中層から深層域に運ばれる。そのため栄養成分に乏しい中層・深層環境での炭素・窒素循環において微生物のD-アミノ酸代謝活性は非常に重要な役割を持つ。これまでに微生物によるD-アスパラギン酸の取り込み活性が深度に比例して増加することは知られているが、深海環境においてD-アミノ酸代謝を担う微生物の直接的な分離やそれらが有する代謝酵素の解析に関する報告はなかった。

そこで本研究では、深海環境におけるD-アミノ酸代謝微生物の探索とそれらが有する代謝酵素の解析を目的として、まずは深海底泥試料からのD－アミノ資化性菌の分離とそれらが有するD-アミノ酸分解活性の解析を試みた。

【方法】D-アミノ酸資化性菌の分離は集積培養法によって行った。分岐鎖D-アミノ酸もしくは芳香族D-アミノ酸を炭素源・窒素源とした液体培地を調製し、これに相模湾56カ所の深海底泥試料を接種した。30℃で2-3日間振とう培養を行い、数回の継代培養の後、増殖を確認した試料について、D-アミノ要求性をマルチプレートアッセイ法によって確認した。その結果、幅広いD－アミノ酸に対する資化性を示した試料について単離操作を行い、分離株の16SrRNA解析による簡易同定を行った。D-アミノ酸代謝活性は、それぞれの株について休止菌体反応によるD-アミノ酸を基質としたα-ケト酸の遊離量を算出することにより求めた。

【結果】作製した分岐鎖および芳香族D-アミノ酸培地によって、相模湾深海56カ所のうち、それぞれ46カ所、47カ所の底泥試料において菌の増殖を確認した。次にマルチプレートアッセイ法による資化性の解析を行った結果、8カ所の試料において幅広いD-アミノ酸に対する資化性を検出した。見出した試料における菌株をそれぞれ単離し、簡易同定した結果、分岐鎖、芳香族D-アミノ酸培地ともに生育した菌相は似通っており、これらの多くはD-アミノ酸代謝に関する研究報告が少ないα-プロテオバクテリア綱に属する細菌だった。分離株の休止菌体におけるD-アミノ酸分解活性を解析した結果、一部のα-プロテオバクテリアにおいて幅広いD-アミノ酸（特に分岐鎖アミノ酸、陽イオン性アミノ酸、芳香族アミノ酸）に対する分解活性を初めて見出した。

現在これらの株の有するD-アミノ酸代謝酵素に関して、さらなる解析を進めている。

Keyword1, Keyword2, Keyword3 D-amino acid, amino acid metabolism, marine bacteria.

講演番号：3C26a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ C校舎26会場

高脂肪食給与マウスにおける短梗五加の脂質代謝制御

The effects of Goka on lipid metabolism in mice fed a high-fat diet

○西田美也子、西田浩志、川上賀代子、新野由佳、近藤桃子、清水太郎、小西徹也[1]（新薬大・応生科）

○Miyako Nishida, Hiroshi Nishida, Kayoko Kawakami, Niino Yuka, Momoko Kondo, Taro Shimizu, Tetuya Konishi (NUPALS)

【目的】五加（短梗五加）はサポニンやクロロゲン酸等を多く含む生薬として知られており、機能性食品素材として期待されているが、その科学的な検証はほとんど行われていない。本研究では肥満誘導食給餌マウスの脂質代謝に五加がどの様な影響を及ぼすかを検討した。
【方法】実験動物としてBalb/cマウスを用いた。飼料は通常食（CT）、高脂肪食としてウエスタン飼料（W）、ウエスタン飼料＋五加果実（WGF）、ウエスタン飼料＋五加葉（WGL）を設定した。短梗五加は収穫後、凍結乾燥した物を破砕し粉末として使用した。WGFおよびWGL中の五加の濃度はそれぞれ1, 5, 10% (w/w)とした。２週間飼育し、7および14日目の糞を回収し、トリグリセリド（TG）と胆汁酸、コレステロール含有量を測定した。14日目にはエーテル麻酔によって屠殺し、肝臓と内臓脂肪、血液を採取した。血液中および肝臓中のTGとコレステロール値を測定した。さらに、肝臓中の脂肪酸合成酵素（FAS）とカルニチンパルミトイル基転移酵素（CPT）の活性を測定した。同時に、培養脂肪細胞である3T3-L1細胞に対する影響についても検討した。
【結果】糞中のTG量はWGF及びWGL与えた群のいずれにおいても増加した。糞中の胆汁酸量は添加した葉の濃度依存的にWより低い値を示した。葉を10%含むWGLのでは血中コレステロールがWよりも高くなる傾向が見られた。肝臓ではWで活性化するFAS活性がWGFでは抑制されること、またWGLではCPTを活性化が上昇することが確認された。五加の実は肝臓中脂肪酸の合成抑制、五加の葉は肝臓中β酸化を促進することで生体の脂質代謝を制御することが示唆された。さらに、3T3-L1細胞でも培地中に分泌されるアディポネクチン量が増加する傾向も見られた。以上の結果から、五加の実と葉による脂質代謝制御機構はアディポネクチンなどのアディポカイン発現制御を介した作用である可能性が示唆された。

Lipid metabolism,Goka

講演番号：3C26a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ C校舎26会場

大豆イソフラボンの肝脂肪低下および脂肪組織重量低下作用の解析

Ameliorative effect of isoflavone on liver and adipose fat accumulation in mice.

○寺澤 佳織、小林 美里、浦川 千鶴[1]、佐藤 旭[1]、青山 博昭[1]、村井 篤嗣、堀尾 文彦
（名大院生命農・応用分子生命科、[1]残農研・毒性部）

○Kaori Terazawa, Misato Kobayashi, Chiduru Urakawa[1], Akira Sato[1], Hiroaki Aoyama[1], Atsushi Murai, Fumihiko Horio (Nagoya Univ, [1]IET)

【目的】大豆イソフラボンはエストロゲン様作用を示す事から植物エストロゲンと称され、大豆を成分とするラット・マウス繁殖用飼料には300～600ppm程度含まれている。我々は、大豆イソフラボンを400ppm添加したAIN-93G飼料をマウスに与えて、イソフラボンの繁殖能および脂質代謝に及ぼす影響を検討してきた。その結果、大豆イソフラボン摂取による脂肪組織重量と肝臓トリグリセリド（TG）濃度の低下を観察した。本研究では、マウスを用いて大豆イソフラボンの脂肪組織重量低下と肝臓TG濃度低下作用を詳細に解析し、その作用機構を探ることを目的とした。

【方法】**実験１**：C3H/HeNマウス（5週齢、雄）を２群（各群10匹）に分け、AIN-93G飼料（AIN群）あるいはAIN-93Gに大豆イソフラボンを400ppm添加した飼料（AIN+ISO群）を与えた。3週間毎に血糖値、血清TG濃度を測定し、12週間飼育した。解剖時に、血清、肝臓、脂肪組織を採取した。**実験２**：C3H/HeNマウス（5週齢、雄）を２群（各群10匹）に分け、AIN-93G飼料に20％ラードを添加した高脂肪食（HF群）あるいは高脂肪食に大豆イソフラボンを400ppm添加した飼料（HF+ISO群）を与えた。その他は実験１と同様に12週間飼育した。

【結果】　**実験１**：全実験期間を通して両群間に飼料摂取量に差はなかったが、47日目以降はAIN+ISO群の体重が有意に低く、解剖時の皮下脂肪、精巣上体脂肪、腸間膜脂肪組織の重量がAIN+ISO群で有意に低下した。また、３週目以降の血清TG濃度はAIN+ISO群では有意な低値が観察された。そして、解剖時の血清インスリン濃度もAIN+ISO群で有意に低下した。解剖時の肝臓TG濃度はAIN+ISO群での低下が期待されたが、両群間で有意な差は得られなかった。しかしAIN+ISO群では、肝臓のSREBP1のmRNAレベルは有意に低下し、その支配下にある脂肪酸合成系遺伝子のmRNAレベルも低下していた。　**実験２**：実験１よりも解剖時の脂肪組織重量は増加しており、高脂肪食摂取による肥満を観察した。両群間で飼料摂取量に差はなかったが、HF+ISO群での体重の有意な低下は見られず、解剖時にも両群間で脂肪組織重量に差はなかった。解剖時の血清インスリン濃度と肝臓TG濃度は、HF+ISO群でわずかに低下したが有意ではなかった。その他の実験１と同様の測定項目については両群間で差は見られなかった。

【考察】マウスにおいてAIN-93G飼料は脂肪組織と肝臓にTG蓄積を易発させる飼料であるが、AIN-93Gへの大豆イソフラボンの添加（飼料中に400ppm）はマウスの肥満を抑制し、インスリン感受性を高め、肝臓の脂肪酸合成を抑制することが示唆された。しかし、20％のラードをAIN-93Gに添加した高脂肪食をマウスに与えて肥満を誘導した場合には、本研究の実験期間内では400ppmの大豆イソフラボンの飼料添加は肥満を抑制するには至らなかった。

Soy isoflavone, liver lipid, obesity

講演番号：3C26a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎26会場

スダチ果皮抽出物であるスダチチンによる食餌誘発性肥満マウスの糖・脂質代謝改善効果

Sudachitin, the major flavonoid in *citrus sudachi*, improves glucose and lipid metabolism in diet-induced obese mice

○ 吉田知美[1)]、笹賀早也香[1)]、三好まどか[1)]、堤理恵[1)]、首藤恵泉[1)]、保坂利男[2)]、新居佳孝[3)]、津嘉山正夫[3)]、岡久修己[3)]、岩田深也[3)]、酒井徹[1)]（徳島大院HBS研究部実践栄養、埼玉医科大学、徳島県工業技術センター）

Tomomi Yoshida、Sayaka Sasaga、Madoka Miyoshi、Rie Tsutsumi、Emi Shuto、Toshio Hosaka、Yoshitaka Nii、Masao Tsukayama、Naoya Okahisa、Shinya Iwata、Tohru Sakai（Inst Health Biosciences Univ Tokushima, Tokushima Industrial Tech. Center）

【目的】徳島県の特産物であるスダチの果皮に含まれるスダチチン(5,7,4'-trihydroxy-6,8,3'-trimethoxyflavone)はスダチの主要なフラボノイドであり、シークワーサーや温州みかんなどの柑橘類に含まれるノビレチンと構造が類似していることが知られている。ノビレチンがこれまでに高血糖とインスリン抵抗性の改善、アテローム硬化症の改善など、抗肥満・抗糖尿病作用を持つことが示されていることから、本研究ではスダチチンが、食事誘発性肥満マウスの糖・脂質代謝に対する影響について検討を行った。

【方法】スダチチン(SD)は、マイクロ波照射によりスダチ果皮から抽出し、95%以上の純度が確認されたものとし、0.2% DMSO溶液に溶解して用いた。C57BL/6マウスに5週齢よりウエスタン食(脂質エネルギー比40%)を与え、SD群には2mg/kg/dayのスダチチン、対照群には0.2% DMSO溶液を、それぞれ12週間経口投与し(SD群、対照群ともにn = 7)、その効果を比較検討した。評価検討項目は、体重、血液生化学的検査(中性脂肪、NEFA)、血清レプチン濃度、アディポネクチン濃度、インスリン値、MRIによる内臓脂肪及び皮下脂肪量の測定、脂質代謝及び糖代謝関連遺伝子発現、タンパク質発現、糖負荷試験、インスリン負荷試験とし、student t検定によって統計学的解析を行った。

【結果】SD投与8週間目より、対照群と比較して体重増加が有意に抑制された($P < 0.05$)。糖負荷試験およびインスリン負荷試験において、SD投与は肥満による耐糖能異常やインスリン抵抗性を改善した。また、SD投与群は対照群と比較して総脂肪量、皮下脂肪量が有意に少なく、血清中性脂肪(SD群：76.5±24.0mg/dL, 対照群：50.3±17.7mg/dl)及びNEFA(SD群：0.75m±0.15Eq/L, 対照群：0.57±0.09mEq/L)濃度も有意に低値であった($P < 0.01$)。また、肝臓及び脂肪組織より抽出した遺伝子を解析すると、肝臓脂肪分解関連遺伝子の発現増加、脂質合成関連遺伝子の有意な発現低下が認められた。

【まとめ】スダチチンの投与は食事誘導性肥満マウスにおいて、体重増加抑制、糖・脂質代謝改善効果を示し、スダチチンが抗肥満・抗糖尿病作用を有する可能性が示唆された。

Keyword1:sudachitin, Keyword2:flavonoid, Keyword3:glucose and lipid metabolism

講演番号：3C26a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎26会場

カカオ由来プロシアニジン高含有組成物の肥満予防効果

Procyanidin-rich extract from cacao liquor prevented obesity.

○山下　陽子、岡部　正明[1]、夏目　みどり[1]、芦田　均（神戸大院・農、[1]（株）明治）
○Yoko Yamashita, Masaaki Okabe[1], Midori Natsume[1], Hitoshi Ashida (Kobe University, [1]Meiji Co. Ltd)

【目的】チョコレートやココアの原料であるカカオ豆は、カテキン、エピカテキン、ならびにエピカテキン重合体であるプロシアニジンなどのポリフェノールを多く含み、多様な機能性が報告されている。本研究ではカカオ由来プロシアニジン高含有組成物(CLPr)を用いて、高脂肪食摂取により惹起される、肥満およびインスリン抵抗性に対する有効性を検証した。
【方法】C57BL/6マウスにコントロール食あるいは30%ラード高脂肪食にCLPrを 0.5あるいは2%の濃度で添加した実験食を13週間自由摂取させた。飼育終了時には脂肪組織重量、血漿中グルコースおよびインスリン濃度を測定した。また、脂肪、筋肉、肝臓での熱産生関連遺伝子であるUCPとPGC-1αの発現量をRT-PCR法にて測定し、タンパク質発現をwestern blot法にて検討した。さらに、筋肉組織におけるGLUT4の細胞膜移行量およびその関連シグナル伝達経路のAMPKαとPI3Kのリン酸化についてもwestern blot法により評価して、CLPrが筋肉組織への糖取り込みに及ぼす効果を検討した。
【結果】CLPr摂取は高脂肪による肥満と高血糖を抑制し、インスリン抵抗性の惹起を抑制した。これらの値は、コントロール群と同レベルまで抑制されていた。また、2%CLPr群では、飼育11週目に実施した耐糖能試験において、コントロール食群、高脂肪食群の両群で有意な血糖上昇抑制効果を示した。さらに、飼育終了時、高脂肪食群では2% CLPr群で脂肪重量が低値を示し、特に、皮下脂肪、腎周囲脂肪、ならびに精巣上体脂肪で有意に低い値であった。一方、除脂肪体重に各群間で有意差は認められず、CLPrは脂肪組織を特異的に減少させることが示唆された。次に、CLPrの脂肪蓄積抑制効果のメカニズムを解明するために、UCP familyの遺伝子発現量を褐色および白色脂肪、筋肉、肝臓で測定した。その結果、CLPrはいずれの組織でもUCPの遺伝子発現を増加させ、特に、褐色脂肪でのUCP1、白色脂肪でのUCP2、筋肉でのUCP3遺伝子発現を有意に増加させた。さらに、UCP発現に関連する遺伝子であり、ミトコンドリアの発現制御因子であるPGC-1αの遺伝子発現量も、CLPrにより各組織で増加し、UCP発現と相関する結果が確認された。UCP familyの発現増加は、AMPKのリン酸化を活性化させ、GLUT4膜移行促進を介した糖取り込みを促進することが報告されていることから、CLPrが筋肉組織のGLUT4膜移行量およびAMPKのリン酸化に及ぼす影響を検討した。その結果、CLPr摂取によるAMPKのリン酸化を介したGLUT4の膜移行の促進が認められた。一方、PI3Kのリン酸化に対する影響は認められなかった。
【まとめ】以上の結果より、CLPrはUCP familyの発現増加による熱産生促進および筋肉におけるAMPKリン酸化を介したGLUT4膜移行を促進すること、これらの作用を介して、血糖消費を促進し、かつインスリン抵抗性を抑制することで、肥満抑制作用を発揮することが示唆された。

Cacao liquor procyanidin, UCP, Anti-obesity

講演番号：3C26a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ C校舎26会場

黒大豆成分の血糖値上昇抑制作用とその作用機構の解明

Dietary black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia

○栗本 雄太、滝川 雅仁、柴山 勇樹、曽我実、山下陽子[1]、芦田均[1]、津田 孝範（中部大・応生、[1]神戸大院・農）

○Yuta Kurimoto, Masahito Takikawa, Yuki Shibayama, Minoru Soga, Yoko Yamashita[1], Hitoshi Ashida[1], Takanori Tsuda (Chubu Univ. [1]Kobe Univ.)

【目的】黒大豆はアントシアニンであるシアニジン 3-グルコシド（C3G）以外にも、プロシアニジンを含む。我々はすでに黒大豆種皮抽出物の摂取は、高脂肪食摂取マウスにおいて体脂肪蓄積抑制と耐糖能を改善することを報告している(1)。本研究では、これまでの研究を踏まえて糖尿病抑制作用とその機構を明らかにすることを目的とした。

【方法１】ラット由来筋芽細胞株L6を定法により筋管細胞に分化誘導し、各種黒大豆成分をAMPキナーゼ（AMPK）の活性化と細胞内への糖取り込み、Glucose transporter4（Glut4）の細胞膜移行の点から検討した。
【方法２】動物個体での検討として、2型糖尿病モデルマウス（KK-A^y）にコントロール食あるいは黒大豆種皮抽出物を添加し6週間自由摂食させた。飼育期間中の随時血糖値を測定し、飼育終了後、組織を採取し、関連分子を解析した。

【結果】筋管細胞において黒大豆成分はAMPKを活性化させ、細胞内グルコースの取り込みとGlut 4の細胞膜移行を有意に上昇させた。動物個体において、黒大豆種皮抽出物の摂取は血糖値の上昇を有意に抑制した。現在、血糖値上昇の抑制に関わる成分としてプロシアニジンの関与の可能性など、さらに詳細な解析を進めている。

（１） *J. Agric. Food Chem.* 59: 8985-93 (2011).

black soybean, diabetes, anthocyanin

講演番号：3C26a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ C校舎26会場

レスベラトロール誘導体の抗肥満作用

Antiobesity Action of Resveratrol Derivative

○鶴田 はねみ、土井 聡[1]、來住 明宣[1]、松川 泰治[1]、茶山 和敏（静岡大・農、[1]UHA味覚糖・開発）
○ Hanemi Tsuruta, Satoshi Doi[1], Akinobu Kishi[1], Taiji Matsukawa[1], Kazutoshi Sayama (Shizuoka Univ., [1]UHA Mikakuto)

【目的】レスベラトロールは、抗酸化、脂肪蓄積抑制、動脈硬化症抑制などの多くの生理学的機能性を有することが知られている。我々は、より強い生理活性を持つレスベラトロール誘導体を開発することを目的として、数種のレスベラトロール誘導体を作成し、脂肪細胞株を用いて、それらの*In Vitro*での脂肪蓄積抑制を調べた。その結果、検討した誘導体のひとつに強い脂肪蓄積抑制作用を見出した。そこで、本研究では、脂肪蓄積抑制作用が見られたレスベラトロール誘導体をマウスに投与し、*In Vivo*での脂肪蓄積抑制作用について検討を行った。

【方法】 ９週齢のC57BL/6Jマウスを、コントロール群（AIN-76投与群)、高脂肪食群（AIN-76＋脂肪およびコレステロール)、高脂肪食＋0.4％レスベラトロール投与群（以下、Res群と略す)、高脂肪食＋0.4％レスベラトロール誘導体投与群（以下、RD群と略す)、の４群に分けて、各飼料を６週間投与した。投与期間中、１週間ごとに体重および摂食量を測定し、投与終了後、各マウスの各種臓器および腹腔内脂肪重量を測定・比較した。

【結果および考察】 各飼料を６週間投与した結果、RD投与群の体重は他の群と比較して有意な増加抑制が見られた。また、腹腔内脂肪重量はRD投与群で最も低く、強い脂肪蓄積抑制作用が認められた。さらに、肝臓重量もRD投与によって抑制された。一方、摂食量は、最初の１週間はRes群とRD群で抑制が見られ、RD群ではその後も約10％摂食量が低下していた。
以上の結果から、レスベラトロール誘導体は、レスベラトロールよりも強い脂肪蓄積抑制作用を有することが判明した。また、その抑制には摂食抑制も関与している可能性が示唆された。
現在、血中および肝臓中脂質量、血中アディポカイン量などを分析・比較するとともに、0.2％RD投与実験も行っており、それらの結果については本学会の発表の際に報告を行う予定である。

Resveratrol derivative, Antiobesity, Mice

講演番号：3C26a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎26会場

キサントフモール高含有ホップ抽出物のOLETFラットに対する肥満抑制作用および機序の解明

Xanthohumol high containing extracts from hop prevent obesity in OLETF rats

○由井一希、清藤文音、松薗飛鳥、池田さと美、森永真央、長田恭一（明治大・農・農化）
○Kazuki Yui, Ayane Kiyofuji, Asuka Matsusono, Satomi Ikeda, Mao Morinaga, Kyoichi Osada (Meijidai)

【目的】ホップ特有のポリフェノールであるキサントフモールはプレニル基を有するカルコンであり、エストロゲン作用や抗菌作用など数多くの生理作用が報告されている。しかし、肥満抑制を含む脂質代謝に与える影響についての報告はない。そこで本研究では、肥満発症モデルのOLETFラットにキサントフモール高含有ホップ抽出物(X)を摂取させることで、過食に伴う肥満発症に与える影響を検証した。
【方法】4週齢の雄OLETFラット及び対照群として非肥満モデルのLETOラット(NC群)を6日間予備飼育した後に、油脂源としてラード2%とコーン油5%を含むAIN93純化飼料にX(X群)を1%添加(対照は無添加=C群)した飼料をOLETFラット間(C群およびX群)のペアフィーディング条件で与えた。飼育76日目に飽食状態でエーテル麻酔を施して腹部大動脈より採血死させ、白色脂肪組織重量、脂質代謝パラメーターを測定した。
【結果】C群と比べてX群で最終体重が低くなる傾向が得られた(p=0.0841)。また、C群と比べてX群で腸間膜白色脂肪組織重量が有意に低くなり、内臓脂肪総重量は低くなる傾向にあった(p=0.0636)。血漿トリグリセリドおよび遊離脂肪酸の各レベルはC群と比べてX群で有意に低くなり、血漿総コレステロールレベルは低くなる傾向にあった(p=0.085)。また、肝臓総コレステロールレベルはC群と比べてX群で有意に低くなり、肝臓トリグリセリドレベルは有意な差ではないが低くなった。肝臓における脂肪酸合成系酵素であるFAS、G6PDHの各酵素活性はC群と比べてX群で有意に低くなり、ME活性も低くなる傾向にあった(p=0.0937)。しかし、脂肪酸酸化系酵素であるACOXおよびCPT2の各活性に変化はなかった。飼育70日目に回収した糞の、乾燥重量はC群と比べてX群で有意に高くなった。更に糞中の総脂質排泄量は、C群と比べてX群で有意に高くなった。
　以上の結果から、Xの摂取により過食に伴う肥満の発症を抑制できることが明らかとなった。その機序としては、摂取されたXが腸管内での脂質吸収を阻害することで糞中への排泄を促進させる事に加えて、Xに含まれるキサントフモールが吸収され、その代謝産物が肝臓の脂肪酸合成に影響を与え、脂質合成を抑制していることが一因であると考えられる。加えて現在、キサントフモールの脂肪細胞の分化誘導に与える影響について3T3L1細胞を用いた実験により検証中である。

xanthohumol, obesity, oletf rats

講演番号:3C26a08
講演日時、会場:3月24日10:27～ C校舎26会場

ホップ搾りかす抽出物の血糖値上昇抑制作用に関する研究

Study on the preventive effect of elevated blood glucose level by dietary hop pomace extract

○植松 大樹、堀井 大輔、日野原 顯、長田 恭一(明治大 農・農化)
○Hiroki Uematsu Daisuke Horii Ken Hinohara Kyoichi Osada(Meijidai)

【目的】以前の研究で、ホップ搾りかす抽出物(HPE)を摂取させることでOLETFラットの糖尿病発症が遅延することを明らかにした。本研究では、ストレプトゾトシン(STZ)投与で糖尿病を誘発したラットに対するHPE投与の効果、また、in vitroで糖質分解酵素に対する阻害作用や反転腸管法を用いた糖質吸収阻害作用の検証を行い、HPEがどのように糖質の吸収や代謝に作用して糖尿病の病態進行に影響を与えるかを種々検討した。
【方法】6週齢のWister系雄ラットに65mg/kg B.W.のSTZを腹腔内投与して糖尿病を誘発させた。STZ非投与の正常ラットをNC群、糖尿病発症ラットをC群、糖尿病発症ラットに1%のHPEを添加したAIN93純化食を与えたラットをH群として15日間飼育した。飼育期間中は定期的に体重を測定し、飼育終了後エーテル麻酔を施して腹部動脈より採血死させ、糖尿病に関わるパラメータを測定した。次に、in vitroで種々の糖質分解酵素に各々の基質とHPEを加えて反応させた後、酵素作用によって分解され生じたグルコース濃度を測定することで、HPEによる酵素活性の阻害作用を調べた。さらに、体重200g前後のWister系雄ラットを24時間絶食させた後、腸管を摘出して反転腸を作製した。外液として10mmol/mlのグルコースと10mg/mlのHPEを添加し、37℃で1時間インキュベートした後、反転腸内液のグルコース濃度を測定して、グルコース吸収に与える作用を解析した。
【結果】空腹時血糖値と血漿インスリンレベルを測定した結果、C群と比べて、H群では血糖値の上昇とインスリンレベルの低下が抑えられた。つまり、STZ投与で誘発された糖尿病の病態進行がHPEの摂取によって遅延したものと考えられる。また、HPEはin vitrdにおいてα-アミラーゼ、スクラーゼ、マルターゼ、イソマルターゼといった糖質分解酵素の活性を強く阻害した。さらに、糖質吸収阻害試験を行った結果、HPEは腸管におけるグルコースの吸収を阻害した。以上の結果から、HPEを摂取することで、空腹時血糖値およびインスリンレベルが改善され、糖尿病の病態進行が遅延することが確認できた。このHPEの作用は、主に腸管内における糖質消化酵素活性の阻害とグルコース吸収の阻害によるものであると考えられる。

hop, diabetes, rat

講演番号：3C26a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎26会場

ハスカップ抽出物による抗糖尿病効果の解明

Elucidation of antidiabetic effect by dietary haskap extracts in rats.

○堀井 大輔、植松 大樹、日野原 顯、由井 一希、長田 恭一（明治大・農・農化）
○Daisuke Horii, Hiroki Uematsu, Ken Hinohara, Kazuki Yui, Kyoichi Osada(Meijidai)

【目的】ハスカップ抽出物（HK）が抗糖尿病作用を発現するかどうか高脂肪食を摂取させた動物実験で種々検討し、かつ作用の機序についても検証した。
【方法】Exp1. 4 週齢の Wister 系雄ラットに、コーン油 10%、ラード 5%とコレステロール 0.5%を含む（コレステロール無添加＝NC 群）AIN76 純化飼料に HK（HK 群）を 1%添加（対照群として無添加＝C 群）した飼料をペアフィーディング条件で与えた。飼育 71 目に絶食せずにエーテル麻酔を施して腹部動脈より採血死させ、白色脂肪組織重量、糖尿病に関わるパラメータを測定した。Exp2. 8 週齢の Wister 系雄ラットに糖質源として可溶性デンプン 500mg（もしくはグルコース 500mg）（無添加＝NC 群）と HK 300mg（HK 群）（対照は無添加＝C 群）を添加したものを胃内に強制投与した。投与後 30、60、120、180、300 分後に尾静脈より血液を採取して血糖値を測定した。
Exp3. 消化酵素であるα−アミラーゼ、マルターゼ、スクラーゼ、イソマルターゼにそれぞれの基質と HK を加えて反応させ、酵素活性の阻害作用を確かめた。
【結果】Exp1. C群と比べてHK群で腸間膜白色脂肪組織重量は有意に低くなった。血糖値はC群と比べてHK群は有意に低くなり、空腹時血糖値もC群と比べてHK群は低くなる傾向にあった。また、HbA1cレベルはC群と比べHK群は有意に低くなった。Exp2. 可溶性デンプンを強制投与したところ、60分後の血糖値はC群と比べてHK群は有意に低くなった。また、グルコース強制投与試験でも30、60分後の血糖値はC群と比べてHK群は低くなる傾向にあった。Exp3. 各消化酵素に対してHKは反応に添加した濃度に依存して酵素活性が阻害される傾向にあった。以上の結果から、HKの摂取により高脂肪食摂取に伴う糖尿病発症を予防できるのではないかと考えられた。血糖値上昇抑制作用の機序は摂取したHKが腸管内で糖質の消化酵素を阻害したことが主たる要因ではないかと考えられる。

haskap, diabetes, rat

講演番号：3C26a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ C校舎26会場

タイトル　本わさび粉末混合食摂取による糖尿病態緩和効果

Title　Anti-diabetic effects of wasabi in type 2 diabetic KK-A^y mice.

○渡部　達也、小野　弥奈、伊藤　芳明、長澤　孝志（岩手大院・応生化）

○Tatsuya Watanabe, Mina Ono, Yoshiaki Ito, Takashi Nagasawa (Graduate School of Agriculture , Iwate Univ.)

【目的】我々はこれまでに、本わさびに含まれる成分の１つである6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate (6MSITC)が肥満/糖尿病マウスにおいて、血糖値や血中HbA1cレベルの上昇を抑制するなどの糖尿病態改善効果をもたらすことを見出した。しかしながら、これまでの結果は6MSITC単独での検討結果であり、わさびそのものでの効果やわさびそのものを利用する上での問題については評価されていない。本研究では、食品で利用した場合の評価のために、本わさび粉末が糖尿病態に及ぼす効果について検討した。

【方法】

実験1：肥満2型糖尿病モデルKK-A^yマウス（4週齢）を3群に分け、高脂肪食、わさび粉末（本わさびひげ根粉末、岩手県雫石町産）を高脂肪食に3%あるいは5%添加したわさび粉末混合高脂肪食を45日間自由摂食させた。

実験2：わさびの添加量を増やすために、入手が容易な本わさび根茎（岩手県遠野市産）からわさび凍結乾燥粉末を調製した。これを加水・加温することで内在するミロシナーゼ活性によりイソチオシアネート類を生成させ、再度凍結乾燥することにより、揮発性の高い辛味成分のアリルイソチオシアネートを除去した粉末を調製した。この粉末を高脂肪食に7%添加した7%わさび粉末混合高脂肪食をKK-A^yマウスに7日間与え、わさび混合食に馴化後、わさび粉末添加量を10%とし、さらに40日間自由摂食させた。それぞれの実験で、空腹時血糖値の測定と血液、各組織の採取を行い糖尿病態への効果を評価した。

【結果】実験1では、3、5%のわさび添加量に応じて血糖値の上昇を抑制したが、5%わさび混合食群では摂食量も有意に低下していた。したがって、病態の緩和効果が摂食量の低下によるものである可能性とわさびの成分による効果である可能性とが考えられた。そこで実験2では、実験1での摂食量低下の要因となっていると推察される辛味成分を低減した粉末を用いて検討したが、摂食量に大きな影響を与えず、血糖値の上昇を抑制する効果が見られた。また、血中インスリン濃度の減少からインスリン感受性が改善している可能性が考えられた。尿については尿糖値は減少しなかったが、尿量は減少した。さらに肝臓中のコレステロール量が減少したことから、わさび粉末の摂取が組織の脂肪蓄積に影響を与えていることが示唆された。以上から、わさび粉末そのものでも糖尿病態の改善効果を示すことがわかった。

diabetes, wasabi, isothiocyanate

講演番号:3C26a11
講演日時、会場:3月24日11:10～ C校舎26会場

コーヒー摂取による糖尿病抑制作用とその機序解明

Mechanism for anti-diabetes effects of coffee intake

○曽我 実、滝川 雅仁、小谷 健人、中根康貴、安田龍司、津田 孝範（中部大・応生）
○Minoru Soga, Masahito Takikawa, Kento Kotani, Yasutaka Nakane, Ryuji Yasuda, Takanori Tsuda (Chubu Univ.)

【目的】コーヒー摂取は2型糖尿病のリスクを低下させることが報告されている。本研究では、コーヒー摂取による糖尿病予防・抑制作用とその機序の解明を目的とし、エネルギー代謝に関わるAMPキナーゼ（AMPK）の活性化とインスリンシグナルの2点から検討した。

【方法1】マウス由来筋芽細胞C2C12を定法によって筋管細胞へ分化誘導し、これを骨格筋モデルとして各種コーヒー成分によるAMPKの活性化について検討した。
【方法2】4週齢の雄性KK-A^yマウスを2群に分け、水（対照群）あるいはインスタントコーヒー水溶液（コーヒー群）を6週間自由飲水させた。飼育期間中の血糖値を測定し、飼育終了時に対照群とコーヒー群へインスリンを投与した後、各組織を採取し、関連分子を解析した。

【結果】コーヒー成分のうちクロロゲン酸はAMPKを活性化した。クロロゲン酸のAMPKの活性化はカフェインとの共存下では、相乗的に上昇することが明らかになった。2型糖尿病モデルマウスにおいてコーヒー群では対照群と比較して、これまでの報告と同様に有意な血糖値の上昇抑制が認められた。しかしながらコーヒーの摂取によるAMPKの活性化や骨格筋におけるGlucose transporter4の膜移行に有意な差は認められなかった。一方、コーヒーの摂取群の肝臓においては、肝臓においてインスリンシグナルに関わるタンパク質のTyrリン酸化を有意に上昇させた。現在さらに詳細な解析を進めている。

coffee, diabetes, insulin signal

講演番号：3C26a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ C校舎26会場

マウス動脈硬化症発症に対するアスタキサンチンの効果

Effect of Astaxanthin on the development of atherosclerosis in mice

○渡邉 晴香、山下 栄次[1]、茶山 和敏（静岡大・院・農、[1]富士化学工業・リテール事業部）
○Haruka Watanabe, Eiji Yamashita[1], Kazutoshi Sayama (Shizuoka Univ., [1]Fuji Chem. Indus. Co.)

【目的】 カロテノイドの一種で水産生物に多く含まれるアスタキサンチンは強い抗酸化作用を有することが知られている。これまでの*In Vitro*での研究結果から、アスタキサンチンは動脈硬化症発症を抑制する可能性が示唆されている。しかし、その直接的な抑制作用については検討されていなかった。そこで、本研究では、動脈硬化症モデルマウスにアスタキサンチンを投与し、アスタキサンチンの動脈硬化症発症抑制作用を調べた。

【方法】 動脈硬化症モデルマウスである C57BL/6.KOR/StmSlc-*Apoe*^{sh1} マウス（４週齢、メス）に、0.015%または 0.06%アスタキサンチン混合飼料を 12 週間投与した。投与実験終了後、大動脈を切除し、オイルレッドで脂質染色後、大動脈中の動脈硬化部位の数および面積を分析した。また、各マウスの血中および肝臓脂質量、血中過酸化脂質および TNF-α 量を分析した。

【結果】 アスタキサンチン混合飼料を 12 週間投与した結果、発症開始の指標である動脈硬化部位の数はアスタキサンチン投与による変化が見られなかったが、悪性進展の指標である動脈硬化部位の面積は 0.06%アスタキサンチン混合飼料の投与によって有意に減少した。一方、アスタキサンチンの投与によって、体重や血中および肝臓中の脂質量にはコントロール群と差が見られなかったが、血中過酸化脂質量は 0.015%アスタキサンチン投与によって有意に減少し、0.06%アスタキサンチン投与では逆に増加していた。また、血中 TNF-α 量を調べた結果、0.06%アスタキサンチン投与によって有意に低下することが判明した。

以上の結果から、アスタキサンチン投与は動脈硬化症の悪性進展抑制作用を有することが明らかになった。また、その抑制には血中 TNF-α 産生抑制が関与している可能性が考えられた。

Astaxanthin, atherosclerosis, mice

講演番号：3C26a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ C校舎26会場

高コレステロール食給餌マウスへの杜仲葉熱水抽出液投与の効果

Effect of the administration of hot water extract of *Eucommia ulmoides* (Tochu) leaves in mice fed a high-cholesterol diet

○荒木 真由美[1]、宮澤 真紀[2]、瀬戸山 央[1]、廣川 隆彦[1]、青木 信義[1]、安間 智慧子[3]、小林 征洋[4]、亀井 飛鳥[5]、阿部 啓子[5,6]（神奈川県産技セ、[1]神奈川県衛研、[2](有)碧山園、[3]東京海洋大院・海洋科学・食品流通、[4]神奈川科学技術アカデミー、[5]東大院・農生科・応生化）

○Mayumi Araki[1], Maki Miyazawa[2], Ou Setoyama[1], Takahiko Hirokawa[1], Nobuyoshi Aoki, Chieko Yasuma[3], Yukihiro Kobayashi[4], Asuka Kamei[5], Keiko Abe[5,6] ([1]Kanagawa Industrial Technology Center, [2]Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, [3]Hekizanen Co.,Ltd., [4]Tokyo Univ. of Marine Science and Technology, [5]KAST, [6]Univ. of Tokyo)

【目的】杜仲（トチュウ、*Eucommia ulmoides*）の樹皮は古くから生薬として利用されてきた。近年、日本ではその葉を焙煎した健康茶が知られるようになったが、その効能や安全性は完全には解明されていない。これまでに我々は高脂肪食および高フルクトース水給餌ラットにおける血中トリグリセリドの上昇が、杜仲葉熱水抽出液の摂取によって有意に抑制されることを確認した。今回、高コレステロール食給餌マウスへの杜仲葉熱水抽出液の投与実験を行い、その影響を評価した。

【方法】杜仲生葉を30分煮出して、水に対する杜仲葉湿重量が4g/L、20g/Lになるように杜仲葉熱水抽出液を調製した。4週齢の雄性C57BL/6NCrSlcマウスを普通食（CE-2）と水で2週間予備飼育後、12匹ずつコントロール群、杜仲4g/L投与群、杜仲20g/L投与群の3群に分けた。全群に2%コレステロール、1%コール酸を含む高コレステロール食を4週間自由摂取させた。コントロール群には水を、杜仲4g/L投与群、杜仲20g/L投与群には各杜仲葉抽出液を自由摂取させた。投与期間終了後に血液、胆汁、肝臓を採取し、脂質濃度および肝機能評価項目について検査を行った。

【結果】投与期間中の群間の摂餌量、摂水量に有意な差はなかった。また、投与期間終了時の体重、肝臓重量、体重当たりの肝臓重量に有意な差はなかった。肝臓中総コレステロール濃度は、コントロール群に比べ杜仲投与群では値が低い傾向で、杜仲20g/L投与群では有意に抑制されていた。胆汁中総コレステロール濃度は、コントロール群に比べ杜仲投与群では値が高い傾向だった。血漿中のAST（GOT）活性、ALT（GPT）活性、ALP活性、LDH活性、総ビリルビン濃度、直接ビリルビン濃度、トリグリセリド濃度、総コレステロール濃度はいずれもコントロール群に比べ杜仲4g/L投与群では値が低い傾向だった。杜仲20g/L投与群はALP活性とトリグリセリド濃度についてはコントロール群に比べ値が低い傾向だったが、その他の項目はコントロール群と同等であった。

Eucommia ulmoides, Tochu, High-cholesterol diet

講演番号：3C26a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ C校舎26会場

UV長期間暴露マウスに対する燕窩抽出物投与の皮膚老化予防効果

Anti-skin-aging effect of edible bird’s nest extract in UV-induced skin damaged mice.

○松川典子、塚原隆充、中山啓三、武川和琴[1]（栄養・病理学研究所、[1]コンビ）
○Noriko Matsukawa, Takamitsu Tsukahara, Keizo Nakayama, Wakoto Bukawa[1]（iNP, [1]Combi）

【目的】中国の伝承食品である燕窩は，シアル酸を含む糖タンパク質のムチンを主成分とし，インフルエンザウイルスの感染抑制作用やEpidermal Growth Factor様作用など様々な効果を持つことが報告されている。酵素処理燕窩（コロカリア）は，酵素処理によってタンパク質を分解し，燕窩の主要成分であるムチンを糖ペプチド化することで，不溶性の燕窩を可溶化し利用性を高めた燕窩抽出物である。我々は既報で，酵素処理燕窩が骨粗鬆症モデルラットで骨強度を改善することを報告した。そのメカニズムとして，コラーゲンの主成分であるヒドロキシプロリン量が骨中で改善されることが示唆された。そのため本研究では，酵素処理燕窩の皮膚に対する効果を調べるため，ヘアレスマウスに紫外線を長期間曝露して，皮膚老化現象を実験的に再現したマウスを用いて酵素処理燕窩投与によるしわ及びたるみへの予防効果について検討した。
【方法】5週齢のHR-1/Hos系雌マウスをUV照射無投与対照群，UV照射酵素処理燕窩低用量投与群（10 mg/kg/day投与），UV照射酵素処理燕窩高用量投与群（100 mg/kg/day投与），UV非照射無投与対照群の4群に分け，UV照射群各7匹，UV非照射群4匹とした。導入時から基礎飼料を自由摂取させ，また同時に被験物質投与も開始した。1週間馴化した後，隔日でUVA波（20 J/cm^2）を180分間，UVB波（40 mJ/cm^2）を4分間拘束ストレスをかけずに照射した。試験期間は10週間とした。試験期間中は背部皮膚の写真撮影及び水分測定を毎週1回実施した。試験開始後7週から皮膚弾力についても測定を行った。また，外観上の皮膚状態を頸部のたるみ，背部のしわの形成状況に応じて4段階でスコア化した。試験期間終了時に剖検を行い，背部皮膚を採取しmRNAを測定し，被験物質投与の効果を評価した。
【結果・まとめ】皮膚水分量は試験開始後1週から，酵素処理燕窩投与によって改善した。皮膚の状態は，試験開始後7週以降顕著なしわ及びたるみの改善が用量依存的に認められた。また，試験開始後10週からは皮膚弾力の改善も用量依存的に認められた。コラーゲン合成因子であるcollagen alpha1 (I)及びcollagen alpha1 (II)発現は，酵素処理燕窩投与によって用量依存的に高値を示した。一方でコラーゲン分解因子であるMMP-13発現は，酵素処理燕窩投与によって用量依存的に低値を示した。よって，コラーゲン合成因子をコラーゲン分解因子で除した所，酵素処理燕窩投与によって用量依存的に高値を示した。以上の結果から，酵素処理燕窩投与初期から紫外線照射による皮膚水分量の低下を軽減できる可能性が示唆された。その後，酵素処理燕窩投与開始後8週からしわ及びたるみ形成の予防効果が認められ，酵素処理燕窩投与開始後10週からは皮膚弾力の改善も認められた。また，剖検時のコラーゲン合成因子，コラーゲン分解因子，皮膚膠原線維層厚などの数値から酵素処理燕窩投与によってコラーゲン合成系に関与し，その結果しわ及びたるみ形成を予防できることが考えられた。

Collagen, edible bird’s nest extract, skin aging

講演番号：3C26a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ C校舎26会場

アミノ酸摂取によるキヌレン酸産生を介したドーパミン放出の調節

Dietary manipulation of dopamine release via kynurenic acid production by amino acid intake

○福渡 努[1]、奥野 海良人[1,2]、佐野 光枝[1]、柴田 克己[1]（[1]滋賀県大・人間文化、[2]国立長寿医療研究セ・RI管理室）

○Tsutomu Fukuwatari, Alato Okuno, Mitsue Sano, Katsumi Shibata ([1]Univ. of Shiga Pref., [2]NCGG)

【目的】トリプトファン代謝産物キヌレン酸は、α7ニコチン性アセチルコリン受容体（α7nChAR）を介して、生理的濃度でシナプスからのドーパミン放出を抑制する。本研究では、キヌレン酸前駆体であるトリプトファン、キヌレン酸合成を阻害する2-アミノアジピン酸の前駆体であるリジンの摂取が、脳内のキヌレン酸産生およびドーパミン放出におよぼす影響について検討した。
【方法】20%カゼイン食にトリプトファンを1.5%添加した食餌を8週齢Wistar系雄ラットに1日間与え、マイクロダイアリシス法によって線条体から細胞外液を回収した。細胞外液中のキヌレン酸およびドーパミン濃度を測定した。また、リジン添加量が0%（対照）、1%、2%、3%となる1.5%トリプトファン添加20%カゼイン食を8週齢のWistar系雄ラットに与え、7日間飼育した。線条体におけるキヌレン酸、キヌレニン、ドーパミン、ドーパミン代謝産物の濃度を測定した。
【結果】1.5%トリプトファン添加食によって、線条体の細胞外キヌレン酸濃度は320%に増加し、細胞外ドーパミン濃度は60%に低下した。食餌へのトリプトファン添加量依存的に脳中キヌレン酸、脳、血清および肝臓のキヌレニン濃度が増加した。リジン添加食を与えた実験において、3%リジン食摂取ラットの線条体キヌレン酸濃度は、対照群の65%の低値を示した。キヌレン酸前駆体であるキヌレニンの濃度はリジン摂取の影響を受けなかった。線条体のドーパミン代謝産物(DOPAC+ホモバニリン酸)/ドーパミン比は、3%リジン食摂取によって対照食群の120%に増加した。以上より、トリプトファン添加食の摂取によって増加したキヌレニンが肝臓から血流を介して脳に取込まれ、産生したキヌレン酸がα7nChARを阻害することによってドーパミン放出を抑制したことが示唆された。また、ドーパミン代謝産物（DOPAC+ホモバニリン酸）/ドーパミン比の増加はドーパミン放出の増加を示唆することから、リジン添加食の摂取はシナプスからのドーパミン放出を促進することが示唆された。その機構として、次の可能性が考えられた。すなわち、リジン摂取による脳内2-アミノアジピン酸濃度の増加、2-アミノアジピン酸によるキヌレン酸合成の競合阻害、細胞外キヌレン酸濃度の低下によるニューロンのα7nChARの活性化、活性化したα7nChARによるシナプスからのドーパミン放出の促進、というものである。

Tryptophan, Brain, Dopamine

講演番号：3C26p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ C校舎26会場

大豆の脂質代謝調節機能におけるタンパク質および脂質成分の役割

The roles of protein and lipid components in soybean on regulating lipid metabolism

○高橋 陽子、八巻 幸二（農研機構・食総研）
○Yoko Takahashi, Kohji Yamaki (National Food Research Institute, NARO)

【目的】大豆には脂質代謝に関与する多くの成分が含まれていることが知られている。そのうち大豆タンパク質には、肝臓での脂肪酸合成を抑制しコレステロール代謝を改善する作用があり、油脂成分中の不飽和脂肪酸には、遺伝子発現レベルで血中脂質濃度を低下させる作用がある。これらは、各成分を単独摂取したときの作用として報告されているが、大豆として摂取する場合は他の大豆成分との共存により、成分単独の作用とは異なる可能性がある。そこで、大豆中のタンパク質および脂質成分の脂質代謝改善機能を明確にするための研究を実施した。
【方法】雄のSDラットを用い、2組の試験で食餌の影響を検討した。実験1（タンパク質源の影響）：タンパク質源（20%）をカゼイン、分離大豆タンパク質、または大豆粉とし、脂質源は各群とも大豆油10%とした。実験2（脂質源の影響）：脂質源（10%）をパーム油、大豆油、または大豆粉とし、タンパク質源は各群とも大豆タンパク質20%とした。いずれも飼育期間は3週間とした。
【結果】両実験とも、飼育終了後の体重増加量、白色脂肪組織および肝臓重量に群間の差はなかった。血清中性脂肪濃度は、有意差は見られなかったが、大豆タンパク質および大豆油食でいずれもカゼインおよびパーム油と比べて30%以上低下し、大豆粉摂取でも低下する傾向を示した。肝臓中性脂肪濃度は、大豆タンパク質および大豆油摂取による変化がなかったが、大豆粉摂取によって低下する傾向が見られた。肝臓の脂肪酸合成系酵素の活性と遺伝子発現量は、カゼインと比べて大豆タンパク質で有意に低下し、大豆粉も摂取量依存的にこれらの活性を低下させた（実験1）。大豆油もパーム油と比べ脂肪酸合成系酵素系を抑制したが、大豆粉は摂取量にかかわらず抑制作用を示した（実験2）。大豆のタンパク質と油脂成分は、いずれも肝臓の脂肪酸合成系の抑制作用により血清や肝臓の中性脂肪濃度を低下させると考えられるが、摂取量と作用の大きさの関係には違いがあることが示唆された。血清総コレステロール濃度は、大豆タンパク質および大豆粉摂取によりカゼインと比べて有意に低下し、HDL-コレステロールも同様に低下した（実験1）。大豆油もパーム油と比べて血清総コレステロール濃度を低下させたが、HDL-コレステロールの低下は見られず、大豆粉摂取群でも同じ変化を示したことから（実験2）、大豆のタンパク質成分と油脂成分で血清コレステロール濃度低下メカニズムに違いがあると考えられた。また、糞中の胆汁酸量は大豆摂取により増加したが、大豆タンパク質と大豆油による増加は見られなかった。

soybean, lipid metabolism

講演番号:3C26p03
講演日時、会場:3月24日14:11～ C校舎26会場

大豆タンパク質が食後糖吸収とインスリン分泌に及ぼす影響

Effect of dietary soy protein on glucose absorption and insulin secretion in rats.

○高梨　浩之、向後　雄一郎、竹中　麻子(明治大農・農化)
○Hiroyuki Takanashi, Yuichiro Kougo, Asako Takenaka (Department of Agricultural Chemistry, School of Agriculture, Meiji University)

【目的】大豆タンパク質をラットに摂取させると、食後インスリン分泌は対照（カゼイン食）群と比較して低下するが、血糖値は上昇しないことを我々はこれまでに報告してきた。本研究ではこのメカニズムの解明を目的として、大豆タンパク質のインスリン分泌の低下作用が糖吸収の阻害・遅延によって引き起こされる可能性を検討した。
【方法】①大豆タンパク質が食餌から血中へのグルコース吸収に及ぼす影響を解析するため、インスリン分泌を抑制したラットを用いて実験食摂取後の血中グルコース濃度を測定した。ラット（5週齢のWistar系）にストレプトゾトシン（STZ;60mg/kgbw)を腹腔内投与した後、２群に分け、20%カゼイン食(CAS食)と20%分離大豆タンパク質食(SPI食)をそれぞれ1日8時間の制限給餌で与えて飼育した。実験食開始1、3、5日目の摂食開始から0、1、2、8時間後に採血し、インスリン、グルコース濃度を測定した。②体内消化をin vitroで再現したGR法を用いて、CAS食とSPI食の糖消化性の測定を行った。CAS食、SPI食、マルトース（対照）の3種類の試料をin vitroで消化し、遊離したグルコース濃度を測定した。消化20分のグルコース濃度を消化16時間以上のグルコース濃度で除し、GR（グルコース遊離率）値を算出した。③糖源をオリゴ糖や二糖類とした場合に、大豆タンパク質によるインスリン分泌低下作用が見られるかどうかを検討した。ラット（5週齢のWistar系）を2群に分け、糖源をマルトース・デキストリンにした20%カゼイン食(CASM食)と分離大豆タンパク質食(SPIM食)をそれぞれ与え、1日8時間の制限給餌により飼育した。摂食開始0、1、2、8時間後に採血し、インスリン、グルコース濃度を測定した。
【結果】①STZ投与により血中のインスリン濃度は検出限界近くまで低下した。血中のグルコース濃度はCAS食群とSPI食群で有意な差はなかった。この結果から、SPIに糖吸収阻害活性はないと考えられた。②GR法の結果、CAS食に比べSPI食でグルコース遊離率の有意な減少は見られなかった。③食後血中インスリン濃度はCASM食群と比べSPIM食群で低下した。②、③の結果から、SPIにアミラーゼ阻害活性作用はないと考えられた。
【結論】大豆タンパク質摂取時の食後血中インスリン濃度の低下は、アミラーゼ活性阻害による糖吸収抑制とは異なる機構で生じることが示された。

Soyprotein, Insulin, Glucose

講演番号：3C26p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎26会場

大豆ペプチドおよび大豆のアミノ酸組成が食後インスリン分泌に及ぼす影響

The effect of Soy Peptides and Amino Acid Profile of Soy Protein on Postprandial Insulin Secretion

○堀内真美、向後雄一郎、高梨浩之、竹中麻子（明治大農・農化）
○Mami Horiuchi, Yuichiro Kougo, Hiroyuki Takanashi, Asako Takenaka (Department of Agricultural Chemistry, School of Agriculture, Meiji University)

【目的】我々はこれまでに、分離大豆タンパク質（SPI）を窒素源とする飼料を摂取するとラットの食後インスリン分泌低下がみられること、一方で大豆イソフラボンにはこのような作用がないことを報告してきた。この結果は、インスリン分泌低下は大豆タンパク質自身の作用であることを示していた。SPIの摂取が食後のインスリ分泌低下を引き起こす機構として、血中に吸収されるアミノ酸の特徴的なパターンがインスリン分泌を低下させる可能性が考えられた。そこで本研究では、SPI摂取時のインスリン分泌低下が、大豆ペプチドや大豆タンパク質と同様の組成のアミノ酸混合物でも生じるかどうかを検討した。
【方法】６週齢のWistar系雄ラットを20%カゼイン（CAS）食の１日８時間制限給餌に４日間順化させた後、次の２つの動物実験を行った。①ラットを３群に分け、20%CAS食、20%SPI食、20%大豆ペプチド（PEP;ハイニュートR）食をそれぞれ与えた。②ラットを４群に分け、20%CAS食、20%SPI食、20%カゼインアミノ酸混合（CASAA）食、20%大豆アミノ酸混合（SPIAA）食をそれぞれ与えた。実験①②ともに、摂食開始後０、0.5、１、２、８時間後にラットの尾静脈から採血を行い、血漿中のインスリン、グルコース、トリグリセリド（TG）濃度を測定した。２４時間の自由摂食の後、肝臓と血漿を採取してトリグリセリド、コレステロール、リン脂質、総脂質量を測定した。
【結果】実験①では、CAS群、SPI群、PEP群の食後血糖値の推移に差はみられなかった。食後の血漿インスリン濃度は、SPI群とPEP群でCAS群と比較して低かった。また、肝臓のトリグリセリド量は、CAS群と比べてSPI群で低下したが、PEP群での低下はSPI群より小さかった。大豆ペプチドにも、食後の血漿インスリン濃度を低下させる作用があることが示された。実験②では、CASAA群とSPIAA群の間で食後血糖値および血漿インスリン濃度に差はみられなかった。肝臓及び血漿の脂質量にもCASAA群とSPIAA群で差はみられなかった。大豆タンパク質を構成するアミノ酸の混合物には、食後インスリン濃度を低下させる作用がないことが示された。以上の結果より、大豆タンパク質摂取時に起こるインスリン分泌低下は、大豆タンパク質のアミノ酸組成の特徴によって生じるのではなく、ペプチド以上の構造によって生じることが示唆された。

Soy protein, Soy peptides, Insulin secretion

講演番号：3C26p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ C校舎26会場

低タンパク質食摂取によるインスリン分泌低下機構の解析

Mechanism of reduced insulin secretion in rats fed low protein diet.

○武田知也、尾崎依、伯野史彦[1]、高橋伸一郎[1]、竹中麻子（明治大農・農化、[1]東大院農生科・応動）

○Tomoya Takeda, Yori Ozaki, Fumihiko Hakuno[1], Shin-Ichiro Takahashi[1], Asako Takenaka (Dept. Agric. Chem., Sch. Agric., Meiji Univ., [1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】ラットに低タンパク質食を与えると、食後インスリン分泌が低下することが報告されている。我々は、インスリン分泌低下が低タンパク質食摂取開始直後から生じることを明らかにし、インスリン分泌は経口摂取するタンパク質量に応答する可能性を示した。本研究では、摂取タンパク質量の違いが摂食開始直後のインスリン分泌に及ぼす影響を詳細に検討すると共に、低タンパク質食摂取が膵臓インスリン量を変化させる可能性についても検討した。【方法】①摂取タンパク質量の違いによるインスリン分泌変化を、飼料の胃内投与により解析した。16時間絶食後の6週齢Wistar系雄ラットを2群に分け、20%カゼイン食(20C)または5%カゼイン食(5C)１g分をゾンデで胃内投与した。絶食時、投与30、60、120分後に採血を行い、インスリンとグルコースの血中濃度を測定した。また、この方法では胃内に投与できる飼料の絶対量が少なくなるため、ラットに１g分の飼料を経口摂取させ、同様にインスリンとグルコースの血中濃度を測定した。②種々の量のタンパク質あるいは糖をラットに経口摂取させてインスリンの血中濃度を測定した。9週齢のWistar系雄ラットを3群に分け、20%カゼイン食を通常摂取した場合と同量のタンパク質(6g)を与える群(20P)、5%カゼイン食と同量のタンパク質(1.5g)を与える群(5P)、糖25.7gを与える群(C)とした。8時間の制限給餌に順化させたラットにそれぞれの飼料を与え、絶食時、給餌30、60、120分後にインスリンの血中濃度を測定した。③低タンパク質食摂取時の膵臓中のインスリン濃度を測定した。6週齢のWistar系雄ラットを3群に分け、20Cあるいは5Cを与える群、STZで膵島を破壊し20%カゼイン食を与える群(STZ)とした。7日間給餌後に膵臓中のインスリン濃度を測定した。また、20Cあるいは5Cで6、10、22日間飼育したラットの膵臓のインスリン濃度を測定し、摂取タンパク質量の影響を経日的に解析した。【結果】①ゾンデ投与と経口摂取いずれの条件でも食後血中インスリン濃度、グルコース濃度は20C群と5C群で差はなく、摂食量が少ない場合、タンパク質量の違いはインスリン濃度に影響を与えなかった。②C群では糖による血中インスリン濃度上昇が見られたが、20P群、5P群ではタンパク質によるインスリン濃度上昇は見られなかった。タンパク質単独ではインスリン分泌促進活性がなく、糖によるインスリン分泌を増強するものと考えられた。③STZ群では膵臓中のインスリン濃度が大幅に減少したのに対し、20C群と5C群の間には差は見られなかった。また、20C群と5C群の膵臓インスリン濃度は6、10、22日のいずれの飼育日数でも差がなかった。膵臓中のインスリン量は低タンパク質食摂取によって減少しなかったことから、低タンパク質食はインスリン合成ではなくインスリン分泌を低下させることが示唆された。なお本研究の一部は、生研センターイノベーション創出事業の成果である。

Protein, Insulin, Pancreas

講演番号：3C26p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ C校舎26会場

低タンパク質食摂取ラットにおけるインスリン分泌の低下が肝臓のIGF-I合成抑制および中性脂質量増加に及ぼす影響

Effect of acute reduction of insulin secretion on decreased IGF-I expression and increased triglycerides in livers of protein malnourished rats

○尾崎依、武田知也、豊島由香[1]、時田玲子[1]、南史朗[1]、伯野史彦[2]、高橋伸一郎[2]、竹中麻子（明治大農・農化、[1]日医大老研・生体機能制御、[2]東大院農生科・応動）
○Yori Ozaki, Tomoya Takeda, Yuka Toyoshima[1], Reiko Tokita[1], Shiro Minami[1], Fumihiko Hakuno[2], Shin-Ichiro Takahashi[2], Asako Takenaka (Dept. Agric. Chem., Sch. Agric., Meiji Univ., [1]Inst. Gerontol., NMS, [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】成長期のラットに低タンパク質食を給餌すると，成長遅滞や肝臓中性脂質量の増加が生じる。我々は，このような動物でインスリン様成長因子（IGF）-Iの血中濃度と食後のインスリン分泌量が減少し，インスリン応答性が増加することを報告してきた。IGF-Iの主要産生臓器である肝臓では，低栄養やインスリンの低下によってIGF-Iの産生量が減少することが知られている。そこで本研究では，まず低タンパク質食摂取による血中IGF-I濃度の低下が遺伝子発現のレベルで生じることを確認した。また我々は，低タンパク質食給餌したラットでは短期間で食後のインスリン分泌が低下することを示しているため，血中インスリン濃度の低下が肝臓IGF-Iの産生抑制や肝臓中性脂質量の増加に果たす役割を検討した。
【方法】6週齢Wistar系雄ラットに低タンパク質（5%カゼイン; 5C）および対照（15%カゼイン; 15C）食を1日8時間制限給餌し，14日目まで経時的に肝臓を採取してIGF-I遺伝子のmRNA量を測定した。また，5C食を14日間給餌後に15C食に切り替えさらに14日間給餌した個体でも同様に経時的に解析した。次に，中間型のヒトインスリン製剤（ノボリンN, Novo Nordisk）を皮下注射したラットに5Cまたは15C食を8時間制限給餌した1日目に，肝臓および血液を採取し，IGF-I遺伝子のmRNA量，血中および肝臓トリグリセリド（TG）量などを調べた。
【結果】肝臓におけるIGF-I遺伝子のmRNA量はいずれの給餌期間においても15C群に比べ5C群で低かったが，5Cを15C食に切り替え後3日かかって回復した。一方，5C食摂取1日目のラットにインスリンを投与し血中濃度の減少を補ったが，肝臓IGF-I遺伝子のmRNA量の低下を抑制できなかった。また，インスリン投与により，5C群，15C群いずれの肝臓TG量も増加していた。これらの結果より，低タンパク質食摂取時の血中IGF-I濃度の急速な低下は，遺伝子発現のレベルで制御されるが，血中インスリン濃度の低下が主要因でなく，低栄養に対する応答であることが示唆された。また，インスリン作用の増大が1日で肝臓TG量を増加させることが明らかになり，肝臓におけるインスリンシグナルの増強が中性脂質の蓄積を引き起こす可能性を示した。
なお本研究の一部は，生研センターイノベーション創出事業の成果である。

protein malnutrition, insulin, insulin-like growth factor (IGF)-I

講演番号：3C26p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎26会場

アミノ酸欠乏やインスリン欠乏が培養肝細胞のインスリン様成長因子システムおよびインスリン応答性に及ぼす影響の解析

Effects of amino acids and insulin deprivation on insulin-like growth factor system and insulin responsivity in cultured hepatocytes

○赤西 成美、伯野史彦、千田和広、[1]加藤久典、[2]豊島 由香、[3]竹中麻子、高橋伸一郎（東大・院農生科、[1]東大・総括プロジェクト機構、[2]日本医大・老研、[3]明治大・農）
○Narumi Akanishi, Fumihiko Hakuno, Kazuhiro Chida, [1]Hisanori Kato, [2]Yuka Toyoshima, [3]Asako Takenaka, Shin-Ichiro Takahashi (Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [1]Org. Interdisciplinary Res. Proj., Univ. Tokyo, [2]Inst. Gerontology, Nippon Medical School, [3]Sch. Agric., Meiji Univ.)

【目的】成長期の動物において、摂取タンパク量が不足し、タンパク質栄養状態が悪化すると、血中ではインスリン様成長因子（IGF）-I濃度が低下、IGF-Iをクリアランスするigf結合タンパク質（IGFBP）-Iが増加し、成長が遅滞することを、我々は報告してきた。同時に、血中インスリン濃度も低下し、肝臓ではインスリン受容体基質(IRS)-2のタンパク量や食餌に応答したIRS-2のチロシンリン酸化量が増加、すなわちインスリン応答性が高まり、トリグリセリド（TG）が蓄積する。今回、これらの変動が、直接血中アミノ酸濃度の低下を介した機構、あるいは血中インスリン濃度の低下を介した機構のいずれで誘導されるのかを検討するために、培養肝細胞を用いた解析を行った。【方法】ラット肝癌細胞H4IIEをアミノ酸欠乏培地で8時間培養後、IGF-I、IGFBP-1、SREBP-1のmRNA量をreal-time PCR法により、IRS-2タンパク量をimmunoblotting法により測定した。更に、10nMインスリンを含む培地よりインスリンを除去して6時間培養後、IRS-2タンパクの増加が観察されるかを調べた。また、6週齢Wistar系雄ラットに低タンパク質（5%カゼイン；5C）および対照（15%カゼイン；15C）食を1日8時間制限給餌し、15日目に給餌前に肝臓を採取、SREBP-1 mRNA量を解析した。【結果】H4IIE細胞をアミノ酸欠乏培地で培養した結果、IGF-I mRNA量が減少、IGFBP-1mRNA量は増加した。一方、IRS-2のタンパク量はアミノ酸欠乏条件下では増加しなかったが、培地中のインスリンを除去して培養したところ、IRS-2のタンパク量の増加が観察された。また、5C食を給餌したラットの肝臓では15C給餌ラットに比較してSREBP-1 mRNA量が増加したのに対して、アミノ酸欠乏培地で培養したH4IIE細胞ではこの変動は確認できなかった。【結論】一連の結果から、低タンパク質食給餌したラット肝臓におけるIGF-Iの産生低下やIGFBP-1の産生増加は、肝臓がアミノ酸低下を感知して引き起こされ、IRS-2のタンパク量の増加は血中インスリン低下を反映したものと結論した。一方、in vivoレベルで観察されたSREBP-1 mRNAの増加は、細胞レベルでは8時間のアミノ酸欠乏で再現できず、他の機構を介していることが示唆された。なお本研究の一部は、生研センターイノベーション創出事業の成果である。

amino acids, insulin, igf-1

講演番号：3C26p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎26会場

低タンパク質栄養時におけるLeu過剰摂取が可欠アミノ酸代謝酵素の発現に与える影響

The effect of excess leucine intake on expression of dispensable amino acid metabolic enzymes in rat under low protein nutrition.

○吉村 亮二、今村 渉[1]、金本 龍平、加藤 久典[1]（京都府大院・応用生命、[1]東大院農生科・応生化）

○ Ryoji Yoshimura, Wataru Imamura[1], Ryuhei Kanamoto, Hisanori Kato[1] (kyotofudaiin, [1]todaiin)

【目的】Leu はタンパク質合成促進や分解抑制のシグナル分子となることが知られており、そのため、近年、筋肉増強の効果を期待してサプリメントとしての Leu 摂取に注目が集まっている。しかしその一方で、Leu の過剰摂取による摂食抑制や体重減少が知られており、その安全性は必ずしも確認されていない。そこで、アミノ酸代謝に関わる遺伝子の mRNA 発現量を指標として、食餌に Leu を混合して与えた場合と、食間に経口投与により摂取させた場合について比較検討し、Leu の安全性の評価を試みた。昨年行った 1 週間の投与実験では、混合食の場合、低タンパク質食群で Leu の用量依存的な摂食量、体重増加率の減少が見られた。しかし、経口投与では摂食量、体重増加率の減少が見られなかった。ところが、Asn 合成酵素（AS）、Ser 合成に関与する 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素（PHGDH）の mRNA 量は投与経路に関わらず減少し、逆に、セリンを異化する Ser 脱水素酵素（SDH）の mRNA 量は増加した。そこで、これらの発現変動が長期的にどのような影響をおよぼすのかを明らかにすることを目的に、Leu を 1 ヶ月に渡り投与し、その効果を検討した。

【方法】10 週齢 SD 系雄ラットを予備飼育後、6%カゼイン食にそれぞれ 0%、2%、3%、4%、8%の Leu を混合した飼料を自由摂食させた。経口投与実験は、6%カゼイン食を暗期（20：00～8：00）に摂取させ、明期になって 3 時間後に経口投与を行った。Leu は、0.5%（w/v）キサンタンガム溶液に懸濁させ胃管により投与した。どちらも 1 ヶ月間飼育した後、肝臓を採取した。採取した肝臓から RNA を抽出し、RT-PCR 法で AS、PHGDH、SDH の mRNA 量を測定した。

【結果】1 週間の Leu 経口投与実験では見られなかった摂食量と体重増加率の減少が、1 ヶ月の投与で見られるようになった。このことから、投与期間が長期にわたると、Leu の過剰毒性がより顕著になることが明らかとなった。しかし、その程度は同量の Leu を混合食で与えた場合に比べ軽微であったことから、ロイシンの過剰毒性は経口投与で軽減されることが示された。一方、混合食実験では 3% Leu まで体重の増加が見られたが、4% Leu 以上になると顕著な摂食量と体重の減少が認められた。また、4% Leu 以上で AS、PHGDH の顕著な発現抑制と、SDH の発現促進が認められた。

leucine, safety ,dispensable amino acid metabolism

講演番号：3C26p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎26会場

高脂血症治療薬ピタバスタチンは抗動脈硬化作用を有するプラスマローゲンの血漿濃度を増加させる

Curative medicine of hyperlipidemia‘Pitavastatin’increases the plasma concentration of anti-atherogenic phospholipid, Plasmalogen

○山元 貴之、西向 めぐみ[1]、前場 良太[2]、原 博[1]（北大農・生機化、[1]北大院農・応生科、[2]帝京大・医）

○ Takayuki Yamamoto ,Megumi Nishimukai[1],Ryouta Maeba [2],Hiroshi Hara[1](Hokudai,[1]Hokudai,[2] Teikyodai)

【目的】プラスマローゲンは、グリセロール骨格の*sn*-1位に、ビニルエーテル結合を持つ、アルケニル型リン脂質である。これまでの研究で、トランス脂肪酸の摂取が血漿と肝臓のプラスマローゲンを減少させることを見いだした。しかし、減少したプラスマローゲンの回復に有効な物質の報告はされていない。本研究は、トランス脂肪酸の摂取により減少した体内プラスマローゲンがピタバスタチンの摂取により回復するかどうか調べることを目的とした。
【方法】6週齢のWistar-ST雄性ラットをAIN-93Gで準拠した試料で7日間飼育した後、大豆油7%を添加した標準食群と7%の大豆油に23%のナタネ硬化油(*trans* 18:1を38.6%含有)を添加した高脂肪食(トランス脂肪酸食群)に分けた。さらに、2mg/kg/dayのピタバスタチン（興和株式会社）の添加の有無により計4群に分けた。飼育後14日間ごとに、尾静脈採血を行い、29日間の試験飼育終了後、麻酔下で腹部大動脈血および肝臓、小腸、脳、心臓を採取した。採取したサンプルは脂質抽出後、LC-MS/MS法によりエタノールアミン、コリン両クラス、計60分子種の定量・解析を行った。
【結果】標準食を摂取したラットにおいて、ピタバスタチンは血漿の両クラスのプラスマローゲンを増加させた。一方、トランス脂肪酸食を摂取したラットでは、血漿プラスマローゲン濃度は減少したが、ピタバスタチンの摂取で増加は見られず、その作用は消失したものと考えられ、プラスマローゲン分子種の組成に影響を及ぼさなかった。同様の効果が小腸粘膜のプラスマローゲンでも見られ、両クラスともに増加ないし増加傾向にあり、一方、肝臓ではコリンプラスマローゲンの増加のみ見られた。その他の臓器では、プラスマローゲンの増加は見られなかった。以上のことから、ピタバスタチンは、小腸粘膜プラスマローゲンの合成を促進することで、血漿中のプラスマローゲンを回復させると思われる。

講演番号：3C26p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎26会場

オキアミより抽出したアルキル型リン脂質の摂取はラット血漿中DHA含有プラスマローゲンを特異的に増加させる

Ingestion of alkyl phospholipids derived from krill increases serum levels of plasmalogen with DHA in rats

○西向めぐみ、山﨑裕也[1]、小池誠治[1]、前場良太[2]、原　博（北大院農・応生科、[1]（株）ADEKA、[2]帝京大・医）

○Megumi Nishimukai, Yuya Yamazaki[1], Seiji Koike, Ryouta Maeba, Hiroshi Hara (Hokkaido Univ., [1]ADEKA Corp., [2]Teikyo Univ.)

【目的】リン脂質にはサブクラスとして、ジアシル型、アルケニルアシル型、アルキルアシル型が存在する。我々はこれまで、ラットにおいて、アルケニルアシル型であるプラスマローゲン(Pls)の摂取により、エタノールアミン型Pls（PlsEtn)、コリン型Pls（PlsCho）ともに、その摂取量に依存して、血漿中濃度が増加し、その増加はPlsCho投与の方が大きいことを示してきた。今回は、Plsの前駆体であるアルキル型リン脂質（AlkylPL）を多く含むリン脂質画分をオキアミから抽出し、ホスホリパーゼDによる分解と塩基交換により、リン脂質クラスの異なるコリン型、エタノールアミン型及びホスファチジン酸型のAlkylPLを高濃度に含むリン脂質を調製、これらを食事として反復摂取した際の体内Pls及びAlkylPLの動態を調べた。

【方法】Wistar-ST系雄性ラット（4週齢）をAIN-93G基本飼料で予備飼育後、対照群（7%大豆油）と、大豆油の一部を上記のAlkylPLで置き換えた3種類の1% AlkylPL食群（コリン型、エタノールアミン型及びホスファチジン酸型）の計４群に分けた。8日間の試験飼育後、麻酔下で腹部大動脈血を採取した。血漿は脂質抽出後、Pls及びAlkylPLをLC-MS/MS法によりコリン型、エタノールアミン型両クラスに分けて、分子種別に定量・解析を行った。

【結果】血漿中のコリン型AlkylPL濃度は、コリン型摂取時に大きく増加し、血漿エタノールアミン型AlkylPLはいずれのAlkylPL摂取においても増加した。一方、血漿中PlsChoは、コリン型、ホスファチジン酸型摂取で増加したが、エタノールアミン型摂取では増加しなかった。血漿中PlsEtnは、３種類のAlkylPLいずれの摂取においても約２倍に増加し、クラス間で差は無かった。これらより、食事として摂取、吸収されたAlkylPLは体内でPlsに変換され、血漿中Plsを増加させる事が示された。さらに、PlsとAlkylPLの*sn*-2位の脂肪酸組成を比べると、血漿中AlkylPLにはアラキドン酸（20：4)、および、DHA(22：6)が多く組み込まれていたが、Plsの*sn*-2位ではアラキドン酸の増加は見られず、DHAの増加が顕著であった。これは、DHA結合AlkylPLの方が、アラキドン酸結合AlkylPLに比べ、Plsに変換されやすいことを示している。

以上より、オキアミより抽出したアルキル型リン脂質の摂取は、効率良く血漿中のDHA含有プラスマローゲンを増加させることが明らかとなった。

plasmalogen, alkyl phospholipid

講演番号：3C26p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ C校舎26会場

摂取するイソマルトオリゴ糖／メガロ糖の重合度は実験的大腸炎症状に影響する

Degree of polymerization in dietary α-1,6-glucosacchardes modulates symptom of experimental colitis in rats.

○岩谷 一史、Jae-Sung Lee、山岸 晋也、篠木 亜季、Weeranuch Lang、 Hee-Kwon Kang、原 博、木村 淳夫、石塚 敏（北大・院農）

○Hitoshi Iwaya, Jae-Sung Lee, Shinya Yamagishi, Aki Shinoki, Weeranuch Lang, Hee-Kwon Kang, Hiroshi Hara, Atsuo Kimura, Satoshi Ishizuka (Hokkaido Univ)

【目的】新規に合成したα-1,6-グルコシド型糖鎖である直鎖イソマルトオリゴ糖および直鎖イソマルトメガロ糖が持つ抗炎症作用を探索するとともに、α-1,6グルコシド結合による平均重合度（$\overline{DP}$）が消化管炎症に及ぼす影響を検討することを目的とした。

【方法】4週齢の雄性、Wistarラットにスクロースを糖源としたAIN-93G準拠の半精製飼料を与え、1週間順化後、$\overline{DP}$が異なる直鎖イソマルトオリゴ糖（$\overline{DP}$=3.3）、直鎖イソマルトメガロ糖（$\overline{DP}$=8.4）、デキストラン（$\overline{DP}$=1230）を3%添加した試験食を２週間摂食させた。対照群はスクロースのみを糖源とした。最終週に2%デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を飲み水として飲ませ、大腸炎を誘導した。大腸炎症状に特徴的な体重減少、糞の形状の変化、血便の有無をそれぞれスコアリングし、腸炎症状を臨床的に評価した。解剖後に結腸を摘出し、結腸粘膜におけるミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性を測定した。さらに回腸末端、近位結腸でのグルカゴン様ペプチド（GLP)-1, 2の産生を測定した。また、盲腸内容物中の有機酸量をHPLCによって測定した。末梢血中リンパ球を分離後、CD45、CD8、CD161陽性細胞頻度をフローサイトメトリーによって解析した。

【結果】デキストランおよび直鎖イソマルトオリゴ糖添加食群において、DSS腸炎の発症が遅延した。デキストラン食群ではDSS腸炎誘導後の結腸長に対する結腸重量比の上昇が抑制された。盲腸内容物の有機酸量はデキストラン、直鎖イソマルトオリゴ糖食摂取によって増加し、特に直鎖イソマルトオリゴ糖食摂取は対照群と比べ、盲腸内容物中の乳酸、およびn酪酸量を有意に増加した。MPO活性はデキストラン食群を除き、DSS腸炎誘導後に有意に上昇した。DSS投与により、末梢血リンパ球中の$CD8^-CD161^+CD45^+$細胞の割合は対照群で有意に増加したが、直鎖イソマルトオリゴ糖、直鎖イソマルトメガロ糖、デキストラン食群ではその増加が抑制された。直鎖イソマルトオリゴ糖摂取により、近位結腸でのGLP-2産生が有意に上昇した。以上の結果から、直鎖イソマルトオリゴ糖摂取は盲腸発酵を亢進し、GLP-2を介して腸炎発症を遅延したと考えられる。このことはα-1,6-グルコシド型糖鎖の抗炎症作用が重合度により異なる可能性を示唆している。

本研究は、生研センターイノベーション創出事業の支援のもとで行われた。

α-1,6-polysaccharides, degree of polymerization, colitis

講演番号：3C26p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ C校舎26会場

直鎖イソマルトメガロ糖はラット小腸におけるケルセチン配糖体吸収を促進する

Linear α-1,6-glucosaccharides promote absorption of quercetin glycosides in rat small intestine

○篠木 亜季、Lang Weeranuch、木村 淳夫、石塚 敏、原 博（北大・院農）
○Aki Shinoki, Weeranuch Lang, Atsuo Kimura, Satoshi Ishizuka, Hiroshi Hara (Hokkaido Univ)

【目的】直鎖イソマルトメガロ糖は、α-1,6-グルコシド結合から成り、構成単糖の重合度が10から多糖までの糖質である（オリゴ糖は重合度2～9の糖質）。本研究では、直鎖のイソマルトメガロ糖とイソマルトオリゴ糖の生理作用を検証する一環として、先にフラクトオリゴ糖で見いだしたフラボノイド配糖体の吸収促進作用を検討した。フラボノイドの一種であるケルセチン配糖体は植物に豊富に存在し、発がんや動脈硬化抑制効果が報告されているが、その吸収率は非常に低い。ケルセチン配糖体のバイオアベイラビリティを高めることができれば、これらの病態予防に寄与すると考えられる。そこで、直鎖イソマルト糖が腸管腔内に共存する場合のケルセチン配糖体吸収をラット小腸結紮ループにより検討した。
【方法】試験動物は7週齢のWistar / ST雄性ラットを用い、1週間、AIN-93Gの基本飼料で馴化後、ケタミン・キシラジン麻酔下にて空腸に15 cmの結紮ループを作製し、門脈に採血用のカテーテルを留置させた。ケルセチン配糖体として、難溶性のケルセチン 3-*O*-β-グルコシド（Q3G）にα-1,4結合で1-7残基のグルコースを結合させ水溶性を高めたグルコース付加イソクエルシトリン（Q3GM, 10 mmol / L）を用いた。ループ内には、Q3GMのみを含む溶液、またはそれに直鎖イソマルトオリゴ糖またはメガロ糖（20 mmol / L）を添加した試験溶液を注入した。経時的（7.5、15、30分後）に門脈から採血し、門脈血中ケルセチン配糖体とその代謝産物の濃度をLC / MSで測定した。投与30分後に麻酔下で腹部大動脈から採血後、小腸ループを取り出した。腹部大動脈血漿および小腸内容物中に残存するケルセチン配糖体とその代謝産物を測定した。
【結果】Q3GM溶液を腸管に注入後、門脈血中にケルセチンアグリコン（非抱合体）とそのグルクロン酸または硫酸抱合体が検出されたが、配糖体はほとんど検出されなかった。ケルセチン抱合体の門脈血中濃度は、直鎖メガロ糖、またはオリゴ糖添加により影響されなかった。一方、非抱合体の濃度は、対照のQ3GMのみと比較して直鎖メガロ糖で大きく増加し、直鎖オリゴ糖でも増加傾向を示した。腹部大動脈血中の非抱合体および抱合体濃度は、糖添加の影響を受けなかった。小腸管腔内に残存する可溶化Q3G量は、直鎖メガロ糖やオリゴ糖の添加で門脈ケルセチン濃度上昇とほぼ同様の増加を示した。以上の結果より、直鎖メガロ糖は、本来難溶性のQ3Gを小腸管腔内において可溶化することで吸収を促進したものと思われた。直鎖メガロ糖は、フラボノイド配糖体のバイオアベイラビリティ亢進に寄与すると思われる。
本研究は、生研センターイノベーション創出事業の支援のもとで行われた。

Linear α-1,6-polysaccharides, Quercetin, absorption

講演番号：3C26p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎26会場

妊娠期における糖質制限食がメタボリックシンドローム発症に及ぼす影響

Effect of carbohydrate restriction during pregnancy in mice on the pathogenesis of metabolic syndrome in offspring

○森 成美，平井 静，大橋 洸，田高 梨子，越野 由希絵，江頭 祐嘉合（千葉大・園芸）
○Narumi Mori, Shizuka Hirai, Hiroshi Ohasi, Riko Takou, Yukie Koshino, Yukari Egashira (Chibadai Engei)

【目的】近年、胎児期の低栄養状態とメタボリックシンドローム発症との関与が示唆されており、マウスやラットを用いた実験では、妊娠期における総エネルギー制限やタンパク質制限による低栄養状態が、出生仔において耐糖能異常を引き起こすことが報告されている。しかしタンパク質制限の影響を検討する実験では、むしろ糖質の含量を増加させた飼料設定となっており、糖質による影響は軽視されている。一方で、日本人女性は米などの主食を制限するダイエット法を実行しがちであるという現状が多く認められるため、このような過去の報告は日本の現状を反映した研究とはなっていない。そこで本研究では、マウスを用いて、妊娠期における糖質制限食の摂取が出生仔の肥満や生活習慣病の発症に及ぼす影響について検討することを目的として行った。

【方法】9週齢のC57BL/6JJms雌マウスと雄マウスを交配し、プラグの確認された日を妊娠0.5日目として妊娠10.5日目まで標準飼料を自由摂取させた。その後、対照食摂取群(Control群：C群)、40％総エネルギー制限食摂取群(Restriction：R群)、40％糖質制限食摂取群(Carbohydrate Restriction群：CHR群)に分け、出産まで飼育した。出産後はすべての親マウスにControl食を与えた。仔マウスは出生数を確認し、離乳時まで経日的に体重測定を行った。離乳後はControl食を給与し、8週齢目に雄の仔マウスを、妊娠期の栄養状態別にさらに普通食摂取群、60％kcal高脂肪食摂取群に分け4ヶ月間飼育を行った。餌は自由摂取とし、１週間に一度体重測定を行った。経口糖負荷試験を行ったのち解剖をし、各組織重量、糖・脂質代謝関連血中パラメーターの測定を行った。

【結果】妊娠期における母マウスの体重変化を測定したところ、R群、CHR群共に、C群に比べ、体重の増加が有意に小さくなった。出生仔の体重は、生後1.5日目ではCHR群がC群に比べて有意に低かったが、4.5日目以降はその差が認められなくなった。8週齢に達した仔マウスに高脂肪食を摂取させたところ、C群に比べてR群では体重増加の促進傾向が認められたが、CHR群はC群とほぼ同程度の体重増加を示した。また経口糖負荷試験において、CHR群は、C群およびR群で認められる耐糖能異常を改善することが示された。さらに、各種脂肪組織重量や血中トリグリセリド、コレステロール値は、高脂肪食摂取状態では、R群と比べてCHR群で減少傾向が認められた。これらのことから、妊娠期における糖質制限食の摂取は、出生後の高脂肪食誘導性の肥満及び耐糖能異常を抑制することが示唆された。本研究は、飯島記念食品化学振興財団の助成によって行われた。

Keyword1pregnant undernutrition, Keyword2:carbohydrate restriction, Keyword3：epigenetics

講演番号：3C26p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎26会場

酸化コレステロール負荷アポE欠損マウスに対するエゼチミブの抗動脈硬化作用

Antiarteriosclerotic e ffect of e zetimibe on toxicity of dietary oxysterol in apolipoprotein E knockout mice

○照沼 彰一郎、小川 莉絵子、長田 恭一（明治大・農）
○Shoichiro Terunuma, Rieko Ogawa, Kyoichi Osada (Meijidai)

【目的】食品中のコレステロール(CHOL)の一部は、加工や保存の過程で酸化コレステロール(OXC)に変化する。生体内の OXC レベルが上昇すると、脂質代謝の攪乱や抗酸化システム障害等の有害作用が引き起こされる。また、OXC が動脈硬化巣から検出されることが知られており、動脈硬化発症のリスクファクターとなることが予想される。そこで本研究では、アポＥ欠損マウスに OXC を摂食させた場合に生じる有害作用とコレステロール吸収阻害剤であるエゼチミブの投与効果を検討した。
【方法】5 週齢の C57BL/6 系アポ E 欠損マウスを AIN76 純化飼料組成に基づき、無添加（C 群)、OXC 混合物（OXC）0.3%（OXC 群)、さらに OXC0.3%とエゼチミブ 0.7mg/100gB.W.を添加（E 群）した飼料で 26 日間飼育し、生体内の OXC レベルと脂質代謝諸パラメータを解析した。なお、正常 C57BL/6 系マウスを陰性対照群（NC 群）として比較した。
【結果】血中の CHOL レベルは、C 群と OXC 群は、NC 群と比較して有意に高くなったが、E 群は、C 群と OXC 群の両者と比較して有意に低くなった。動脈硬化指数は、C 群と OXC 群は、NC 群と比べて顕著に増大したが、E 群ではその増大は抑制された。このようにアポ E 欠損に伴う脂質異常がエゼチミブ投与により改善された。動脈中の CHOL レベルは、C 群は NC 群と比較して有意に高くなり、OXC 群もやや高くなったが、E 群は NC 群と同程度のレベルとなった。肝臓中の CHOL レベルは、C 群と比較して OXC 群と E 群は、有意に低くなった。血中、動脈および肝臓で検出された主要な OXC レベルは、C 群と比較して OXC 群は有意に高くなったが、E 群ではその増大は抑制された。血中および動脈中の TBARS レベルは、C 群と比較して OXC 群は、有意に高くなったが、E 群ではその上昇は抑制された。OXC 摂取に伴い、生体内の OXC レベル、過酸化脂質レベルが増大した。さらに動脈から肝臓へのコレステロール逆転送が正常に働いていないことが予想された。糞中の OXC および CHOL レベルは、他群と比べて E 群で有意に高くなった。エゼチミブが、小腸 CHOL トランスポーターである NPC1L1 に作用することで、CHOL と同様に OXC の吸収を阻害したためであると考えられる。以上のように、外因性 OXC は、生体内の酸化ストレスを上昇させることで、HDL の抗動脈硬化機構を阻害する可能性があるが、エゼチミブは OXC の吸収を阻害することで抗動脈硬化作用を発揮することが期待される。

oxysterol, cholesterol, atherosclerosis

講演番号：3C26p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎26会場

U-^{13}C-Leuを用いたHepG2細胞の定量的プロテオーム解析
― Lys・Arg欠乏に応答するタンパク質の検索 ―

Quantitative proteome analysis of HepG2 cells by using U-^{13}C-Leu
― Searching for proteins that respond to Lys or Arg deficiency ―

○木戸口 隆、川端 博秋（明治大院・農）
○Takashi Kidoguchi, Hiroaki Kawabata (Meiji Univ. Grad School of Agr.)

【目的】近年、質量分析を用いた定量的プロテオーム解析において、多様な方法が報告されている。このうち、安定同位体標識アミノ酸を培養細胞に用いる方法はSILAC(Stable Isotope Labeling by Amino Acid in Cell Culture)法と呼ばれ、研究報告の例が増加している。今回、U-^{13}C-Leuを用いたSILAC法をHepG2細胞に適用し、LysとArgの短時間の単一欠乏に対して、量的に変化を示すタンパク質を明らかにすることを目的とした。

【方法】U-^{13}C-Leuを含むDMEM培地で、HepG2細胞を5代継代培養し、細胞内タンパク質の安定同位体標識を行った。アミノ酸欠乏処理群は、U-^{13}C-Leuを含まない通常の培地条件の下で、LysとArgの単一欠乏処理 0, 4, 16 時間を行った。安定同位体を含む通常培養細胞から回収したタンパク質と、LysとArg欠乏処理を行ったタンパク質を等量になるように混合し、SDS-PAGEによるタンパク質の分離、ゲル内消化後、nanoLC-MS/MS (LTQ Orbitrap) による測定を行った。測定したデータから、質量数の異なる同一ペプチドのシグナル強度をもとにして、Proteome Discoverer (ver.1.2)で定量解析し、LysとArgの単一欠乏に応答するタンパク質の検索、およびこれらのアミノ酸欠乏における応答の差異を検討した。

【結果】本研究により、約300種類のタンパク質について、LysとArgの単一欠乏の影響を定量解析することが可能であった。各アミノ酸の欠乏に応答するタンパク質の発現変動はその種類において、Arg欠乏に応答するタンパク質の方が、Lys欠乏に応答するタンパク質の変動に比べて多いことが明らかとなった。LysとArgの欠乏に共通して発現量が減少したものには、Apolipoprotein A-ⅠやAlpha fetoproteinなどの分泌タンパク質や、Karyopherin alpha 2 のような核輸送タンパク質が有意に認められた。これとは逆に、糖新生に関わるPhosphoenolpyruvate carboxykinase 2はLysとArgの欠乏に共通して有意に発現増加した。一方で、LysとArgの欠乏で異なる挙動を示したものとして、脂肪代謝に関わるFatty acid synthaseが挙げられ、Lys欠乏に比べて、Argの欠乏において著しく減少することがわかった。以上のことから、SILAC法を用いて、LysとArg欠乏に対するHepG2細胞のタンパク質発現応答の違いが約300種のタンパク質について明らかとなった。これらのことは、アミノ酸欠乏に応答する新たなタンパク質の発見に繋がるものと期待される。

SILAC, HepG2, Amino acid deficiency

講演番号：3C26p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎26会場

糖尿病ラットの糖代謝に及ぼす*Lactobacillus gasseri* SBT2055の影響

Effects of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on glucose metabolism in diabetic rats

○森田有紀子[1]、白石彩[2]、小川哲弘[3]、門岡幸男[3]、城内文吾[4]、佐藤匡央[4]（[1]九大・農、[2]九大院・生資環、[3]雪印メグミルク、[4]九大院・農院、）

○Yukiko Morita[1], Aya Shiraishi[2], Akihiro Ogawa[3], Yukio Kadooka[3], Bungo Shirouchi[2], Masao Sato[2]（[1]Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., [2]Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu Univ., [3]MEGMILK SNOW BRAND）

【目的】我々はこれまでに、プロバイオティクス乳酸菌である*Lactobacillus gasseri* SBT2055（ガセリ菌SP株）添加発酵乳の摂取が、ラットの白色脂肪組織蓄積[1)]および食餌脂肪吸収[2)]を抑制することを報告した。その抗肥満作用メカニズムを解明するため、エネルギー代謝測定および経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）を行ったところ、ガセリ菌SP株により糖の利用またはクリアランスが促進することを報告した[3)]。本研究では、2型糖尿病モデル動物の病態発症に及ぼすガセリ菌SP株の影響について検討した。

【方法】6週齢の雄性Goto-Kakizaki（GK）ラット16匹を、体重および血糖値に群間差がないよう2群に分けた。脱脂乳を含む食餌（SM）、ガセリ菌SP株で発酵した脱脂乳を含む食餌（LGSP）をそれぞれ与えて4週間飼育し、飼育期間中3週目にOGTTを行い、耐糖能およびインスリン分泌を評価した。飼育終了後、断頭により屠殺を行い、血液、肝臓、筋肉および脂肪組織を摘出し、分析に供した。

【結果】飼育終了後の終体重、摂食量、肝臓重量、筋肉重量および脂肪組織重量に群間で差は認められなかった。OGTTの結果、血中インスリン濃度に影響は認められなかったが、血糖反応曲線（AUC）はSM群と比較してLGSP群で減少傾向を示した（$P = 0.081$）。また、筋肉および肝臓中のグリコーゲン量はLGSP群で有意な増加が認められた。以上の結果から、糖尿病モデルGKラットにおいて、ガセリ菌SP株摂取は筋肉および肝臓でのグリコーゲン貯蔵（糖の利用）を増加させ、インスリン抵抗性を改善することが示唆された。

1) Br J Nutr., 99, 1013-1017, (2008)
2) Br J Nutr., 101, 716-724, (2009)
3) 平成23年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会講演要旨集, p.19

probiotics, diabetes mellitus, glycogen

講演番号:3C27a01
講演日時、会場:3月24日09:00～ C校舎27会場

Ca^{2+}依存性ホスファチジルセリン結合タンパク質AnnexinA5のアイソフォームの解析

Analysis for two isoforms of Ca^{2+} -dependent phosphatidylserine-binding protein AnnexinA5

○横山　奈央子、八野　充子、武本　淳史、池上　春香、松本　和也、田口　善智（近大・生物理工）

○Naoko Yokoyama, Mitsuko Hachino, Atsushi Takemoto, Haruka Ikegami, Kazuya Matsumoto, Yoshitomo Taguchi (Facl. of Biol. Sci. and Tech., Kinki Univ.)

【目的】AnnexinA5は、カルシウム依存的に、生体膜の主要構成成分であるリン脂質の1種のホスファチジルセリンに特異的に結合する320アミノ酸からなるタンパク質である。222頭の黒毛和種のプロテオーム解析の結果と、それぞれのウシ個体の形質の関連付けから、ウシAnnexinA5には、2残基でアミノ酸配列が異なる2種類のアイソフォーム（33型（分子量約33kDa）と37型（分子量約37kDa））が存在し、ウシ個体がもつAnnexinA5のアイソフォームの種類と個体の枝肉重量には相関があることが示された。以上のプロテオーム解析の結果は、AnnexinA5が肉牛のバイオマーカーとして機能しうること、さらには、黒毛和種の重要な経済形質の1つである枝肉重量が、AnnexinA5のアミノ酸配列に影響されていることを示唆している。
本研究では、33型と37型AnnexinA5は2ヶ所のアミノ酸（35番目(33型:Ser、37型:Thr)と124番目(33型:Lys、37型:Glu)）しか異ならないにも関わらず、それらの分子量は約4kDaも異なる。このアイソフォーム間の分子量の差異が生じる原因を検討した。
【方法】マウス肺よりウシ33型に相当するAnnexinA5の全長cDNAを単離し、マウスAnnexinA5のcDNAの2つの領域（35番目と124番目のアミノ酸残基をコードしている部分）に部位特異的突然変異を導入し、ウシ37型と相同なアミノ酸配列をもつマウス37型AnnexinA5のcDNAを得た。これらをヒト由来培養細胞(HEK293)にtransientに導入・発現し、それぞれの分子量を調べた。33型のAnnexinA5の35番目または124番目のアミノ酸残基のどちらか一方のみに部位特異的突然変異を導入することにより、33型と37型のAnnexinA5の中間変異体（Ser^{35}→Thr（S35T）およびLys^{124}→Glu（K124E））を作製した。S35TおよびK124E変異体の分子量を検討した
【結果】それぞれの分子量を調べた結果、33型では約33kD、37型では約37kDのバンドが検出された。 S35TおよびK124E変異体の分子量を検討した結果、S35Tでは33型と同じ約33kDa、K124Eでは37型と同じ約37kDaの位置にバンドが検出された。このことから、124番目のアミノ酸残基がGluであれば約37kDaに、Lysであれば約33kDaになることがわかった。

Annexin A5, bovine, proteomic analysis

講演番号:3C27a02
講演日時、会場:3月24日09:11～ C校舎27会場

酵母split-ubiquitinシステムによるヒトMPDU1蛋白質の解析

Analyses of the human MPDU1 protein using the yeast split-ubiquitin system

○高橋 哲夫、岩本 栄介（東海大・工・生命化学）
○Tetsuo Takahashi, Eisuke Iwamoto (Tokai Univ.)

【目的】mannose-P-dolichol utilization defect 1(MPDU1)は、高等真核細胞の粗面小胞体(rER)膜上の糖鎖生合成経路においてドリコールリン酸マンノース(DPM)合成酵素により産生されたDPMの、ER膜細胞質側から内腔側への転送に関連するrER膜局在蛋白質である。本研究では、膜蛋白質間の物理的相互作用を*in vivo*で解析可能なツーハイブリッド技法である酵母split-ubiquitinシステムを利用してヒトMPDU1(hMPDU1)蛋白質のrER膜上での配向性の特徴と物理的相互作用について検討を加えた。
【方法】まずhMPDU1の膜配向性を調べるため、本蛋白質のN末端及びC末端にそれぞれCub-転写因子を付加した2種類のベイトコンストラクト(pBT3-N-hMPDU1及びpBT3-C-hMPDU1)と、6種類のC末端側からの欠失変異体のベイトコンストラクトpBT3-C-hMPDU1HR1～6を作製した。これらをpAI-Alg5(陽性コントロールプレイ)またはpDL2-Alg5(陰性コントロールプレイ)と組み合わせて酵母NMY51株を二重形質転換し、得られた共発現株について2種類のレポーター検出用培地(SD-LWHおよびSD-LWHA)上でスポットテスト(増殖性試験)を行った。次に、hMPDU1同士のrER膜上での物理的相互作用の有無を調べるため、本蛋白質のN末端及びC末端にそれぞれNubGを付加した2種類のプレイコンストラクト(pPR3-N-hMPDU1及びpPR3-C-hMPDU1)を作製し、上記ベイトコンストラクトと組み合わせて酵母NMY51株を二重形質転換し、得られた共発現株について同様の解析を行った。
【結果】膜配向性の解析における増殖性試験の結果、pBT3-N-hMPDU1、pBT3-C-hMPDU1、pBT3-C-hMPDU1HR2及びpBT3-C-hMPDU1HR6については、pAI-Alg5との共発現の場合のみに両培地上での有意な増殖性が観察された。一方、他のベイトコンストラクトについては、どちらのコントロールプレイと共発現させた場合も増殖性が見られなかった。これらの結果からhMPDU1はrER膜を4回膜貫通し、N末端とC末端は細胞質側に配向していることが想定された。
さらに、hMPDU1同士のrER膜上での物理的相互作用の解析における増殖性試験の結果、BT3-C-hMPDU1/pPR3-N-hMPDU1共発現株及びBT3-C-hMPDU1HR6/pPR3-N-hMPDU1共発現株は両選択培地上で増殖性を示したが、pBT3-C-hMPDU1HR2/pPR3-N-hMPDU1共発現株は増殖性を示さなかった。これらの観察結果から、hMPDU1同士は、rER膜上でN末端とC末端を介して物理的に相互作用して二量体(または少量体)を形成していること、またその物理的相互作用には、hMPDU1蛋白質のアミノ酸残基100番目から215番目までの領域が重要な役割を果たしていることが示唆された。

split-ubiquitin system, MPDU1, dolichol-P-mannose

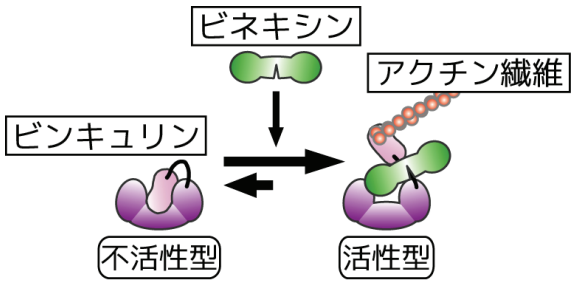
講演番号：3C27a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎27会場

ビネキシンはビンキュリンの活性化を促進する

Vinexin promotes vinculin activation

○市川 尚文[1]、山下 寛[1]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1]([1]京大院農・応用生命、[2]京大・iCeMS)
○Takafumi Ichikawa[1]、Hiroshi Yamashita[1]、Yasuhisa Kimura[1]、Kazumitsu Ueda[1,2]、Noriyuki Kioka[1]([1]Div. of App. Life Sci., Grad. Shc. of Agri., Kyoto Univ., [2]Inst. for iCeMS, Kyoto Univ.)

【目的】細胞は、コラーゲンなどの細胞外マトリックス(ECM)との接触部位に接着斑と呼ばれるタンパク質複合体を形成する。最近、細胞がECMの堅さを感知して、分化や運動などの運命を決定することがわかってきた。ECMの堅さの感知には、接着斑にアクチン繊維が繋ぎとめられ、それによって発生する細胞内張力が堅さに応じて変化することが重要であると考えられている。そのため、接着斑とアクチン繊維を繋ぐ役割をしている接着斑タンパク質ビンキュリンが注目されている。ビンキュリンは通常はアクチン繊維とほとんど結合しないが、構造変化を起こして活性化すると初めてアクチン繊維と結合できるようになる。発表者らはこれまでに、培養細胞を用いた実験で、接着斑タンパク質ビネキシンが、ビンキュリンのアクチン繊維に対する結合状態を変化させている可能性を報告している。そこで、本研究では精製タンパク質を用いた*in vitro*実験により、ビネキシンがビンキュリンを直接活性化できる可能性について検討した。
【方法】GST融合ビネキシンと6xHis融合ビンキュリンを、それぞれ低温誘導法で大腸菌Rosetta株に発現させ、アフィティー精製した。ビネキシンは可溶化効率を上げるために、N末端から156アミノ酸を欠失させたΔN変異体として精製した。精製したビネキシンΔNが直接ビンキュリンに結合することはpull-down法で確認した。これらの精製タンパク質と、アクチン繊維を混ぜて超遠心し、アクチン繊維に結合しているタンパク質だけを共沈降させてビンキュリンの活性化状態(アクチン結合活性)を評価した。また、ビンキュリンの構造変化を評価するために、ビンキュリンにYFPとCFPを付加した分子内FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)プローブを用いた。ビンキュリンが構造変化を起こして活性化すると、このプローブのYFP/CFP蛍光強度比が減少する(*J.C.B.,* 2005. **169** 459.)。このビンキュリン-FRETプローブを精製し、精製ビネキシンとアクチン繊維と共に混合した後、YFP/CFP比の変化からビネキシンによるビンキュリンの構造変化を評価した。
【結果】精製ビンキュリン単独ではアクチン繊維とほとんど共沈降しなかったが、精製ビネキシンΔNを加えていくと濃度依存的に、アクチン繊維と共沈降するビンキュリンの量が増加した。また、精製ビンキュリンプローブ単独に比べて、精製ビネキシンΔNを加えていくと濃度依存的にYFP/CFP比が減少した。このことからビネキシンはビンキュリンに直接結合して活性化し、アクチン繊維との結合を促進することが明らかになった。



Vinculin, Actin, cell adhesion

講演番号：3C27a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎27会場

タイトル　腎臓におけるLgr４の機能解析

Title:The functional analysis of Lgr4 in mouse kidney

○霜田貴宏[1]、毛利泰彰、大山一徳、赤松篤、西森克彦（東北大・農）

○ Takahiro Shimoda[1], Yasuaki Mohri[1], Kazunori Oyama[1], Atsushi Akamatsu[1], Katsuhiko Nishimori[1] (Grad. Sch. of Agric. Sci., Univ. of Tohoku)

【目的】 Lgr4(leucine rich repeat containing G protein coupled receptors 4) はFSHRやLHR、TSHRなどのグリコプロテインホルモン受容体と近縁の遺伝子としてクローニングされた７回膜貫通型の受容体である。発見以来、リガンドの不明なオーファン受容体であったが、近年リガンドとしてR-spondinが同定され[1]、Wntシグナル伝達に関わる機能を有することが明らかとなった。我々はLgr4$^{-/-}$マウスを作成し、生体内におけるLgr4の機能解析を行っている。これまでにLgr4が腎臓、毛包、乳腺、眼瞼など様々な組織の発生に関わる遺伝子であることが明らかにしている[2,3,4,5]。Lgr4$^{-/-}$マウスは完全な胎生致死を示したことから、生命維持に必須の役割を担うことが示唆された。更に詳細に解析を行った結果、Lgr4$^{-/-}$マウスでは腎臓の形成不全が確認され、Lgr4が胎児期の腎臓発生に関わることが明らかとなったがその詳細については不明であった。そこで本研究では胎児期の腎臓形成におけるLgr4の機能を解明することを目的とした。さらに腎臓の初期発生だけでなく、成獣齢での腎臓組織におけるLgr４の機能解析を行った。

【方法】本研究では我々の作成したLgr4$^{-/-}$マウスを用いて解析を行った。このマウスはLGR4の膜貫通部位をコードするExon18を欠損させている。C57Bl/6J系統10回以上の掛け合わせを行い得られたC57Bl/6jバックグラウンドのマウスを用いた。胎児期の腎臓についてヘマトキシリン・エオジン染色による形態観察を行った。また定量RT-PCR、In situ hybridization、免疫染色などにより腎臓発生関連遺伝子の発現解析を行った。さらにDBA-lectin染色による尿管芽の分化状態を解析した。成獣齢マウスにおける機能解析については、Lgr4-EGFP-IRES-CreER^{T2}マウス[6]を用いて行っている。

【結果】発生期の腎臓においてLgr4は胎児期12.5日以降にコンスタントに発現することをRT-PCRで確認した。In situ hybridizationにより詳細な発現部位の解析を行ったところ、腎小胞やコンマ体/S字体を含む管前駆細胞でLgr4が発現していることを確認した。一方胎児期16.5日でのヘマトキシリン・エオジン染色により、Lgr4$^{-/-}$マウスでは尿管芽での嚢包形成が確認された。尿管芽の発達異常について詳細な解析を行い、DBA-lectin染色によりLgr4$^{-/-}$マウスでは尿管芽が早期分化を引き起こすことが明らかとなった。同様の表現型がβ-catenin、Gata3欠損マウスでも確認されており、定量RT-PCR、In situ hybridization、免疫染色などの解析から、Lgr4がWntシグナルを介してGata3の発現を制御し、尿管芽の早期分抑制することが示唆された[2]。加えて成獣齢マウス腎臓におけるLgr4の機能を明らかとするため、Lgr4-EGFP-IRES-CreER^{T2}マウス(Clevers H博士から譲渡)を用いて発現解析等を行っており合わせて報告する。

[1]de Lau W et al.,Nature,293(2011),[2]Mohri K et al.,Fertil Steril,2878(2010),[3]Kato S et al.,Dev.Dyn,2235
[4]Oyama K et al.,Sex.Dev,205(2011) ,[5] Kato S et al., FEBS Lett.,4685(2007)

Keyword1,LGR4 keyword2,Kidney Keyword3,Development

講演番号：3C27a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ C校舎27会場

ヒトhArp5およびhArp8遺伝子ノックアウト細胞を用いたINO80クロマチンリモデリング複合体の機能解析

Functional analyses of the INO80 chromatin remodeling complex using gene knockout cells for the human actin-related proteins hArp5 and hArp8

○高橋 裕一朗[1]、松田 涼[1]、北村 大志[1]、加茂 真理子[1]、西嶋 仁[2]、柴原 慶一[2]、原田 昌彦[1]
([1]東北大・院農・分子生物、[2]国立遺伝研)
○ Yuichiro Takahashi[1], Ryo Matsuda[1], Hiroshi Kitamura[1], Mariko Kamo[1], Hitoshi Nishijima[2], Kei-ichi Shibahara[2], Masahiko Harata[1]
([1]Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ., [2]Nat. Inst. Genet.)

【目的】転写・複製・修復などのゲノム機能の制御において、クロマチンの構造変換（クロマチンリモデリング）が重要な役割を果たしている。クロマチンリモデリングには多くのタンパク質が関与しており、その中でもATP加水分解酵素としての活性を有するATP-dependent chromatin remodeling complex（ADCR複合体）が重要な役割を果たしている。INO80 ADCR複合体は遺伝子発現制御に関与することが報告されているが、それに加えて我々は、出芽酵母を用いて停止した複製フォークの進行再開にもINO80複合体が必要であることを明らかにした(Curr Biol, 18, 566-(2008))。INO80複合体は酵母からヒトまで進化的に保存されていることから、遺伝子発現やゲノム安定性維持におけるヒトINO80複合体の機能を明らかとすることを本研究の目的とした。
【方法】ヒトINO80複合体は、アクチン関連タンパク質hArp5およびhArp8を機能に必須な構成因子として含んでいる。そこで、ヒトB細胞白血病由来NALM-6細胞を用いてhArp5、hArp8の遺伝子ノックアウト(KO)細胞を樹立し、hINO80複合体の機能を解明することを試みた。
【結果】この2種類のKO細胞は、共にDNAの複製阻害剤であるaphidicolinに対し強い感受性を示した。また、このような複製ストレス環境下において、ノックアウト細胞では分裂期染色体の切断頻度の増加が認められた。これらの結果は、ヒトにおいてもINO80複合体が複製フォークの進行再開を介して染色体安定性維持に関与する可能性を示している。さらにhArp5-KOおよびhArp8-KO細胞のマイクロアレイ解析の結果から、INO80複合体が複数のストレス応答遺伝子の発現制御に関与することが示唆された。そこで、酸化ストレス応答遺伝子の１つであるHeme oxygenase-1 (HO-1)に注目し、細胞に酸化ストレスを与えた際の発現量をRT-PCRによって定量した。その結果、WTと比較して、これら2種類のKO細胞では酸化ストレスによるHO-1の発現量が著しく減少していたことから、hINO80複合体のHO-1の転写活性化への関与が示された。これらの結果は、hArp5およびhArp8がINO80複合体の構成因子として、様々なゲノム機能の制御に関与することを示唆している。

actin-related protein, chromatin remodeling complex, gene expression

講演番号：3C27a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ C校舎27会場

ヒト前立腺型タンパク質架橋化酵素の発現と前立腺由来タンパク質の基質配列解析

Expression of human TGase 4, prostate-type TG, and its preferred substrate sequence

○樋口幾、伊藤みほ、福井美奈、鞍本克真、清水由隆、人見清隆（名大院生命農・応用分子生命科）

○Iku Higuchi, Miho Itoh, Mina Fukui, Katsuma Kuramoto, Yoshitaka Shimizu, Kiyotaka Hitomi(Nagoya Univ., Grad. Sch. Bioagric. Sci., Dept. Appl. Mol. Biosci.)

【目的】タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ（以下TGase）は、カルシウムイオン依存的にタンパク質のグルタミン残基とリジン残基との間に不可逆的な架橋形成反応を触媒する翻訳後修飾酵素である。哺乳類では８種類のアイソザイムが存在して、組織特異的な分布のもと、様々な生理作用に関与している。これらのアイソザイムの中で、前立腺特異的なアイソザイム（TGase 4）については、未だにその基質認識機構や生理的意義は不明なままである。また酵素の変異体作成も含め、様々な機能解析のためにも、有効な組換えタンパク質の生産系が必要である。そのため本研究ではまず、組換えTG４の大腸菌および昆虫細胞での発現系の確立を目的とした。またすでにTG4 の基質として知られている前立腺由来のタンパク質SVS-I(seminal vehicle secretion I)の配列の中で、反応性が高いと報告されてきた配列について、基質としてのペプチド化を目指して、高反応なグルタミン残基を含む基質配列の検討を目的とした。

【方法および結果】組換え型TG4の発現については、まずヒトTG4cDNAを用いて、ヒスチジンタグを付加して発現しうるベクターを構築し、大腸菌で発現させた。また並行して昆虫細胞―バキュロウイルス系での発現も試みた。大腸菌の発現系ではほとんどが不溶化したが、低温（25度）での培養と精製により、可溶化されて活性を有する組換えタンパク画分を得た。昆虫細胞発現系においても同様の発現を試みて、可溶化画分を得て比較したが、両者のタンパク質あたりの比活性にほとんど変化はなかった。得られた組換え型酵素については、その至適なpHなど、生化学的な性質を検討している。

TGase 4の基質であるSVS-Iにおいて、反応しやすいと推測される部分配列を選び、GST（グルタチオンー*S*ートランスフェラーゼ）との融合タンパク質として大腸菌で発現させた。大量培養して精製し、これがTG4に依存的に基質として反応するかどうかを検討した。その結果、この配列が組織一般に発現するTGase 2に反応せず、TGase 4に対して特異的な反応を示した。また、反応が予測される2か所のグルタミン残基を変異させた組換えタンパク質も並行して得て、それらの反応性を比較検討している。合わせて他のアイソザイムとの交差反応性についても検討している。

Hitomi et al. Amino Acids, (2009)

transglutaminase, prostate, calcium

講演番号：3C27a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎27会場

モデル生物としてのメダカ(*Oryzias latipes*) におけるタンパク質架橋化酵素の解析

Characterization of transglutaminase, a protein cross-linking enzyme in medaka (*Oryzias latipes*)

○斉藤麻衣、樋口幾、伊藤みほ、人見清隆（名大院生命農・応用分子生命科）
○Mai Saitoh, Iku Higuchi, Miho Itoh, Kiyotaka Hitomi(Nagoya Univ. Grad Sch. Bioagric Sci.)

【目的】タンパク質架橋化酵素・トランスグルタミナーゼ(以下TGase)は、カルシウム依存的に、タンパク質中のグルタミン残基とリジン残基間、または一級アミンとを架橋する修飾酵素である。ヒトなど高等動物では８つのアイソザイムが存在し、それぞれが多彩な生命現象に関与している。しかし依然として、それらの生理的意義については不明な点が多い。生理的意義の解明には、遺伝子欠損変異体を取得して表現型を解析する方法が有効な手段である。モデル生物としてのメダカ（ニホンメダカ　*Oryzias latepis*） は比較的短期間に変異個体を取得でき、また発生過程や組織の観察も容易である。我々はまず、メダカに存在するTGase 遺伝子群を同定・配列解析し、このうちの幾つかについて、組換えタンパク質を取得して、生化学的な解析を行うことを目的とした。また、これらのアイソザイムの組織における特異的な活性発現パターンを明らかにすることも目的とした。
【方法および結果】メダカのTGase に該当する遺伝子の解析は、基礎生物学研究所バイオリソースセンター作成のデータベースを利用して行った。ヒト・マウス遺伝子の相同性配列を基に検索した結果から、メダカには５種類のアイソザイムが存在することが判明した。これらの遺伝子間の相同性から樹形図を作成し、それらの相互関係、ヒトオルソログとの比較検討を行った。その結果、高等動物の皮膚型（TG1），組織型（TG2）に相当する２種類の遺伝子を特定し、それぞれをOlTGK, OlTGT と命名した。これらの遺伝子全配列を解析した結果、これらは酵素としての活性部位近辺や活性発現に必要なアミノ酸残基は保存されていた。次に、それらの組換えタンパク質を大腸菌で発現させた。大腸菌を通常よりも低温で培養（25度）することにより、メダカTGaseの組換え酵素は可溶性画分に回収されたので、これを精製してその生化学的諸性質を明らかにした。
　また、我々が同定してきたヒトTGase の各アイソザイムに特異的に反応する、高反応性基質配列ペプチドを用いて、それぞれの酵素活性が発現する部位を可視化して解析した。OlTGK, OlTGTそれぞれが、メダカの全固定化標本において組織特異的な発現パターンを示した。現在これについても詳細な解析を行っている。
Itoh et al. J. Histochem. Cytochem. (2011)

transglutaminase, medaka, calcium

講演番号：3C27a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ C校舎27会場

レトロウイルスインテグラーゼと核内タンパク質PMLの相互作用とその機能

Moloney murine leukemia virus integrase and reverse transcriptase interact with PML proteins

○三宅 克英、沖野 雄気、小島 佑介、木渓 俊介、西島 謙一、飯島 信司（名古屋大・工）
○Katsuhide Miyake, Yuuki Okino, Yusuke Kojima, Shunsuke Kidani, Ken-ichi Nishijima, Shinji Iijima (Nagoya Univ.)

【目的】トランスジェニック鳥類を作製する際に用いられるレトロウイルスベクターを改良するために、レトロウイルスに関する基礎研究を行っている。特に改良点として DNA 挿入酵素インテグラーゼに着目している。インテグラーゼの改良は DNA 挿入効率の向上や導入遺伝子のサイレンシング防止などウイルスベクターの性能向上につながるため非常に重要である。本研究ではインテグラーゼと核内 PML ボディの主要構造タンパク質 PML との相互作用及びインテグラーゼの SUMO 化翻訳後修飾について解析した。
【方法及び結果】モロニーマウス白血病ウイルス（MoMLV）及びヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）由来のインテグラーゼがin vivo及びin vitroで核内構造タンパク質PMLと結合していることを発見した。細胞内にFLAG-tagを融合したインテグラーゼを発現させて抗FLAG抗体結合ビーズで免疫沈降したところ、内在性の主要PMLタンパク質群（PML I～V）が供沈することが明らかになった。同様の結果はウイルス感染細胞においても得られた。siRNAによるノックダウン実験の結果、PMLはレトロウイルスのゲノム逆転写過程を促進するという結果が得られた。インテグラーゼとPMLの相互作用がこの逆転写増強にどのように関与しているのかは今のところ不明である。またPMLボディにリクルートされる多くのタンパク質はSUMO化されることが知られている。従ってPMLと相互作用するインテグラーゼのSUMO化を調べたところ、いくつかのタンパク質のSUMO化酵素として知られるPIASyによってSUMO化されることが明らかになった。インテグラーゼのSUMO化の機能を明らかにするためには、SUMO化されない変異株を用いた解析が必要である。我々は、SUMOのドミナントネガティブ体（SUMOΔGG）がインテグラーゼとPMLの核移行を阻害するという予備的な実験結果を得ており、今後インテグラーゼのSUMO化されない変異株が同様の挙動を示すかどうかとい点についても解析を進める予定である。

integrase, PML, retrovirus

講演番号:3C27a09
講演日時、会場:3月24日10:38～ C校舎27会場

前シナプス制御分子ComplexinIIと結合するタンパク質の同定

Identification of ConplexinII binding proteins in presynapse

松永みどり[1]、○志田麻紀子[1]、兼田悠[1]、山森早織[2]、高橋正身[2]、片岡正和[1]（[1]信州大院・工、[2]北里大・医・生化）

Midori Matsunaga[1], ○Makiko Shida[1], Hisashi Kaneda[1], Saori Yamamori[2], Masami Takahashi[2], Masakazu Kataoka[1]

[1] Graduate School of Engineering, Shinshu University. [2] Biochemistry Division, Kitasato Medical School.

【目的】ComplexinII(CPLX2)は神経細胞の細胞体で生合成される可溶性タンパク質である。また前シナプス部位に優先的に局在し、神経伝達物質放出を調節するタンパク質であるが詳細な機能は明らかではない。我々は前シナプス形成機構の解明を目的としており、その一環としてCPLX2の軸索優先局在領域と相互作用を示すタンパク質を探索した。

【方法】Yeast Two Hybrid法によりCPLX2と相互作用する分子をマウス脳cDNAライブラリーから探索した。またpull-down法とMALDI-TOF MSによりラット脳不溶性画分からCPLX2と相互作用するタンパク質を探索した。さらに候補分子のタグ融合タンパク質を発現させ、免疫沈降法及び *in vitro* でのPull down法によって直接的相互作用を確認した。

【結果】Yeast Two Hybrid法により候補分子としてα-synuclein(α-syn)を得た。α-synは前シナプスに豊富に存在し、パーキンソン病の病因の１つである。神経伝達物質放出を調節していると考えられているが、詳細は明らかではない。またpull-down法とMALDI-TOF MSによりParkinを候補として得た。Parkinは全身に広く存在するユビキチンリガーゼで脳にも存在する。さらに、これらの相互作用に必要な領域を特定した。

講演番号：3C27a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ C校舎27会場

黄色ブドウ球菌鉄取り込みIsd蛋白質-金属ポルフィリン間の結合および輸送機構解析

Analysis of iron and other metalloporphyrins recognition and transport mechanism among IsdH, IsdA and IsdC from *Staphylococcus aureus*.

○森脇 由隆、寺田 透、Jose M. M. Caaveiro[1]、堤 浩[2]、浜地 格[3]、津本 浩平[1]、清水 謙多郎（東大院・農・応生工、[1]東大・医科研、[2]東工大院・生命理工、[3]京大院・工・合成生化）

○Yoshitaka Moriwaki, Tohru Terada, Jose Caaveiro[1], Hiroshi Tsutsumi[2], Itaru Hamachi[3], Kouhei Tsumoto[1], Kentaro Shimizu (*Dept. of Biotech., Grad Sch. of Agri. Life Sci., Univ. of Tokyo,* [1]*Ins. of Med. Sci., Univ. of Tokyo,* [2]*Grad. Sch. of Biosci. and Biotech., Dept. of Bioeng., Tokyo Ins. of Tech.,* [3]*Dept. Syn, Chem. & Biol. Chem., Kyoto Univ.*)

【目的】黄色ブドウ球菌は自身の急速なゲノム変異によって，これまで地上に存在しているすべての抗生物質に対する薬剤耐性を獲得していることから，病院など自然免疫の不活化した患者の多い場所での感染が社会的，医学的な問題となっている。これを解決すべく，我々は黄色ブドウ球菌の株間でほぼすべてに保存されており，かつ黄色ブドウ球菌の活動に必須であるヘムをホスト動物の血液など外部から獲得する9つの蛋白質群Isd systemのうち，はじめの3つの蛋白質IsdH, IsdA, IsdCと，ヘムの鉄原子を他の金属原子で置換した金属ポルフィリンとの結合の有無に着目し，実験と計算化学の両面からIsd systemのヘム輸送機構について解析を行う。

【方法】Isd systemの機能不活性化は黄色ブドウ球菌の生存率を大きく下げることに貢献しているという臨床学的なデータをもとに，我々はIsd蛋白質間で結合および運搬されるヘムのアナログとして，鉄原子をガリウム(Ga)，マンガン(Mn)などの他の金属で置換した金属ポルフィリンを使用し，各Isd蛋白質との結合・輸送実験を，吸光度測定およびITC（等温滴定型熱量測定）で評価した。さらに現在，これら金属置換ポルフィリン中で結合が可能および不可能であったものの違いを考察すべく，量子力学・分子動力学を用いた理論的なアプローチも行なっている。

【結果】ヘムの中心金属がGaやMn，亜鉛（Zn）や銅（Cu）などで置換された金属ポルフィリンについて，サイズ排除クロマトグラフィー，吸光度測定，ITCによって多角的に結合を評価したところ，いずれの測定手法でもGa, Mnなど3価の陽イオンとなりうる金属原子の金属ポルフィリンとのみ結合および他Isd蛋白質への輸送が確認された。一方で，Zn, Cuなどの2価までしかとることができない金属についてはIsd蛋白質との結合が見られなかった。また，Isd systemの蛋白質群のひとつIsdH-NEAT3ドメインとFe（ヘム），Ga，Mnポルフィリンとの結晶構造解析の結果を比較してみたところ，結合様式に差異はなかった。この現象を解明すべく，量子化学計算ソフトGaussian 09を用いて各金属ポルフィリンと結合残基であるチロシンとの，結合前後での自由エネルギー変化を計算したところ，Ga, Mnポルフィリンおよびヘムとの結合はエネルギー的に有利であるが，Zn, Cuポルフィリンとの結合が不利であるという結果が得られたことから，実験事実と一致していることがわかった。現在，これら金属ポルフィリンがどのようにしてIsd蛋白質間で輸送されているのか，その駆動力について結合における自由エネルギー変化を計算しながら，その計算結果と変異体解析の実験結果をもとに議論しようと試みている。

Heme, Quantum Mechanics, bioinorganic chemistry

講演番号：3C27p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ C校舎27会場

細胞老化因子のゴルジ体形成に対する寄与

Involvement of senescence-associated genes in the formation of Golgi apparatus

○鵜殿美弥子、山下俊太郎[1]、片倉喜範[1,2]（九大院・生資環、[1]九大院・シス生、[2]九大院・農院）
○Miyako Udono, Shuntaro Yamashita[1], Yoshinori Katakura[2] (Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ. [1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2] Fac. Agric., Kyushu Univ.,)

【目的】これまで本研究室では、プロテオミクス的アプローチにより、ヒト正常線維芽細胞株（TIG-1）の細胞老化に伴い発現変化を示す16種のタンパク質を同定している。データベース解析により当該遺伝子を同定後、定量RT-PCRを行い、これら16種のうち7種の遺伝子をTIG-1細胞の分裂老化に伴い発現変化を示す細胞老化関連因子(Senescence-Associated Genes: SAGs)として同定した。これらSAGsの中で、ゴルジ体の構造・機能維持に機能していることが知られている遺伝子SAG15に着目し、細胞老化の進行に伴うゴルジ体の崩壊メカニズム、さらにはその崩壊へのSAG15の寄与を明らかにすることを目的として研究を行った。
【方法】細胞老化関連因子による細胞老化誘導能を定量的に評価するために、イメージングサイトメーター（IN Cell Analyzer 1000）を用いた。その際、新たなβ-ガラクトシダーゼの蛍光基質を用いることで、細胞老化を検証するための老化関連蛍光β-ガラクトシダーゼ（SA-β-Gal）アッセイ法を新たに構築した。
【結果】まず、この遺伝子SAG15の細胞老化誘導における原因性を検証するために、レトロウイルスベクターを用いて、若いTIG-1細胞におけるSAG15遺伝子のノックダウンを行った。その結果、老化マーカーとして知られるp21、p16の発現増強及びSA-β-Gal活性の増強、さらには増殖能力の低下といった細胞老化様の表現型を示し、SAG15のノックダウンが細胞老化を誘導することが明らかとなった。また、このSAG15ノックダウン細胞では、老化細胞に見られるようなゴルジ体の面積増大、分散化が認められた。次にゴルジ体におけるSAG15の機能性を検証するために、レトロウイルスベクターを用いて老化したTIG-1細胞においてSAG15を強制発現した。その結果、老化細胞において構造変化が見られるゴルジ体が、SAG15遺伝子の導入とともに、細胞核近傍に集まる様子が確認された。このゴルジ体の核周辺への集積は若いTIG-1細胞で見られるものであり、SAG15導入によるゴルジ体の構造・機能修復の可能性が考えられた。つまり、SAG15が細胞老化に伴うゴルジ体崩壊の原因であることが考えられた。
以上の結果から、SAG15がゴルジ体機能の制御を介して、生命活動の維持及び細胞老化プログラムに必須の役割を演じる因子である可能性が示唆された。

Senescence-Associated Genes (SAGs), Golgi apparatus

講演番号：3C27p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ C校舎27会場

単一細胞操作による B16 メラノーマ細胞の選別とチロシナーゼ遺伝子発現解析

Selection of B16 melanoma cells by single cell manipulation and analysis of tyrosinase gene expression

○　ムジュジヒラリーウィリアム、栗原　誠、飯田　泰広　（神奈川工科大学・応用バイオ）

○ Mujjuzi Hillary William, Kurihara Makoto, Iida Yasuhiro (Kanagawa Institute of Technology)

【目的】皮膚のシミや黒ずみなどの原因となるメラニンの生合成にはチロシナーゼが必須であるため、その阻害により美白効果が期待できる。一方、一度形成されたシミは、皮膚がターンオーバーする期間よりも長く残るため、シミを形成する細胞は他の細胞と比べてエピジェネティックな機構が働いている可能性が示唆される。本研究室でもこれまでに、当該細胞をメラニン抑制評価の指標として用いた研究を行ってきている。その過程において、メラノーマ細胞の色の違いなど、個体差を有していることを見出してきている。本研究では、単一細胞操作技術を用いてメラノーマ細胞を選別、表現型の解析とチロシナーゼ遺伝子発現解析を行い、表現型の違いによるチロシナーゼ発現量の相違を評価することを目的とした。

【方法】マウス由来、B16メラノーマ細胞を培養し、その後、単一細胞の操作が可能なPico pipette装置を用いて黒色細胞と白色細胞を色の違いにより選別、分取した。得られた細胞からRNAを抽出、RT-PCRによりチロシナーゼ発現を調べた。又、細胞に脱メチル化薬剤を作用させ、メラニン生成量の評価を行った。

【結果】Pico pipette を用いて、顕微鏡観察を行いながら黒色細胞のみあるいは白色細胞のみを分取、培養した。その結果、いずれの細胞も増殖することが示された。また、浮遊している細胞でも増殖を確認することができた。チロシナーゼ発現量においては、黒色細胞は白色細胞より高いことを確認した。脱メチル化薬処理によるメラニン産生量の影響に関しても併せて報告する。

Melanoma Cells Manipulation, melanin synthesis, tyrosinase gene expression

講演番号：3C27p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎27会場

催奇形性因子による転写調節因子への影響性

Effects of teratogenic factors for expressions of transcription factors

○小島 拓哉[1]、西谷 健[1]、山根 一祐[2]、高橋 直樹[1]（[1]東大院・農生科・応生化、[2]テレ研）

○Takuya Kojima[1], Ken Nishitani[1], Kazusuke Yamane[2], Naoki Takahashi[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ Tokyo, [1]TVS. Lab)

【目的】個々の遺伝子の発現は、正常な発生過程において、時間及び空間的に厳密に制御されている。環境汚染物質や催奇形成因子は、この遺伝子発現機構に対し負の影響を与え先天的な奇形を生じさせる危険性を有している。これら因子による表現型は、現在までに数多く解析されている転写調節因子に異常を来した場合の表現型と多くの点で類似性を持つが、これら因子がどのような作用時点で形態形成過程に寄与する転写調節因子の発現に影響を及ぼしているのかと云った点に関しては不明な点が多い。そこで下記の手法を用い個々の因子による転写調節因子への影響性を検討した。

【方法】妊娠マウスに対し一定量の TCDD または レチノイン酸を経口投与し、胎児にこれら因子を短時間暴露させ、回収した胎児を用いた RT-PCR にて形態形成過程に関わる転写調節因子の発現変動を確認した。

【結果】上記因子の暴露胚においては口蓋裂等の相似性を持つ表現型が認められる。そこでこれらの表現型と関連性が示唆されている 39 の *Hox* 遺伝子群への影響性を解析した結果、６時間暴露した E10.5 の胎児において *Hox* 遺伝子群の発現に顕著な変化が認められた。また *Hox* 遺伝子クラスター内に存在する miRNA の primary transcript 量においても変化が認められた。しかしながらこれら因子による *Hox* 遺伝子群の発現変化には相関性は認められず、これら因子による *Hox* 遺伝子座への影響は異なる作用に基づいている事が示唆された。また T-box 遺伝子群への影響性を検討した結果、それぞれの因子が異なる転写調節因子発現に寄与している事が認められた。

様々な環境汚染物質等の因子を食品や環境から摂取してしまう危険性が増している昨今にあっては、その影響性を簡便・迅速・正確に検出する分子マーカーを同定すると共に、その分子機序を理解する事が必要であると考えられる。現在他の転写調節因子への影響性を検討すると共に、これらの因子がどのような作用を介してこれら転写調節因子の発現に影響性を与えるのかを検討しており、上記の分子マーカーの策定及びその分子機序の解明を図っている。

teratogenic factor, transcription factor, gene expression

講演番号：3C27p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ C校舎27会場

発達段階に依存した精巣特異的リボソームタンパク質L10-likeの発現

Developmentally regulated expression of testis-specific ribosomal protein L10-like

○佐土原 英司、杉原 圭彦、大島 健司、松田 幹、灘野 大太（名大・院生命農）
○Eiji Sadohara, Yoshihiko Sugihara, Kenzi Oshima, Tsukasa Matsuda, Daita Nadano (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】当研究室では、哺乳類リボソームのプロテオミクスによる網羅的解析を行い、リボソームタンパク質L10のパラログであるリボソームタンパク質L10-likeをマウス精巣リボソームにおいて同定した［1]。パラログタンパク質が発現することでリボソームに質的な違いが生じ、その違いがリボソーム自体の機能的な変化に寄与する可能性が推察される。L10-likeの翻訳との関わりを解明することを目的として、本研究では、同タンパク質のマウスにおける発現を精巣の発達段階に着目して精査した。
【方法】マウス組織由来の全RNA及びタンパク質電気泳動用サンプルを調製し、半定量的RT-PCR及びマウスL10-likeに特異的な抗体を用いた免疫ブロットにより組織毎のL10-likeの発現分布を調べた。また、マウス精巣の組織切片を作製し、蛍光免疫染色により同タンパク質の組織内分布及び細胞内局在を観察した。さらに、ショ糖密度勾配超遠心法により精巣リボソームを大きさ毎に分画し、L10-likeの各画分における存在量を解析した。
【結果】マウス組織の発現分布解析により、mRNAレベルおよびタンパク質レベルにおいて精巣でのみL10-likeの発現が検出された。生後、精巣が発達していくに従って、タンパク質レベルでL10-likeの発現量が上昇した。特に、精母細胞が出現する3週齢のマウス精巣から精母細胞の細胞質でL10-likeの発現が蛍光顕微鏡により明瞭に観察された。さらに、成熟した10週齢マウスの精巣において、精母細胞に加えて円形精子細胞の細胞質でL10-likeの発現が観察された。精母細胞は減数分裂を経て円形精子細胞に、さらに円形精子細胞は変態過程を経て精子になり、減数分裂開始期及び精子への変態開始期ではタンパク質の合成が亢進することが知られている。ショ糖密度勾配遠心法により分画されたマウス精巣リボソームにおいて、L10-likeはタンパク質レベルで、60S大サブユニット及び80Sリボソームに加えて、盛んに翻訳が行われているポリソームに存在した。これらの結果により、リボソームタンパク質L10-likeの発現量の上昇と翻訳亢進との関わりが示唆された。

［1] Sugihara et al., J. Proteome Res., 2010; 9, 1351-1366

ribosome, ribosomal protein, testis

講演番号：3C27p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ C校舎27会場

PAX2を介したアンドロゲン非依存性癌の発生・増殖制御メカニズムの解明

PAX2 promotes androgen independent prostate cancer.

○伊藤紗弥、上田崇、三木恒治（京都府立医大）
○Saya Ito, Takashi Ueda, Tsuneharu Miki (Kyoto Prefectural University of Medicine)

【目的】前立腺癌は男性ホルモンの影響で進行することが知られており、アンドロゲンの機能を遮断するホルモン治療が有効である。アンドロゲン依存性前立腺癌の増殖は、アンドロゲン依存的転写因子であるアンドロゲンレセプター(AR)による遺伝子発現を介して亢進されると考えられている。近年、前立腺癌細胞においてARの標的遺伝子や遺伝子発現制御を担う転写共役因子群が同定され、その遺伝子発現の分子制御機構が解明されつつある。一方、ホルモン治療抵抗性のアンドロゲン非依存性癌は効果的治療法に乏しく、その発生・増殖メカニズムの解明は臨床上非常に重要であるものの殆ど明らかにされていない。

そこで本研究では、アンドロゲン非依存性癌の発生や増殖を制御する新たな因子を見出し、その分子制御メカニズムを解明することを目的とする。

【方法】我々は前立腺癌の発生･増殖を制御する候補因子として､転写因子PAX2に着目した｡PAX2は器官形成の初期段階を制御することが知られ、ARとは異なる機序で前立腺の器官形成を促進すると考えられる。本研究では、PAX2の機能破綻により前立腺癌が発生・増殖する可能性を検討するため、前立腺癌細胞におけるPAX2の機能評価を行った。

【結果】PAX2が前立腺癌細胞や組織で発現していることを確認するために、前立腺癌細胞由来培養細胞株であるLNCaP、PC3、DU145におけるPAX2のmRNA及びタンパク発現を定量した。その結果、全ての癌細胞においてPAX2が高発現していることが確認された。次に、これら前立腺癌培養細胞を用いてPAX2の細胞増殖制御能を検討した｡PAX2を過剰発現させた前立腺癌細胞において細胞増殖の促進、PAX2ノックダウン細胞において細胞増殖の低下が観察された。またPAX2過剰発現下、ARの標的遺伝子PSAの遺伝子発現は変動しないことが明らかとなった。

以上の結果より、PAX2は前立腺癌において細胞増殖を亢進することが示唆された。また、その細胞増殖促進能はARを介した遺伝子発現制御とは異なる機序で発揮される可能性が示された。今後、前立腺癌におけるPAX2の転写共役因子を同定・解析し、その遺伝子発現制御メカニズムを解明することで、前立腺癌発生・増殖の分子制御メカニズムの一端を明らかにできると期待する。一連の解析により、PAX2の遺伝子発現を前立腺癌特異的に制御する因子を見出し、アンドロゲン非依存性癌治療における分子標的となりうる可能性を検証していきたい。

transcription, prostate cancer, PAX2

講演番号：3C27p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎27会場

タイトル；男性ホルモンは小胞体ストレスの制御により肥満を抑制する

Title ； Androgen regulates ER stress response to maintain suppress obesity in male

○佐藤隆史[1] 沢津橋俊[1] 三宅由花[1] 溝端健亮[1] 齋田佳織[1] 新福摩弓[2]
佐々木努[2] 北村忠弘[2] 柳瀬敏彦[3] 森和俊[4] 加藤茂明[5] 北川浩史[1]
○Takashi Sato[1], Shun Sawatsubashi[1], Yuka Miyake,[1] Kensuke Mizohata[1],
Kaoru Saida[1], Tsutomu Sasaki[2], Mayumi Shimpuku[2], Tadahiro Kitamura[2],
Toshihiko Yanase[3], Kazutoshi Mori[4], Shigeaki Kato[5], and *Hirochika Kitagawa[1]
（1. 群馬大・生体調節・核内情報；IMCR Gunma Univ., 2. 群馬大・生体調節・
代謝シグナル；IMCR Gunma Univ., 3. 福岡・医・内分泌；Med.Fukuoka Univ.,
4 京大院・理；Sci.Kyoto Univ.,, 5. 東大分生研 IMCB Tokyo Univ.）

【目的】近年、更年期男性における代謝疾患が増加傾向にあり、男性ホルモン（アンドロゲン）の分泌低下はその主要因と考えられている。我々は、過去に作製したアンドロゲン受容体（AR）遺伝子欠損マウス（♂ARKO）に観られる遅発性肥満のメカニズムを解析している。現在までの解析から、このマウスは摂食・代謝調節ホルモンであるレプチンに対する感受性が低下していることが明らかとなっており（レプチン抵抗性）、これが肥満発症の原因の一つと考えている。さらに最近になって、視床下部の小胞体ストレスがレプチン抵抗性の一素因となることが報告された。これらの背景から、我々は AR 欠損やアンドロゲン分泌低下がもたらすに肥満ならびに代謝機能異常が小胞体ストレスの制御の破綻に起因する可能性を考えた。本研究では、転写制御を介した小胞体ストレス制御と核内受容体 AR を介したアンドロゲンシグナルの相互クロストークについて検討を加える目的で以下の実験を行った。

【方法】♂ARKO マウスに小胞体ストレス軽減薬（ケミカルシャペロン）投与し、主たる表現系である遅発性肥満と効果を検討した。視床下部でのレプチン下流のシグナルの活性化とそれによるレプチンによる摂食や代謝におけるケミカルシャペロンの効果を同様に解析した。
さらに in vitro において、転写制御による小胞体ストレス修復系（Unfolded protein response; UPR 系）におけるアンドロゲン-AR の効果をルシフェラーゼアッセイで検討し、さらに UPR 系転写制御因子（ATF6、XBP-1）との相互作用を共免疫沈降法で検討した。

【結果ならびに考察】ケミカルシャペロン投与は♂ARKO の遅発性肥満とレプチン抵抗性をいずれも改善し、摂食抑制とエネルギー代謝亢進が見られた。さらに、♂ARKO の視床下部では、複数の小胞体ストレスが増加し、小胞体ストレスを修復する遺伝子の発現が低下していた。その結果、AR は UPR 系転写制御因子（ATF6、XBP-1）と相互作用し、UPR 系の転写活性を増強した。このように、雄性個体の代謝維持におけるアンドロゲン作用の一部は、転写制御を介した小胞体ストレスの修復とのクロストークにより発揮されることが強く示唆された。
今後、アンドロゲンシグナルと UPR 系のクロストーク破綻と、男性の代謝疾患における小胞体ストレス制御破綻の機序に注目したいと考えている。

Keyword1, andorogen receptor, Keyword2, ER stress, Keyword3, obesity

講演番号：3C27p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎27会場

オートファジーの活性化によるアンドロゲン受容体の発現調節について

Regulation of androgen receptor expression by activated autophagy

○三谷　塁一、南　真人、山地　亮一、原田　直樹、中野　長久[1]、乾　博
（大阪府大院・生命環境、[1]大阪女子短大）
○Takakazu Mitani, Masato Minami, Ryoichi Yamaji, Naoki Harada, Yoshihisa Nakano[1], Hiroshi Inui
(Osaka Pref. Univ, [1]Osaka Woman's Junior College)

【目的】前立腺がんは高齢者で高い罹患率を示すことから、高齢社会である我が国を含む先進国で大きな問題となっている。初期前立腺がんは男性ホルモンであるアンドロゲンとアンドロゲン受容体（AR）に依存した増殖を示すが、悪性化や転移した前立腺がんではARの発現が減少し、AR非依存的な増殖を示す。しかしARの発現量減少に関わる因子は未だ不明である。前立腺がんを含む多くの固形がんは、急激な細胞増殖による血管からの酸素供給の不足により生育環境が低酸素状態である。がんの悪性化に関与する低酸素下で前立腺がん細胞を培養すると、ARの発現量が減少することを見出した。本研究では低酸素したでのARの発現レベルを減少させる分子機構について検討した。
【方法】アンドロゲン依存性前立腺がん細胞株（LNCaP）を、常酸素下（21% O_2）または低酸素下（1% O_2）で培養し、ARのタンパク質およびmRNAレベルを検討した。またGFPタンパク質を融合させたARをアンドロゲン非依存性前立腺がん細胞株（PC-3）で安定的に発現させ、タンパク質合成阻害剤（CHX）存在下でARのタンパク質レベルを蛍光強度として数値化し、低酸素がARの半減期に及ぼす影響を検討した。LNCaP細胞をプロテアソーム阻害剤（MG132）もしくはオートファジー阻害剤（NH_4Cl、3-MA）存在下で低酸素に暴露し、ARの分解経路を検討した。
【結果】LNCaP細胞を低酸素下で培養したところ、常酸素下に比べてARのmRNAレベルは変動しなかったが、ARのタンパク質レベルは経時的に減少し、それに伴ってARの標的遺伝子（*NKX3.1*、*PMEPA-1*）のmRNAレベルも低下した。低酸素によるARの半減期への影響を検討した結果、低酸素暴露開始6時間までとそれ以降で分解速度が異なり、低酸素下でのARの分解速度に二相性があることが示された。低酸素によるARの分解亢進は、MG132で阻害されなかったが、NH_4Cl、3-MAにより阻害された。低酸素により核内AR量が減少し、リソソームを含む顆粒画分でARの蓄積が増加した。低酸素下においてオートファジーの誘導因子であるAMPKが活性化し、それに伴いオートファジーマーカーであるLC3-IIの蓄積が示された。AMPKの活性化剤（AICAR）存在下では常酸素培養下でもARの分解は亢進し、AMPK阻害剤（Compound C）の存在下で低酸素によるARの分解亢進は抑制された。AMPKは栄養枯渇や活性酸素種（ROS）の蓄積により活性化するので、抗酸化剤の存在下で低酸素暴露したところ、AMPKの活性化は阻害されARの分解亢進も抑制された。以上の結果から、低酸素下においてARはプロテアソーム系ではなく、オートファジー系により分解が亢進されることが示され、低酸素下で発生したROSがAMPKを活性化し、それによるオートファジーの誘導がARの分解亢進を惹起することが明らかとなった。

Keyword1 Androgen receptor, Keyword2 autophagy, Keyword3 hypoxia

講演番号：3C27p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎27会場

膵β細胞におけるアンドロゲン受容体の役割と高グルコース下での分解について

Role of the androgen receptor and its degradation under high glucose conditions in pancreatic β-cells

○増田　達哉、高橋　勇次、原田　直樹、山地　亮一、中野　長久[1]、乾　博（大阪府大・生命環境、[1]大阪女子短大）

○Tatsuya Masuda, Yuji Takahashi, Naoki Harada, Ryoichi Yamaji, Yoshihisa Nakano[1], Hiroshi Inui (OPU, [1]OWJC)

【目的】膵臓β細胞は、血糖値の上昇を感知してインスリンを分泌することで血糖値の恒常性維持に寄与する。そのため、β細胞の数と大きさの減少やグルコース応答不全は、インスリン分泌を減少させ、慢性的な高血糖状態、つまり糖尿病を発症させる。さらに、高血糖状態が持続することは、β細胞の量と質を低下させる糖毒性を生じさせ、糖尿病はより一層悪化する。近年、男性の2型糖尿病患者では血中テストステロン値が低いことや前立腺がん治療のために去勢術を施した男性では2型糖尿病発症率が上昇するという結果を受けて、糖代謝における男性ホルモンの重要性が近年注目されている。本研究では、アンドロゲン受容体（AR）を介した男性ホルモンシグナルがβ細胞の増殖に及ぼす影響と高血糖状態に暴露されたβ細胞におけるARの発現レベルについて検討した。

【方法・結果】Wister系雄性ラット（8週齢）より膵島を単離してウエスタンブロットにより解析した結果、ARの発現が認められた。さらに、膵臓組織切片を作製して詳細に検討した結果、ARはβ細胞の核に多く局在することが判明した。β細胞株であるINS-1細胞からAR高発現株（INS-1 #6）を単離した後、INS-1 #6細胞にテストステロン（0-1 μM）を添加して培養した結果、10 nM以上で濃度依存的に細胞増殖の促進が観察された。一方で、siRNAによりARをノックダウンするとテストステロンによる細胞増殖促進作用は消失したことから、テストステロンによるβ細胞の増殖亢進はARを介して発揮されることが明らかとなった。また、INS-1細胞を異なるグルコース濃度（5.5-22.2 mM）で培養した結果、高グルコース下においてARタンパク質が減少することを見出した。一方で、AR mRNAは高グルコース下でも減少しなかったことから、高グルコースによるARの減少は翻訳後の段階で調節されることが示唆された。高グルコースによるARタンパク質減少はプロテアソーム阻害剤であるMG132によって回復したことから、ARがユビキチンープロテアソーム系によって分解されることが判明した。さらに、外因性ARも高グルコースによってタンパク質レベルが減少し、ARの転写活性化能も減少した。カルシウムイオノフォアであるA23187を添加するとARの減少が観察された一方で、高グルコースによるARの分解は細胞内カルシウムキレート剤であるBAPTA-AMによって抑制された。これらの結果より、テストステロンはβ細胞に発現するARを介してβ細胞の増殖を促進すること、さらに、ARはグルコース濃度の上昇に伴って細胞内カルシウム濃度が上昇すると、ユビキチンープロテアソーム系により分解されることが明らかとなった。

androgen receptor, pancreatic β-cells, diabetes

講演番号：3C27p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎27会場

Y染色体遺伝子Utyは骨格性差形成を規定する

Y chromosome gene, Uty, defines sexual dimorphism in skeletal phenotype

○井上　和樹、松本　高広、今井　祐記、加藤　茂明（東大・分生研）
○Kazuki Inoue, Takahiro Matsumoto, Yuuki Imai, Shigeaki Kato(IMCB, Univ. of Tokyo)

哺乳類の雌雄間には、生殖器官や性行動等の様々な性差が存在する。中でも、骨長や骨量は、雄性が明確な優位を示すことが知られている。これまで、このような性差は、性ステロイドホルモン作用により構築されると考えられてきた。しかしながら、男性ホルモン受容体欠損雄マウスは、骨量減少をきたすものの、体長の雌性化を示さず、骨長の雄性化には性ホルモン非依存的な機構の存在が示唆された。中でも、遺伝学的な性差である Y 染色体遺伝子群の骨長雄性化への関与が推測される。しかしながら、現在までに Y 染色体遺伝子欠損マウスの作出成功の報告はなく、Y 染色体遺伝子群の性差構築における生理機能は不明であった。そこで、本研究では、軟骨細胞に発現する Y 染色体遺伝子 Uty に着目し、新規手法により遺伝子欠損マウスを作出し、骨組織における Y 染色体遺伝子の生理機能の解明を目的とした。

Y 染色体には反復配列が多く存在するため相同組み換え効率が低く、従来の置換型のターゲティングベクターでは正確な遺伝子組換えが不可能であった。この問題を克服するため、本研究では、組み換え効率の高い挿入型ベクターを用いた 2 段階ターゲティング法により、Uty floxed マウスを作出し、CMV-Cre マウスとの交配により、世界で初めて Y 染色体遺伝子欠損マウス作出に成功した。作出した全身性 Uty 遺伝子欠損マウス（UtyKO）は、生殖能力に異常を認めなかったものの、野生型雄マウスに比較して体長の短縮を認め、成長遅延を示した。骨格標本では、UtyKO は明らかな骨格形態の異常を認めなかったが、UtyKO の骨長は、野生型雄マウスよりも約 10%の短縮を示し、雌とほぼ同程度の長さを示した。骨長短縮の原因を探索するため、骨端成長板の組織学的解析を行ったところ、UtyKO では成長板軟骨層の長さの短縮を認め、特に、増殖軟骨細胞層の減少と肥大軟骨細胞層の増加が観察された。そこで、軟骨初代培養分化系を用いて分化アッセイを行った結果、UtyKO 由来細胞ではアルシアンブルーによる染色性の増加および肥大軟骨分化マーカー遺伝子 Col10a1 の発現上昇を認め、軟骨細胞分化の亢進が示唆された。これらの結果より、Uty が軟骨細胞の分化成熟を抑制することにより、増殖軟骨層を増大させ、骨長が伸長する可能性が示唆された。以上より、Uty が軟骨細胞分化制御を介して雄型の骨長を制御する可能性が示唆された。

本研究では、Y 染色体遺伝子欠損マウス作出・解析することにより、性差構築における Y 染色体の生理機能を初めて明らかにすることができた。

Y chromosome, sexual dimorphism, genetics

講演番号：3C27p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ C校舎27会場

ショウジョウバエ核内受容体 EcR をモデルとした新たな脂質代謝制御因子群の探索の試み

The approach of screening for novel regulatory factors involved in lipid metabolism, modeling after *Drosophila* nuclear receptor, EcR.

○鴨志田祐己、藤山沙理、木村周平、鈴木絵里子、林珍仙、武山健一、加藤茂明（東大・分生研）
○Yuki Kamoshida, Sally Fujiyama, Shuhei Kimura, Eriko Suzuki, Jinseon Lim, Ken-ichi Takeyama, Shigeaki Kato (The University of Tokyo, IMCB)

脂肪組織は、摂食によるエネルギー摂取が行えない時期にエネルギー源として利用される脂質を蓄積する器官である。動物はこの脂肪組織を活用し、富栄養状態の際には脂質を合成・蓄積し、栄養枯渇状態に陥った際にこれまで蓄積した脂質を燃焼してエネルギー源として利用することが可能になっている。この脂質代謝の反転の良例が昆虫の蛹化である。昆虫の蛹化では、摂食量の急激な変化に伴い、幼虫期に盛んに合成・蓄積した脂質を蛹期にはエネルギー源として消費する、という脂質代謝の反転が生じる。蛹化は時期特異的に分泌される変態ホルモン・エクダイソンが核内受容体・エクダイソンレセプター(Ecdysone receptor:EcR)によって受容されることにより誘導される。核内受容体はリガンド依存的に標的遺伝子の発現制御を介して生理作用を発揮する転写因子群であり、EcR も転写制御を介して脂質代謝経路の調節を行うと考えられるが、その転写制御機構には不明な点が多い。脂質代謝の研究において、*in vivo* での表現型解析は重要であり、ショウジョウバエでは分子遺伝学的手法を用いた個体レベルの解析が容易であるという利点がある。そこで本研究では、ショウジョウバエ分子遺伝学を利用して、EcR による脂質代謝制御機構の解析と同時に、EcR の転写制御を介して脂質代謝を制御する新規因子群の探索を試みた。

まず、EcR による脂質代謝制御の検証のため、GAL4-UAS システムを用いてショウジョウバエの脂肪組織である Fat body で特異的に EcR をノックダウンし、トリグリセリド(TG)定量、および中性脂肪を Nile red により染色することで脂質蓄積量を検討した。その結果、EcR のノックダウンにより、3 齢幼虫において脂質蓄積量の増加が認められた。さらに EcR の co-activator である taiman や Chromatin remodeler の Nurf complex のノックダウンにおいても同様の結果を得られたことから、EcR は転写制御機構を介して脂質蓄積を抑制することが示唆された。続いて、EcR の脂質蓄積の制御に関与する標的遺伝子を探索し、既知の脂質代謝制御因子 E75B、adp や細胞増殖因子 dMyc が Fat body における EcR 標的遺伝子であることが示唆された。さらにこれらの遺伝子をそれぞれノックダウンした時の脂質蓄積量を TG 定量により検討したところ、EcR のノックダウンの結果と一致していた。

以上の結果より、EcRはFat bodyにおいて、E75B, adp, dMycの発現制御を介して脂質蓄積量を抑制する機能があることが示された。今回の結果より、分子遺伝学的手法を用いて脂質蓄積量を指標としたスクリーニング系の構築により、新たなEcRの転写共役因子の探索が可能となると期待できた。さらに、同定した因子の哺乳類ホモログの解析を通じて、EcRの哺乳類ホモログであるLXR, FXRの転写制御機構の解明や、LXR, FXR転写制御を介したメタボリックシンドロームの治療法等の分子基盤の確立に繋がることが期待される。

Keyword1, EcR　Keyword2, Drosophila　Keyword3, lipid metabolism

講演番号：3C27p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ C校舎27会場

タイトル　熱ショックにより誘導されるショウジョウバエ*hsp70* mRNAはそのアンチセンス転写産物より産生される内因性siRNAにより分解される

Title　Degradation of hsp70 mRNA in Drosophila via its own siRNA derived from a pair of *hsp70* mRNA and its antisense transcripts during heat shock recovery in *Drosophila*.

○鈴木絵里子[1]、伊藤　紗弥[1]、林　珍仙[1]、木村　周平[1]、中村（藤山）　沙理[1]、鴨志田　祐己[1]、泊　幸秀[1, 2]、加藤　茂明[1]、武山　健一[1]　（１東大・分生研　２東大・新領域）

○Eriko Suzuki[1], Saya Ito[1], Jinseon Lim[1], Shuhei Kimura[1], Sally Fujiyama-Nakamura[1], Yuki Kamoshida[1], Yukihide Tomari[1,2], Shigeaki Kato[1], Ken-ichi Takeyama[1]　([1] IMCB, The University of Tokyo, [2] Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

生物の細胞内に存在する 20-25 塩基程の一本鎖非コード RNA である small RNA は遺伝子発現抑制を介して広範な生命現象に関与する。Small RNA の一種である small interference RNA (siRNA) は mRNA cleavage やクロマチン制御を介して、遺伝子発現を抑制すると考えられている。近年の網羅的解析により、トランスポゾン由来 siRNA が多数発見され、それら siRNA がトランスポゾンを抑制することが示唆されている。一方、内因性遺伝子由来 siRNA の存在が判明しているものの、それら機能は未だ明確にされていない。我々はショウジョウバエにおいて、heat shock により発現誘導性の *hsp70* 遺伝子座から anti-sense 転写産物が発現すること、及び、small RNA が発現することを見出した。近年、anti-sense 転写産物が認められる遺伝子領域から、内因性 siRNA が産生されることが報告されており、*hsp70* 遺伝子由来 small RNA は内因性 siRNA である可能性が考えられた。そこで、ショウジョウバエ分子遺伝学手法を用い、RNA interference (RNAi)経路因子であるである *dcr-2* 及び *Ago2* 遺伝子欠損変異体における、*hsp70* 遺伝子由来 small RNA の発現量を検討した。その結果、*hsp70* 遺伝子由来 small RNA の発現減少が認められ、*hsp70* 遺伝子由来 small RNA は siRNA であることが示唆された。Heat shock によって発現誘導される *hsp70* mRNA は heat shock 後に速やかに分解されるが、*dcr-2* 及び *Ago2* 遺伝子変異体では、heat shock 後の *hsp70* mRNA 分解が阻害されており、*hsp70* 遺伝子由来 siRNA が heat shock 後における *hsp70* mRNA 分解に寄与することが示唆された。本研究により、内因性遺伝子由来 siRNA が細胞外刺激に応答した mRNA 分解制御の一端を担っていることが示された。

RNAi,　*Drosophila*, *hsp70*

講演番号:3C27p13
講演日時、会場:3月24日16:21～ C校舎27会場

タイトル 核内受容体HNF4αの翻訳後修飾の網羅的同定

Title　Multiple post-translational modifications in Hepatocyte nuclear factor 4α

○横山敦、桂彰吾、伊藤亮、橋場和華、関根弘樹、藤木亮次、加藤茂明（東大、分生研）

○Atsushi Yokoyama, Shogo Katsura, Ryo Ito, Waka Hashiba, Hiroki Sekine, Ryoji Fujiki and Shigeaki Kato （IMCB, Univ. of Tokyo）

タンパク質は翻訳後修飾を受けることにより動的に機能制御されていることが知られている。すなわちタンパク質の翻訳後修飾は、遺伝子の数だけでは説明できないタンパク質の質的な多様性を説明しうるものであると考えられる。

これまでタンパク質の翻訳後修飾の解析は、主に放射性同位体ラベルされた特定の修飾基供与体を用いることで行われてきたため、ある特定のタンパク質が受ける翻訳後修飾を無作為に同定することは困難であった。しかしながら、近年の質量分析計の発展により、高感度かつ無作為な翻訳後修飾の同定が可能となってきた。そこで本研究では、オーファン核内受容体HNF4αをモデルとして、そのタンパク質上の翻訳後修飾を網羅的に同定し、翻訳後修飾による新たな機能制御を明らかにすることを試みた。

HNF4α（Hepatocyte nuclear factor 4α）は主に肝臓に発現するオーファン核内受容体であり、細胞外栄養濃度に依存して肝臓特異的な代謝酵素の遺伝子発現を制御していることが知られている。肝臓由来細胞株HepG2細胞より内因性HNF4αを精製した後、LC-MS/MS測定およびMS/MSスペクトルのコンピューター解析を行った。結果、既知リン酸化サイトである142番目のセリンをはじめ、これまで知られていなかったユビキチン化、アセチル化など計8か所の翻訳後修飾サイトの同定に成功した。

これら全てのアミノ酸に対して点変異を導入し、HNF4αの遺伝子発現に与える影響について解析を行ったところ、458番目のリジンのアセチル化が最もHNF4αの転写活性に影響を与えたためこれに注目した。アセチル化を受けない変異体ではHNF4αの転写活性が2倍上昇したのに対し、アセチル化ミミック変異体ではHNF4αの転写活性の減弱が認められた。さらに興味深いことに、このアセチル化は細胞外のグルコース濃度に応じて変動することが明らかとなった。したがって、このアセチル化修飾を介したHNF4αの転写制御は、細胞外栄養濃度によるHNF4αの転写制御の一端を説明する新たなメカニズムであることが予想される。(Yokoyama et al., Biochem Biophys Res Commun, 2011)

Keyword1, post-translational modification Keyword2, HNF4 • Keyword3 acetylation

講演番号：3C27p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎27会場

PPARγにおける新規翻訳後修飾の探索

Searching for novel post-translational modifications of PPARγ

○桂　彰吾、横山　敦、藤木　亮次、加藤　茂明（東大分生研）
○Shogo Katsura, Atsushi Yokoyama, Ryoji Fujiki, Shigeaki Kato (IMCB, University of Tokyo)

【目的】ポストゲノム時代において、遺伝子の数だけでは生命現象の多様性を説明できないことが大きな問題となっている。この問題を説明し得る概念として、エピゲノム及び翻訳後修飾(PTMs)が知られている。転写量を規定するエピゲノムに対し、PTMsはタンパク質に機能調節を生じさせることで、タンパク質の機能の多様性を生み出す。これまでに、機能調節を担う数多くのPTMsが見出されているが、近年の質量分析計の発展により、新規PTMsが同定される可能性は十分に考えられる。本研究では、PTMsを受けるタンパク質として、脂質代謝や脂肪細胞分化など、様々な機能を担う核内受容体であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPARγ)に注目した。脂肪細胞のPPARγは、リン酸化を受けることにより、標的の糖尿病関連遺伝子の発現制御における機能が調節されることが示されている。しかしながら、PPARγに関してこれまで同定されたPTMsはリン酸化とSUMO化のみであり、PPARγの多くの生理作用を考慮すると、新規PTMsが存在する可能性は十分に考えられる。そこで本研究では、PPARγ上に生じるPTMsを網羅的に同定することで、PPARγの新たな制御機構の解明を目指す。解析に用いるモデルとして、PPARγが発現するがその機能が十分解明されていない細胞である大腸癌及びマクロファージを用いた。PPARγは、大腸癌細胞とマクロファージにおいてそれぞれ腫瘍抑制作用と抗炎症作用を示すことが知られているものの、その分子制御機構には不明な点が多い。そこで、大腸癌及びマクロファージおけるPPARγの新規PTMsを同定し、PPARγの機能調節への影響について解明することを本研究の目的とした。
【方法】当グループでは、核内受容体HNF4αの精製系を構築し、網羅的なPTMsの同定に成功している（Yokoyama *et al. BBRC* 2011)。この精製系及びPTMs同定系を用いてPPARγの新規PTMsの同定を試みた。まず、大腸癌由来のCaco-2細胞及びマクロファージ様細胞に分化したTHP-1細胞より、内在性PPARγを精製した。得られたPPARγについてLC-MS/MS解析、続いてMODIRO解析を行うことで、PPARγの新規PTMsを同定した。
【結果】Caco-2細胞より内在性PPARγの精製に成功した。さらに精製したPPARγのPTMsを網羅的に解析した結果、既知のPTMの他に、いくつかの新規PTMsを見出した。今後はこれらの新規PTMsが、転写制御をはじめとしたPPARγの機能にどのように関与しているかについて解析していく予定である。また、PPARγには疾病に関連するいくつかの遺伝子多型が知られており、これらの多型がPTMsと関連するかについても注目していきたい。

PPARγ, post-translational modification, colon cancer

講演番号：3C28a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ C校舎28会場

ラッキョウ由来多糖フルクタンを用いた無血清細胞凍結液による細胞保護効果

Serum-free cryopreservative solution using rakkyo fructan for animal cells

○小川 亜希子、宮野 靖子、水井 慎也[1]、清水 雅史[1]、寺田 聡[1]、大浦 剛[2]、小林 恭一[2]、
安川 沙織[3]、森山 展行[3]（鈴鹿高専、福井大院工[1]、福井県食加研[2]、エル・ローズ[3]）
○Akiko Ogawa, Yasuko Miyano, Sinya Mizui[1], Masafumi Simizu[1], Satoshi Terada[1],
Takeshi Ohura[2], Kyo-ichi Kobayashi[2], Saori Yasukawa[3], Nobuyuki Moriyama[3]
(SNCT, [1]Grad. Eng., Univ. Fukui, [2]Fukui Pref. Food Proc. Res., [3]ELLE ROSE)

【目的】動物細胞の長期保存法として、凍結保存が実施されている。従来、凍結保存液には牛などの血清が使用されてきたが、人畜共通病原体への感染リスクや細胞変質を誘発するなどの問題がある。さらに、凍結保護剤として使用されるジメチルスルオキシド（DMSO）は、凍結解凍後の細胞に有害であるため、使用濃度の低減化が求められている。本研究で我々は、ラッキョウフルクタンを用いた無血清でDMSO低減型の凍結保存液を構築し、その細胞保護効果を検討した。
【方法】細胞凍結保存液の構築にはマウスハイブリドーマ２Ｅ３-0を、細胞保護効果検討にはCHOーDP12（ATCC, CRL-12445）を使用した。これらの細胞は、無血清培養後にラッキョウフルクタンを含む細胞凍結液で凍結保存を実施した。-80℃で一定期間保存後に、解凍して再び無血清培養を行った。なお、凍結保護剤には、DMSO、プロピレングリコール（PG)、エチレングリコール(EG）のいずれかを用いた。
【結果】解凍直後の生存率は、凍結保存液中のフクルタン含有率が30-45%で最も高く、DMSO添加によってさらに向上した。また、凍結保護剤としてEGまたはPGを使用した場合には、生存率がEGやPGが一定濃度以上でDMSO含有凍結液と同等であった。

cryopreservation, rakkyo fructan, serum-free

講演番号：3C28a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ C校舎28会場

リラキシン関連因子（RLF）の受容体RXFP2/LGR8発現昆虫細胞安定株の作製

Isolation of RXFP2/LGR8 expressing stable insect cell line

○加藤　光、Vipin Kumar Deo[1]、高坂　哲也、朴　龍洙[1]（静大院・農・応生化、[1]静大・創科院）
○Hikaru Kato, Vipin Kumar Deo[1], Tetsuya Kohsaka, Enoch Y.Park[1]（Appl. Bioc., Grad. Sch. Agric., Shizuoka University., [1]Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka University.）

【目的】肉用牛・乳用牛の受胎率が、年々低下してきている。このような現象は日本のみならず世界的な規模で発生し、進行している。牛などの反芻動物の受胎には、他の哺乳類と異なりリラキシン関連因子（RLF）とその受容体であるRXFP2/LGR8が機能していると考えられている。RXFP2/LGR8は7回膜貫通タンパク質であり、RLFと結合することで細胞内のcAMP濃度を上昇させる。本研究では、受容体RXFP2/LGR8の構造・機能をより深く調査するために昆虫細胞Tn5に遺伝子を導入することで受容体発現安定株を作製することを目的とした。
【方法】PCRによってシグナルペプチドとFLAGタグの遺伝子配列を連結させたマウスRXFP2/LGR8遺伝子を増幅した。形質導入に用いるpIB/V5-Hisベクターにその遺伝子を挿入し、pIB/FLAG-RXFP2を構築した。6穴プレートに昆虫細胞Tn5を1×10^5個播き、細胞を底に付着させた。上清を取り除き、形質導入試薬とpIB/FLAG-RXFP2を混合した培地１ mlを新たに加え、27℃で5時間培養した。2 mlの培地を新たに加え、そのまま2日間培養した。その後上清を取り除き、抗生物質であるブラストシジンを80 μg/mlになるよう加えた3 mlの新しい培地で培養した。この培地を3日毎に交換し、同じ条件で培養したコントロールの細胞が全て死滅するまで繰り返した。細胞が形成したコロニーを96穴プレートに移し、細胞が十分増えるまで培養した。そこからさらに24穴、6穴プレートと移していきスケールアップを行った。そして受容体の発現と局在を確認するために免疫染色を行い、受容体の活性の有無を確認するためにヒトRLF/INSL3を供しcAMPの増加を酵素免疫測定法によって測定した。
【結果】ブラストシジンを含んだ培地でRXFP2/LGR8を発現する昆虫細胞Tn5を単離した。スケールアップとスクリーニングで得た細胞株に対し行った免疫染色により細胞全体にRXFP2/LGR8が発現していることが分かった。またすべての細胞に受容体の発現が認められた。そして0～25 nMのヒトRLF/INSL3をRXFP2/LGR8発現細胞株に用いることで細胞内cAMP量が0.02～49 pmolまで上昇した。このデータは作製した安定細胞株はRXFP2/LGR8を発現していることを示唆する。

RXFP2/LGR8, Tn5 cell, RLF

講演番号：3C28a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎28会場

昆虫細胞を用いたヒトABCB6の大量発現および精製

Large scale expression and purification of human ABCB6 in insect cells

○大貫　元[1]、木村　泰久[1]、　松尾　道憲[1]、　木岡　紀幸[1]、　植田　和光[1,2]（[1]京大院・農・応用生命、　[2]京大iCeMS）

○Hajime Ohnuki[1], Yasuhisa Kimura[1], Michinori Matsuo[1], Noriyuki Kioka[1], Kazumitsu Ueda[1,2]
([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ, [2]iCeMS, Kyoto Univ)

【目的】ABCトランスポーターはATP加水分解と共役し、様々な物質の輸送を行う膜タンパク質ファミリーである。ABCトランスポーターは1機能分子内に膜貫通ドメイン（TMD）とヌクレオチド結合ドメイン（NBD）をそれぞれ２つずつ持つ。half-sizeのABCトランスポーターはTMD,NBDを分子内に1つずつしか持たず、二量体形成が機能に必要である。ABCB6(MTABC3)はミトコンドリア外膜に存在するhalf-sizeのABCトランスポーターであり、ホモ二量体を形成することでヘムやcoproporphyrinogenⅢなどのポリフィリン前駆体をミトコンドリア内へと輸送する働きを担っていると考えられている。しかし、生化学的な解析を行ったという報告はなく、その詳細な機能については未だよく分かっていない。そこで本研究では、昆虫細胞発現系を用いて、ヒト由来ABCB6の大量発現および精製を行うことを目的とした。
【方法】本研究では哺乳類細胞を用いて安定性評価などの定性的実験を行い、次いで昆虫細胞系を用いて大量発現系の構築を行った。まず始めにABCB6の精製に最適な界面活性剤の探索を行った。ヒト由来ABCB6のC末端にEGFPを結合させたABCB6-EGFPをFreestyle293に一過的に発現させ、得られた膜画分を様々な界面活性剤で可溶化したのち、蛍光ゲル濾過法(FSEC) を用いてタンパク質の安定性を評価した。続いて昆虫細胞(sf9)とバキュロウイルスを用いたABCB6-EGFPの大量発現系構築を行った。得られた膜画分を用いて、His-tag/Ni-NTAによるIMAC精製を行い、精製標品の純度、分子量および単分散性を評価した。
【結果】Freestyle293に一過的に発現させたABCB6-EGFPは、様々な界面活性剤中で単分散性を維持していた。なかでも非イオン性の界面活性剤である$C_{12}E_8$中での安定性が高かったことから、精製の際に用いる界面活性剤には$C_{12}E_8$を採用した。続いてsf9を用いてABCB6-EGFPの大量発現と精製を行った。精製標品の銀染色から純度は…であることが分かった。また収量は340 μg/Lであった。ついでゲルろ過により精製標品の分子量を測定したところ、およそ390 kDaと算出された。これはABCB6のホモ2量体に$C_{12}E_8$ミセルの見かけの分子量を加えたものとよく一致した。また、ゲルろ過の溶出パターンから、精製標品においてはその一部が凝集体を形成しているものの、概ね単分散性を維持していることが確認できた。これらの結果より、ABCB6-GFPは昆虫細胞を用いた系によって二量体構造を保ったまま精製できることが明らかとなった。

ABCB6, large scale expression, functional analysis

講演番号：3C28a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎28会場

Ligation-independent cloning法を用いたカイコ-バクミド発現系用ベクターの構築

Construction of ligation-independent cloning vectors for protein expression in silkworm-bacmid system.

○加藤　竜也、ﾄﾝﾌﾟｿﾝ ｼﾞｪｰﾑｽ[1]、朴　龍洙[2]（静岡大農・応生化、[1]メイヨ医科大学、[2]静岡大・創科技院）

○Tatsuya Kato, James R. Thompson[1], Enoch Y. Park[2] (Fac. of Agric., Shizuoka University, [1]Mayo clinic college of medicine, [2]Grad. Sch. Sci. & Technol., Shizuoka University)

【目的】カイコを用いた組換えタンパク質生産は、カイコの持つ非常に高いタンパク質生産能を有するため注目されている。本研究室においても現在までに、カイコーバクミド系を用いて様々なタンパク質を活性を有する状態で発現し、精製を行っている。本研究では、ライゲーション反応を用いることなく目的遺伝子をクローニングすることができる、T4DNAポリメラーゼを用いたligation-independent cloning (LIC)法を用いて、目的遺伝子をクローニングできるベクターを構築し、カイコーバクミド系でタンパク質生産および精製を行った。
【方法】カイコ-バクミド系でよく用いられるベクターであるpFastBac1（Invitrogen)に様々なタグ配列を持つLICカセットを挿入し、LICベクターを構築した。これらベクターを用いて、ヒト由来 Triglyceride transfer protein (hMTP)-Protein disulfide isomerase (PDI)複合体および、α-ketoglutarate dehydrogenase複合体サブユニット（E1, E2, E3）をカイコで生産・精製を行った。
【結果】はじめにC末端側にストレプタグII、6×ヒスチジンタグ、EGFPを融合できるLICベクターを構築し、それらベクターにそれぞれ、hMTPおよびhPDI遺伝子を挿入した。C末端にストレプタグIIを結合させたhMTPと同じくC末端側に6×ヒスチジンタグを結合させたhPDIをカイコーバクミド系を用いて共発現させた。カイコ脂肪体破砕液からTALONアフィニティクロマトグラフィーとStrepTactin agaroseカラムクロマトグラフィーを用いて精製を行い、1頭のさなぎあたり約 10μgのhMTP-hPDI複合体を精製することができた。またN末端側にストレプタグII、6×ヒスチジンタグ、FLAGタグを融合できるベクターを構築し、それぞれのベクターにE1, E2, E3サブユニット遺伝子を挿入した。N末端側にストレプタグIIを融合させたE1サブユニット、6×ヒスチジンタグを融合させたE2サブユニット、FLAGタグを融合させたE3サブユニットを、それぞれカイコ-バクミド系を用いて発現させた。それぞれのサブユニットをカイコ脂肪体から、それぞれStrepTactin agaroseカラムクロマトグラフィー、TALONアフィニティクロマトグラフィー、anti-FLAG M2 antibody agaroseクロマトグラフィーにより精製できた。特にE3サブユニットはカイコ脂肪体からanti-FLAG M2 antibody agaroseクロマトグラフィーにより、約1200倍精製された。現在はE1-E2-E3複合体の発現および精製を行っている。本研究で構築したベクターにより、様々なタグを持つタンパク質の迅速な発現が可能である。

Ligation-independent cloning, Silkworm, BmNPV bacmid

講演番号：3C28a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ C校舎28会場

カイコ発現系を用いたヒトパピローマウイルスL1タンパク質ウイルス様粒子の生産および精製

Virus-like particles of human papillomavirus L1 major capsid protein and chimeric forms produced and purified using silkworm expression system

○Muthukutty Palaniyandi、加藤　竜也[1]、朴　龍洙（静岡大・創科技院、[1]静岡大農・応生化）
○Muthukutty Palaniyandi, Tatsuya Kato[1], Enoch Y. Park (Grad. Sch. Sci. & Technol., Shizuoka University, [1]Fac. of Agric., Shizuoka University)

【Aim]】Virus-like particles (VLPs) are composed of capsid proteins which are promising vaccine candidate for various diseases. Major capsid protein of human papillomavirus (HPV) L1 can be used as ideal candidate to produce VLPs for vaccine against genital warts and laryngeal papillomatosis. In this study, we had expressed and purified HPV 6b L1 capsid protein using baculovirus expression system in silkworm larvae.

【Methods】 Two constructs, full length L1 (500a.a), a C-terminal deleted Short L1 (479 a.a) and three PCR manipulated antigenic loops at amino acids 55-56, 174-175, 348-349 regions, incorporated with whole enhanced green fluorescent protein (EGFP). These genes were PCR-amplified and used for construction of recombinant *Bombyx mori* nucelopolyhedrovirus (BmNPV) bacmid expression system. The proteins were successfully expressed in silkworm larvae and proceed further with purification

【Results】 All the five proteins were subjected to purification using HiTrap™ Heparin columns to separate target proteins from contaminating proteins and target proteins were confirmed by SDS-PAGE and Western blot. Also, to achieve near homogeneity strong cation exchange chromatography using Mono S column was used for getting maximum purity. Transmission electron microscopy analysis confirmed the presence of self assembled VLPs. In conclusion, HPV 6b L1 major capsid protein was successfully expressed in silkworm and purified, and effective manipulated in the antigenic regions sow the path to versatile vaccine development using HPV L1 VLPs as base.

Virus-like particles, Human papillomavirus, Silkworm expression system

講演番号：3C28a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ C校舎28会場

カイコ幼虫を用いたBmNPV表面上への*Neospora caninum*抗原タンパク質の提示

Display of *Neospora caninum* antigens using BmNPV bacmid in silkworm larvae

○大月 隆寛、董 金華[1]、加藤 竜也、朴 龍洙[1]（静岡大農・応生化、[1]静岡大創科技院）

○Takahiro Otsuki, Jinhua Dong[1], Tatsuya Kato, Enoch Y Park[1](Dept. of Appl. Biol. Chem., [1] Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】*Neospora caninum*はアピコンプレックス門の寄生性原虫の一つである。終宿主としてイヌに、また中間宿主として様々な哺乳動物に感染する。通常は不顕性感染となり、大きな問題となることはないが、感染が顕性となると死産や流産が頻発する。特にウシをはじめとする家畜で問題となっている。我々の研究はこの寄生性原虫に対するワクチンをカイコ幼虫およびバキュロウイルスディスプレイ法を用いて生産することを目的とする。

【方法】最初にカイコを用いた発現系で抗原性のある*Neospora caninum*のタンパク質が生産できるかを検討した。カイコで組換え抗原タンパク質を生産させるために、バキュロウイルス発現系の発現ベクターであるBmNPVバクミド（BmNPV bacmid/bx-FLAG-SRS2, BmNPV bacmid/bx-FLAG-SAG1, BmNPV bacmid/bx-FLAG-MIC3, BmNPV bacmid/bx-FLAG-DG1, BmNPV bacmid/bx-FLAG-GRA2, BmNPV bacmid/bx-FLAG-BAG1）を構築し、5齢カイコ幼虫に注射しカイコ幼虫体内で組換え抗原を生産した。生産した組換え抗原の抗原性をELISAにより確認した。次に抗原性の確認された3種類の抗原タンパク質（NcSRS2, NcSAG1, NcMIC3）をバキュロウイルス表面に提示するためにバキュロウイルスエンベロープタンパク質のGP64と融合させた。

【結果】カイコ幼虫では原虫表面に由来するNcSAG1とNcSRS2、分泌器官のミクロネームに由来するNcMIC3のタンパク質をコードする遺伝子の発現がウエスタンブロットにより確認された。確認された分子量はそれぞれ約41 kDa, 約50 kDa, 約42 kDaであった。またそれら3種類の組換えタンパク質をプレートに固定し、*Neospora caninum*感染陽性ウシ血清との反応をELISAで確認したところ陰性血清と比較して高い値を示した。また、この3種類の組換え抗原をFLAGタグによるアフィニティークロマトグラフィーで精製したところ、カイコ1匹あたり10 ～ 50 μgの抗原を回収できた。これら3種類の組換え抗原はGP64との融合タンパク質はウエスタンブロッティングでそれぞれ約110 kDa, 約115 kDa, 約110 kDaにバンドが確認された。これはGP64のみの分子量である約60 kDaより大きく、融合タンパク質として発現されたことが示された。現在、免疫電顕法によりこのGP64融合組換え抗原がBmNPV表面上に提示されているか確認中である。

Silkworm, BmNPV, *Neospora caninum*

講演番号:3C28a07
講演日時、会場:3月24日10:16～ C校舎28会場

新規牛ネオスポラ症診断法の開発

Development of a novel diagnostic method for cattle neosporosis

○董　金華、大月 隆寛[1] 、加藤 竜也[1] 、朴 龍洙（静岡大・創科技院、[1]静岡大農・応生化）

○Jinhua Dong, Takahiro Otsuki[1], Tatsuya Kato[1], Enoch Y. Park (Grad. Sch. Sci. & Technol., Shizuoka University, [1]Fac. Agric., Shizuoka University)

【目的】ネオスポラ症はネオスポラ原虫(*Neospora caninum*,Nc)が感染して、流産死産を起こす疾患である。1984年犬で原虫による神経病としてノルウェーで初めて報告された。その後ネオスポラは新種の原虫として確認され、多くの哺乳動物（牛、犬、山羊、羊、馬など）において、感染が確認された。牛の場合、汚染された水、餌を摂取することによりネオスポラ症を感染される。牛と牛との間の水平感染が観察されていないが、母牛から経胎盤感染する垂直感染が高い確率で発生する。特に妊娠牛が感染すると、季節を問わずに流産、死産、ミイラ胎児の娩出がおこり、新生子牛の神経症状などが認められることもある。流産胎齢は３～８ヶ月が多く、繰り返し流産することもある。日本ではネオスポラ症は届出伝染病として、監視されているが、近年発生する件数が増加している傾向がみられている。しかし、現在牛ネオスポラ症に対した有効な治療法はなく、感染をした場合、現在のところ処分する以外手段はない。本研究は組換え体ネオスポラカニナムタンパク質を用いた新しい診断法を開発することを目的とした。

【方法】ネオスポラカニナム原虫タンパク質の遺伝子GRA2,SRS2及びSAG1を原虫ゲノムDNAから増幅した。増幅したGRA2及びSRS2遺伝子をpMALベクターに組込み、大腸菌BL21で発現を行った。発現されたMaltose Binding Protein(MBP)融合GRA2及びSRS2はTalon Metal Beadsにて精製を行った。一方、SAG1遺伝子に関してはゲノムDNAから増幅された後、pENTR/Dにクローニングし、さらにGateway Technology及びBac-to-Bacシステムを用いて組換Bacmidを作成し、カイコ幼虫に注射してSAG１を発現した。発現されたSAG1はAnti-FLAG M2 Affinity Gelによって、精製を行った。この３種類の組換蛋白質の抗原性はネオスポラ症陽性血清を用いたELISAで確認した。さらにこの三種類タンパク質を共固定し、ELISA法によって、ウシ血清サンプルを評価した。

【結果】ネオスポラカニナムタンパク質NcGRA2,NcSRS2及びNcSAG1は大腸菌或いはカイコで発現させて、精製を行った。SDS-PAGEに供し、いずれもシングルバンドが観察された。またそれぞれに付加されたTag抗体でWestern Blotを行い、それぞれの分子量は64kDa, 90kDa及び38kDaで、推測された分子量と一致した。さらに組換えタンパク質は牛ネオスポラ陽性血清に含まれた抗ネオスポラ抗体と結合し、それらの抗原性も確認された。終濃度１ μg/mlのMBP-NcGRA2, 0.5 μg/mlのMBP-NcSRS2及び0.25 μg/mlのNcSAG1を共固定化して、ネオスポラ症陽性血清の12検体及び陰性の20検体を用いて本診断法を評価した。陽性血清検体の中に11検体が陽性として検出でき、本法の感度は92%であった。また陰性血清はすべて正しく診断でき、100%の特異性が示唆された。さらに牛農場から収集された90検体の血清サンプルもテストして、1個の陽性血清が検出され、並行で用いた市販キットと同じ結果が得られ、本診断法の実用性が示唆された。

neosporosis, diagnosis, bacmid

講演番号：3C28a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ C校舎28会場

培養基材の幾何学的性質が細胞挙動へ与える影響の解析

Analysis of geometric effect of culture substrate on cell behaviors

○吉村 英晃、末　信一朗[1]、藤田 聡[1]（福井大院・工・生物応用、[1]福井大院・工・ファイバー）

○Hideaki Yoshimura, Shin-ichiro Suye[1], Satoshi Fujita[1] (Dept Appl Chem Biotechnol, University of Fukui, [1]Dept Fiber Amenity Eng, University of Fukui)

【目的】筋繊維や神経などの生体組織の再生の足場として、これまでもちいられてきた材料は、ハイドロゲルやスポンジ状の高分子材料などの均質な材料である。ところが、生体組織は細胞が規則正しく配列した構造を形成しているため、これらの構造を模倣した異方性の高い足場材料が、効率的な組織修復という観点ではより望ましいと考えられる。しかしながら、細胞の足場となる構造の幾何学的性質が細胞挙動に与える影響はいまだ十分に理解されていない。そこでわれわれは、細胞を取り囲む構造がナノメートルサイズの繊維から成る細胞外マトリクスで構成されていることに着目し、細胞の接着足場たる培養基材の幾何学的性質が細胞挙動に与える影響を、ナノファイバーを用いた培養基材により解析した。本発表では、エレクトロスピニング法により、ナノファイバーを一方向に配列させた表面を有する培養基材を作成し、この基材上での、間葉系細胞の伸展および増殖等の細胞機能を評価した結果を報告する。

【方法】ナノファイバー基材の作製：ポリウレタン溶液(分子量 60,000；濃度 12.5%；溶媒 tetrahydrofuran ： dimethylformamide = 95:5)をエレクトロスピニング法により紡糸することで、ガラス板上にナノファイバーが担持された培養基材を作製した。配向性を有するファイバーは、コレクタを 1800 rpm で回転させることで、無配向のファイバーは回転させずに作成した。ナノファイバー基材上での細胞培養：作製したナノファイバーに酸素プラズマ処理を施した後、ヒト骨髄由来初代間葉系幹細胞を播種した（培地：DMEM/10% FBS)。培養後 24 時間および 48 時間後に免疫染色により細胞数、細胞の伸展面積、方向を観察した。画像解析：ナノファイバーと細胞の配向性、および細胞の伸展面積・細胞数は、いずれも ImageJ をもちいた画像解析により定量した。

【結果】コレクタを回転させることで高い配向性を有するナノファイバー基材を作製できた。ファイバー径は配向性を有する場合と無配向の場合では有意差はなかった。配向性を有するナノファイバー上で培養した間葉系幹細胞はファイバーに沿って一方向に伸展しているとともに、無配向のファイバー上と比較して細胞面積が小さくなる傾向がみられた。さらに、培養24時間後から48時間後への細胞数の増加から算出した倍加時間を比較したところ、配向性を有したファイバー上では無配向のファイバー上と比較して細胞の増殖が速い傾向がみられた。

【結言】以上より、培養環境の生化学的要因が一様であっても、培養基材の幾何学的性質という物理的要因により、細胞挙動を直接制御できる可能性が示された。増殖速度の向上は一方向に細胞が伸展したことで、細胞内に作用する力学的な刺激が細胞内の代謝を促したためと推察される。本結果は、表面加工といった工学的手法による細胞機能の制御技術につながると期待できる。

nanofiber, geometry, cell behavior

講演番号：3C28a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎28会場

カーボンナノチューブ(CNT)による神経細胞内Caイオンレベル変化と細胞内へのCNTの取り込み

Changes of intracellular calcium ion level by CNT and CNT uptake into neuron

○松本　光太郎[1]、鏡石　良太[2]、Whitby Raymond[3]、清水　範夫[1,2] ([1]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター、[2]東洋大院・生命科学、[3]ブライトン大学)

○ Kotaro Matsumoto[1], Ryota Kagamiishi[2], Raymond Whitby[3], Norio Shimizu[1,2] ([1]Bio-Nano Electronics Research Center, [2]Grad. Sch. of Life Sci., Toyo Univ., [3]Univ. of Brighton)

【目的】我々は、これまでに低濃度のアミノ基修飾 CNT を神経成長因子(NGF)とともに神経細胞培養液に添加すると神経細胞の神経突起伸長を促進させること、また、架橋剤を用いてアミノ基に NGF をペプチド結合させた NGF 結合 CNT を神経細胞培養液に添加した場合にも、神経突起伸長効果があることを見出している。さらに、CNT は神経細胞の ERK シグナル伝達経路を活性化していることを明らかにした。神経細胞培養液に NGF を添加すると細胞内 Ca イオンレベルが上昇することが知られているので、今回、アミノ基修飾 CNT を添加した場合に細胞内 Ca イオンレベルが変化するかどうかを検討した。さらに、NGF 結合 CNT およびアミノ基修飾 CNT の細胞内への取り込みについて、共焦点レーザー顕微鏡と透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて観察した。
【方法】Ca指示薬であるFluo-4 AM溶液で前処理したニワトリ脊髄後根神経節(dorsal root ganglion; DRG)神経細胞培養液に、アミノ基修飾CNTをNGFとともに添加した場合またはNGF結合CNTを添加した場合に対して、神経細胞の細胞内Caイオンレベルの変化を、IN Cell Analyzer 1000を用いて経時的に観察した。また、蛍光色素のFITCで標識したNGF結合CNTまたはアミノ基修飾CNTの細胞内への取り込みについて共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。さらに、細胞切片を用いてNGF結合CNTの細胞内への取り込みをTEMで観察し、細胞内のCNT領域の炭素原子分析をEDSにより行った。
【結果】神経細胞培養液にNGFを添加した後にアミノ基修飾CNTを添加すると、NGFのみを添加した場合に比較して、細胞内Caイオンレベルが高くなった。また、NGF結合CNTを添加した場合においても、細胞内Caイオンレベルが上昇し、NGF結合CNTを添加した後にアミノ基修飾CNTを添加すると、細胞内Caイオンレベルがより高くなった。これより、CNTは神経細胞のERKシグナル伝達経路を活性化するだけでなく、細胞内Caイオンレベルを上昇させることが明らかになった。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、アミノ基修飾CNTまたはNGF結合CNTの細胞内への取り込みを観察した結果、NGF結合CNTは細胞質および細胞核内に取り込まれているのに対し、アミノ基修飾CNTは細胞質のみに存在していることが明らかになった。また、TEMを用いて細胞内のNGF結合CNTを観察し、細胞内CNT領域の炭素原子分析をEDSで行ったところ、NGF結合CNTは細胞内で凝集体として存在していることが明らかになった。

Carbon nanotube, Cellular uptake, Intracellular calcium ion

講演番号：3C28a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ C校舎28会場

神経成長因子結合カーボンナノチューブを配置した基板上での神経ネットワーク形成

Formation of neuronal network using nerve growth factor-coated carbon nanotube substrate

○鏡石 良太[1]、松本 光太郎[2]、竹井 弘之[1,2]、清水 範夫[1,2]（[1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター）

○Ryota Kagamiishi[1], Kotaro Matsumoto[2], Hiroyuki Takei[1,2], Norio Shimizu[1,2] ([1]Grad. Sch. of Life Sci., [2]Bio-Nano Electronics Research Center, Toyo Univ.)

【目的】カーボンナノチューブ（CNT）はグラフェンシートが円筒状になった構造の物質で、優れた熱伝導性や導電性、化学物質に対する耐久性を有しており電子材料や構造材料としての利用が検討されている。最近では、CNTのサイズや導電性から生体材料としての利用が考えられている。本研究では、神経成長因子（NGF）を結合させたCNTによる神経細胞の神経突起伸長への影響と、各種形状に金蒸着した基板上にアルカンチオールを介してNGF結合CNTを配置してNGF結合CNT基板を作製し、その上で神経ネットワークを形成させる方法を検討した。

【方法】NGF結合CNTを次のように作成した。1.7 mg/mlのアミノ基修飾CNT、10 μg/mlのNGF溶液、および架橋剤をそれぞれ 20 μlずつ加えて混合し、2時間反応させた。1Mの酢酸ナトリウムで反応を停止させた後、限外濾過チューブを用いて洗浄し、150 μlの滅菌水に分散させてNGF結合CNT溶液とした。5-100 μm幅のスリットで帯状に金蒸着した基板、また25-50 μm幅のL字型やT字型などのマスクを用いて金蒸着した基板を作製した。これらの金蒸着基板にアミノ基修飾またはカルボキシ修飾アルカンチオールを介してNGF結合CNTを配置し、ニワトリ8日胚から採取した脊髄後根神経節の神経細胞を培養して神経ネットワークの形成を観察した。

【結果】神経細胞培養液にNGF結合CNT溶液を5 μl添加した場合、神経突起を伸長した細胞数が、最適濃度の可溶性NGFを添加した場合に比べて増加したことから、NGF結合CNTを培養基板に用いることができると考えられる。そこで、5-100 μm幅のスリットで作製した帯状金蒸着領域にアミノ基修飾アルカンチオールを介してNGF結合CNTを配置して神経細胞を培養した。その結果、50 μm幅の帯状金蒸着領域上では領域に沿って神経突起を直線上に伸長して神経ネットワークを形成した。また、100 μm幅の帯状金蒸着領域上では領域が広いため横方向に神経突起を伸長する細胞があった。25 μm幅以下の帯状金蒸着領域上では神経細胞の接着が困難であった。カルボキシ修飾アルカンチオールを用いてNGF結合CNTを配置した場合では、領域上には神経細胞は接着しなかった。T字型やL字型などの金蒸着領域にアミノ基修飾アルカンチオールを介してNGF結合CNTを配置して神経細胞を培養した場合でもほぼ同じ傾向であった。

Carbon nanotube, Neuronal network, NGF

講演番号:3C28a11
講演日時、会場:3月24日11:10～ C校舎28会場

ガンマ線照射高分子ゲル上におけるマウス神経幹細胞/前駆細胞の培養

Culture of mouse neural stem/progenitor cells on polymer gels irradiated by gamma ray

○川瀬　文音、森　英樹、原 正之（阪府大院・理）
○Ayane Kawase, Hideki Mori, Masayuki Hara(Osaka Prefecture University)

【目的】自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞は無血清培養でニューロスフェアと呼ばれる細胞集塊を形成しながら培養される。神経幹細胞にはわずかな接着性が確認されており、このわずかな接着性から培養足場の影響を受けるのではないかと考えられる。本研究では神経幹細胞を高分子ゲル上において培養し、高分子ゲル足場が神経幹細胞の増殖、ニューロスフェア形成に与える影響を評価することを目的とした。
【方法】ポリビニルアルコール、コラーゲン、アルギン酸のゲルを作成し、得られたゲル上において神経幹細胞を培養した。培養期間における細胞の形態の変化やニューロスフェアの形成を観察し、細胞数を測定した。培養後の細胞は細胞染色によって、同定した。
【結果】コラーゲンゲル上においては、細胞の接着と分化が確認された。また、PVA、アルギン酸ゲル上においては細胞集塊の確認がされ、未分化能が維持されていた。

neural stem cell,hydrogel,gamma-ray irradiation

講演番号：3C28a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ C校舎28会場

重金属イオンのマウス神経幹細胞/前駆細胞の神経分化に対する影響

Evaluation of heavy metal ions on neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells

○佐々木　豪、森　英樹、原　正之（阪府大院・理）
○Go Sasaki, Hideki Mori, Masayuki Hara (Osaka Pref.Univ.)

【目的】自己複製能と、中枢神経系の細胞系譜への多分化能を有する神経幹細胞は、胎生期脳内では分裂を繰り返しながらニューロンやアストロサイトの供給を担っている。水銀、鉛などの重金属が神経毒性を有する事は知られているが、神経幹細胞に対する毒性ついては報告されていない。そこで本研究では培養したマウス神経幹細胞/前駆細胞（NSPC: Neural Stem/Progenitor Cells）を用いて重金属イオンの細胞毒性を評価した。
【方法】実験にはE14 ICRマウス脳由来NSPCとラット褐色細胞腫由来細胞株（PC12）を用いた。重金属イオンの調製には$ZnCl_2$、 $CdCl_2$、 $CuCl_2$、 $HgCl_2$、 $PbCl_2$を用いた。重金属曝露24時間後の細胞生存率を、テトラゾリウム塩（WST-8）を用いた生細胞数測定法によって評価した。さらに、細胞生存率の結果をもとに、最小阻害濃度以下の重金属曝露条件下にてNSPCを1週間分化誘導した。分化誘導によって生じたニューロン及びアストロサイトを免疫染色によって染め分け、蛍光顕微鏡画像下にて分化率の解析と細胞形態の観察を行った。
【結果】培養したNSPCに対して$HgCl_2$は50 μM、$PbCl_2$は350 μM、$CdCl_2$は20 μMの曝露で細胞生存率の低下がみられ、さらに低濃度の曝露条件で分化率は変化した。

neural stem cell, heavy metal,neuronal differentiation

講演番号：3C28a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ C校舎28会場

マウスマスト細胞ハイブリドーマのIgE刺激を介した即時相・遅延相応答

Immunoglobulin E-mediated immediate-phase and late-phase reaction of mouse mast cell hybridoma

○河原 岳志（信州大院・農）
○Takeshi Kawahara（Shinshudai）

【目的】演者らは先の学会において、マウス骨髄細胞より分化誘導したマスト細胞をマウスマスト細胞腫と細胞融合させることにより不死化させたマスト細胞ハイブリドーマ（MMCH）が、IgEを介した刺激に対して脱顆粒応答する特性について報告を行った。今回の発表では、刺激に用いるIgEと抗原の濃度を変化させた条件におけるMMCHの脱顆粒応答の強さについて定量的解析を行うとともに、脱顆粒反応の即時相で放出されるヒスタミンの産生能および放出能について、また脱顆粒反応の遅延相において産生される代表的脂質メディエーターのロイコトリエンC_4（LTC_4）とプロスタグランジンD_2（PGD_2）の産生・分泌能、ならびに各種の炎症性サイトカイン（IL-3、IL-4、IL-13、GM-CSF、TNF-α）の発現誘導能について解析を行った。
【方法】1×10^6個のMMCHをIgE濃度と抗原濃度それぞれを変化させて組み合わせた条件で刺激し、脱顆粒応答の強さに及ぼす影響を上清のβ-ヘキソサミニダーゼ活性測定法により評価した。即時相におけるヒスタミンの放出ならびに遅延相におけるLTC_4、PGD_2の産生は、脱顆粒誘導一定時間後の培養上清を用いた競合EIA法により評価するとともに、炎症性サイトカインの発現誘導を定量PCR法にて解析した。
【結果】MMCHの、12.5～100 ng/mlのIgE濃度範囲における一定抗原濃度（1 ng/ml）との組み合わせ、ならびに0.125～1 ng/mlの抗原範囲における一定IgE濃度（100 ng/ml）との組み合わせによる脱顆粒応答は、それぞれIgE、抗原濃度依存的に増加した。MMCHは、242 ng/10^6細胞のヒスタミン合成能を有し、脱顆粒誘導後の培養上清中の濃度は、刺激前と比較して有意に増加した。また遅延相応答に相当する脱顆粒誘導後のLTC_4濃度、PGD_2濃度が有意に増加したほか、いずれの炎症性サイトカインの発現量も脱顆粒誘導後に有意に上昇することが明らかとなった。以上のことから、MMCHが一定濃度範囲のIgEや抗原の組み合わせ刺激に対し、定量的な脱顆粒反応応答を示すとともに、即時相応答において重要となるヒスタミンならびに遅延相応答において重要となる脂質メディエーター類の産生・放出能、炎症性サイトカイン誘導能を有することが明らかとなった。

mast cell, hybridoma, degranulation

講演番号：3C28p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ C校舎28会場

リポ蛋白質受容体ファミリーLRP10 の組織特異性

Tissue distribution of the low-density lipoprotein receptor-related protein-10

○ 鹿田　星、細田明美、山岸あづみ、立花太郎、福村智恵、金　東浩、佐伯　茂
（大阪市大・生活科学・生体情報）
○ Sho Shikada, Akemi Hosoda, Azumi Yamagishi, Taro Tachibana, Tomoe Fukumura, Dong-Ho Kim, Shigeru Saeki(Lab. of Mol. Biochem. Nutr., Osaka City Univ.)

【目的】低密度リポ蛋白質(LDL)受容体は、GoldsteinとBrownらにより、家族性高コレステロール血症(FH)の原因を解明する過程で発見されたリポ蛋白質受容体である。食事として摂取したコレステロールや、体内で合成されたコレステロールは、血液中でLDLに結合して体内を循環し、コーテッド・ピットと呼ばれる細胞膜上の窪みに存在するLDL受容体を介して細胞内に取り込まれる。LDL受容体は細胞内のコレステロール量を一定に保つセンサーとして働き、その遺伝子異常は人類で最も頻度の高い遺伝病の一つであるFHを引き起こす。このようにリポ蛋白質受容体は、脂質代謝調節の中心を担っているが、LDL受容体と構造が類似した複数のLDL受容体類似蛋白質（LRP）がクローニングされ、リポ蛋白質受容体が想像以上に多様な生命現象に関与することが明らかとなり、リポ蛋白質受容体の概念が大きく変わろうとしている。VLDL受容体やアポE受容体２(ApoER2)はアポEに対するリガンド特異性が高く、アルツハイマー病の発症に関わることが示されている。更に、VLDL受容体やApoER2は、アポ蛋白質以外にリーリン(reelin)をリガンドとし、リーリンがこれらのLRPに結合すると、細胞質内ドメインにあるNPxY配列が、細胞内リン酸化カスケードのアダプター蛋白質であるDab1のチロシンリン酸化を誘導し、脳神経細胞の機能を調節する。VLDL受容体、ApoER2欠損マウスは、リーリン、Dab1欠損マウスと同様にreelerマウスと同じ表現型を示し、脳神経細胞に異常が見られる。これらのことは、リポ蛋白質受容体が脳神経細胞の発達に関与することを示している。近年、私達は、新たにLDL受容体ファミリーLRP10のクローニングに成功し、本研究では、LRP10の体内分布と、脳における局在性について明らかにした。
【結果と考察】LDL受容体は脳を除く全身に発現した。一方、LRP10は脳での発現が高く、出産直後から出産20日目にかけて発現量が増加した。脳内では、大脳皮質、海馬、脈絡叢、顆粒層での発現が高かった。LRP10と同じく脳での発現が高いリポ蛋白質受容体ファミリーVLDLRは、大脳皮質の中間帯（IZ)に発現し、リポ蛋白質受容体ファミリーApoER2は大脳皮質の新皮質(neocortex)に発現することが報告されているが、LRP10は大脳皮質の脳室帯（VZ)に発現した。これらの結果より、私達は、LRP10は脳神経系の発達と遊走に関与していると推定した。

Low-density lipoprotein receptor, LRP10, Ventricular zone

講演番号：3C28p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ C校舎28会場

Wnt/β-cateninシグナル伝達経路に対するリポタンパク質受容体ファミリーの影響

Effects of lipoprotein receptor family to Wnt/beta-catenin signaling pathway.

○鬼丸 祐二、平田 倫子、関家 麻奈未、細田 明美、山岸 あづみ、福村 智恵、金 東浩、佐伯 茂（大阪市大・生活科学・生体情報）

○Yuji Onimaru, Michiko Hirata, Manami Sekiya, Akemi Hosoda, Azumi Yamagishi, Tomoe Fukumura, Dong-Ho Kim, Shigeru Saeki (Lab. of Mol. Biochem. Nutr., Osaka City Univ.)

【目的】低密度リポタンパク質(LDL)受容体は生体内のコレステロール恒常性に関与し、LDL受容体に遺伝子異常があると高コレステロール血症が引き起こされる。近年、LDL受容体に特徴的な5つの機能ドメイン(リガンド結合ドメイン、EGF前駆体相同ドメイン、O-結合糖ドメイン、細胞膜ドメイン、細胞質ドメイン)から構成される、複数のLDL受容体関連タンパク質(LRP)がクローニングされた。LRP5、LRP6は、発生・分化の重要なシグナル伝達を担うWntの共役受容体として機能し、その下流に位置するWnt/β-cateninシグナル経路を活性化し、T細胞因子(TCF)の転写活性を促進する。一方、当研究室が発見したLRP10はTCFの転写活性を抑制することを見出した。そこで本研究では、LRP10によるWnt/β-cateninシグナル経路の抑制作用と構造との関係について検討した。

【方法】Splicing by Overlap Extension-PCR(SOE-PCR)法により、LRP10のリガンド結合ドメイン、EGF前駆体相同ドメイン、細胞質ドメインをそれぞれ欠損させた変異LRP10遺伝子を作製した。HEK293細胞にTCFレポータープラスミド(TOP-Flash)を、Wnt3a遺伝子およびリポタンパク質受容体ファミリー遺伝子と共にトランスフェクションした。48時間後に細胞を回収し、TCFの転写活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

【結果】LRP10によるWnt/β-cateninシグナル経路の抑制作用は、リガンド結合ドメインおよびEGF前駆体相同ドメインを欠損させると消失した。このことから、LRP10のリガンド結合ドメインおよびEGF前駆体相同ドメインの構造がTCF転写活性の制御に重要であると示唆された。現在、LRP10によるWnt/β-cateninシグナル経路の抑制作用をその他のリポタンパク質受容体ファミリーの作用と比較検討中である。

LDL receptor, LRP, Wnt signaling

講演番号：3C28p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎28会場

リポ蛋白質受容体ファミリーLRP10 による Wnt シグナル経路を介する骨芽細胞の分化制御

Lipoprotein receptor family LRP10 regulates osteoblast differentiation through Wnt signaling

○鋳方 綾香、平田 倫子、関家 麻奈未、細田 明美、山岸 あづみ、福村 智恵、金 東浩、佐伯 茂（大阪市大・生活科学・生体情報）

○Ayaka Ikata, Michiko Hirata, Manami Sekiya, Akemi Hosoda, Azumi Yamagishi, Tomoe Fukumura, Dong-Ho Kim, Shigeru Saeki (Lob. of Mol. Biochem. Nutr., Osaka City Univ.)

【目的】間葉系幹細胞は骨芽細胞や脂肪細胞に分化し、骨粗鬆症や肥満症の発症に関与する。分泌糖蛋白質Wntは、骨芽細胞と脂肪細胞の分化を制御する重要な生体分子であることが報告されている。間葉系幹細胞は、Wntと培養すると骨芽細胞に分化し、PPARγのアゴニストと培養すると脂肪細胞に分化するが、WntはPPARγによる脂肪細胞の分化を抑制する。Wntにより活性化されるシグナル経路には、canonical経路とnon-canonical経路とがあり、リポ蛋白質受容体ファミリーLRP5やLRP6はWntの共役受容体として機能し、canonical経路を活性化するが、私たちが発見したLRP10は、canonical経路を阻害することを見出している。そこで私たちは，LRP10の肥満、骨代謝に対する分子メカニズムを明らかにすることを最終目的に、本研究では、間葉系幹細胞から骨細胞と脂肪細胞への分化に果たすLRP10の役割を検討した。

【結果】マウス骨髄間葉系幹細胞であるST2細胞に、Wnt3a遺伝子をトランスフェクションすると、ST2細胞が骨芽細胞に分化することを、Alkaline phosphatase(ALP)染色とALP mRNA発現量により確認した。ST2細胞に、Wnt3aとLRP10遺伝子を同時にトランスフェクションすると、骨分化マーカーALPのmRNA発現量が抑制されることを明らかにした。canonical経路の下流に位置するTCF活性は，Wnt3a遺伝子をトランスフェクションすると上昇し、Wnt3aとLRP10遺伝子を同時にトランスフェクションすると低下した。次に、ST2細胞をTroglitazoneと培養すると脂肪細胞に分化するが、Wnt3a遺伝子をトランスフェクションしたST2細胞ではTroglitazoneによる脂肪細胞への分化が抑制されることを、Oil-Red-O染色、aP2 mRNA発現量によって確認した。canonical経路の下流に位置するTCF活性は，Troglitazoneによって変化が無く、Wnt3a遺伝子をトランスフェクションすると上昇し，Wnt3aとLRP10遺伝子を同時にトランスフェクションすると低下したが、LRP10による脂肪細胞分化の影響については明確では無かった。

Keyword1, Keyword2, Keyword3

講演番号：3C28p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ C校舎28会場

ラクトフェリン結合タンパク質の精製と機能解析

○金　東浩、岡本涼子、池田一雄[1]、福村智恵、佐伯　茂
(大阪市大・生活科学・生体情報、[1]大阪市大・医学)
○Dongho Kim, Ryoko Okamoto, Kazuo Ikeda[1], Tomoe Fukumura, Shigeru Saeki
(Lab. of Mol. Biochem. Nutr., Osaka City Univ., [1]Dep. of Med. Sci., Osaka City Univ.)

【目的】ラクトフェリンは鉄結合性の糖タンパク質であり、好中球と腺上皮細胞で合成・分泌され、体内外で抗菌作用、抗癌作用、免疫調節作用などの多くの生理作用を有している。近年、ラクトフェリンの摂取により、炎症性腸疾患を軽減または回復させる効果が示され、腸におけるラクトフェリンの生理作用が注目されている。しかし、腸におけるラクトフェリンの詳細な作用機構には不明な点が多い。本研究では、腸におけるラクトフェリンの生理作用機構を明らかにすることを目的とし、腸に発現するラクトフェリン結合タンパク質の精製と発現解析を行った。
【方法と結果】マウスの各組織タンパク質に対してリガンドブロッティングを行い、十二指腸、小腸、盲腸、大腸に約500 kDaの分子量を持つラクトフェリン結合タンパク質の存在を明らかにした。本タンパク質をアフィニティカラムによりマウス小腸から精製し、iLfBPと命名した。N末端と内部のアミノ酸配列の解析結果、iLfBPは粘膜保護作用があると示唆されているムチン(mucin)様タンパク質と高い相同性を示した。iLfBPは非還元状態では500kDaであるが、還元状態では5つのタンパク質（55, 60, 65, 70, 120 kDa）に解離され、ラクトフェリンとの結合力が失われた。このことから、ラクトフェリンと結合するためにはiLfBPの分子間ジスルフィド結合による構造形成が必須であることが示された。腸炎におけるiLfBPの発現量を検討するためにデキストラン硫酸誘発腸炎モデルを作製した。本モデルマウスは慢性大腸炎のモデルとして病態的には下痢と血便を伴い、解剖学的には炎症性浸潤と杯細胞の脱落が特徴で、デキストラン硫酸の投与を止めると回復する特徴がある。デキストラン硫酸誘発腸炎モデルマウスでのiLfBPの発現量を正常期、発症期、回復期に分け、リガンドブロッティングとRT-PCRにより解析した。iLfBPは腸炎誘発前から発現していたが、杯細胞の脱落が多く見られる炎症発症期に減少し、杯細胞が正常と見られる回復期に多く発現した。このことからiLfBPは杯細胞で合成され、粘膜に分泌し、粘膜保護作用を有するものと考えられる。また、炎症の回復期に多く発現することから、腸管順応に関与することが示唆された。

Lactoferrin, binding protein, intestine

講演番号：3C28p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ C校舎28会場

NMDA 型グルタミン酸受容体に対する日本酒に含まれるアミン類の効果

Effects of amines contained in Sake on the NMDA-type ionotropic glutamate receptors

○則包　潔人[1]、伊豆　英恵[2]、松丸　克己[2]、山田　康枝[1]（近畿大・工・院[1]、酒総研[2]）

○Kiyoto Norikane[1], Hanae Izu[2], Katumi Matumaru[2], Yasue Yamada[1] ([1]Grad. Sch. of. Sys. Eng. Kinki Univ, [2]NRIB)

【目的】

NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDA 受容体)は脳に多く存在し，記憶や学習に重要な働きをしている．また，高い Ca^{2+}透過性を有するイオンチャネル型グルタミン酸受容体のひとつであり，受容体の過剰反応は神経細胞死を引き起こし、活性が阻害されると統合失調症などの神経疾患の原因になると考えられている．NMDA 受容体に対してポリアミンの作用はこれまで調べられており，主に阻害作用を示し脳機能改善薬となりうる機能性をもっている．特に，spermine は，NMDA 型グルタミン酸受容体に二面的な調節を受けていると知られ，日本酒成分にも含まれているアミンである．日本酒は他に数種類のアミンが存在しているが，詳細な作用機序が分かっていないものも多い．そこで，今回，日本酒に含まれる agmatine，putrescine，spermine，2-phenylethylamine，tyramine および isoamylamine の NMDA 受容体に対する効果を比較した．

【方法】

脳において大脳皮質や海馬に多く発現しているマウス NMDA 受容体の GluN1/GluN2B サブタイプ NMDA 受容体の mRNA をアフリカツメガエルの卵母細胞にインジェクションし，20℃で 24～48 時間インキュベートし発現させたものを受容体活性測定に使用した．膜電位を－70 mV に固定して，二電極膜電位固定法により活性を測定した．ポリアミンの活性の効果を比較するため，グルタミン酸 100 μM/グリシン 100 μM の活性を control（100%)として検討した．

【結果】

6 種類のアミンを比較検討した結果，spermine は GluN1/GluN2B 受容体を活性化した．Agmatine，putrescine，2-phenylethylamine，tyramine，isoamylamine は GluN1/GluN2B 受容体の活性を阻害した．中でも 2-phenylethylamine と新たに isoamylamine が大きく活性阻害することが明らかとなった．

Keyword1　N-methyl-D-aspartate receptors, Keyword2 amine, Keyword3 GluN1/GluN2B

講演番号：3C28p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎28会場

揮発性化学物質の神経系細胞への効果

Effects of volatile chemicals on neural cells

○大谷　航平[1]，増田　修一[1]，伊豆　英恵[2]，松丸　克己[2]，白石　浩平[1]，青島　均[3]，山田康枝[1]（近畿大・工・院[1]，酒総研[2]，山口大院[3]）

○Kohei Ohtani[1]，Shuichi Masuda[1]，Hanae Izu[2]，Katumi Matumaru[2]，Kohei Shiraishi[1]，Hitoshi Aoshima[3]，Yasue Yamada[1]（[1]Grad. Sch. of . Sys. Eng. Kinki. Univ.，[2]NRIB，[3]Yamaguchi. Univ. Grad. Sch. Med.）

【目的】植物の様々な部分から抽出される精油は芳香性を持つ天然化学物質であり、現在約250~300種類の精油の存在が確認されている．精油は殺菌、抗菌、昆虫の誘因といった植物の繁栄や自己防衛のための作用を有しているほか，特有の芳香を持つものが多く天然香料として使用されている．精油は、体内に入ると血流を通り全身に作用し，血液脳関門を透過し，中枢神経系に影響を及ぼす可能性が考えられる．中枢神経系に精油成分が作用することで鎮静効果やリラックス効果などをもたらすと考えられ，香料としての働きを含めアロマテラピーに多く使用される．しかし，これらの物質の作用機序は不明な点が多く，また神経機能や神経細胞に対する直接的な影響については明らかにされていない．一方で，揮発性化学物質には神経系に悪影響を与えるものもある．代表的なトルエンは，シックハウス症候群の原因物質であり，神経系に強い毒性を持つ．このほかにも有害な物質が存在するが神経細胞レベルでの作用は不明な点が多い．このため揮発性化学物質と天然香気性成分のラット初代培養神経細胞とヒト神経芽細胞腫由来株SK-N-SH細胞への効果を検討した．

【方法】ヒト神経芽細胞腫由来株SK-N-SH細胞 2.0×10^5 cells/mlにMEMα培地(10%FCS入りで) 37℃, 5%CO_2の条件下で培養した．培養したSK-N-SH細胞に揮発性香気成分であるlinalool，cis-3-hexen-1-ol，n-propyl alcohol，2-phenyl ethanolおよび，揮発性化学物質であるn-octanal，2-ethyl-1-hexanol，nonanalを添加し，24時間培養した．その後，MTTアッセイによって細胞生存率を測定した．ラット初代培養神経細胞培養法は，妊娠ラットから胎仔の大脳を取出し，4穴シャーレに播種し揮発性化学物質を添加後，24時間培養した．その後，Live-Dead染色し顕微鏡下で生細胞と死細胞の存在比を比較した．

【結果】ヒト神経芽細胞腫由来株SK-N-SH細胞での揮発性香気成分添加後の細胞生存率を測定すると各物質ともの細胞生存率を低下させた．特にlinaloolは，他の物質と比べて強い毒性を示すことが明らかとなった．また，n-octanal, 2-ethyl-1-hexanolおよびnonanalは強い毒性を示した．

Keyword1 volatile chemicals, Keyword2 neural cells

講演番号：3C28p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎28会場

株化肝実質細胞（RLN-10）におけるiNOS mRNA発現およびNO産生に及ぼすリゾープス水抽出物の影響

Efect of water extracts of *Rhizopus oryzae* on inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in RLN-10 cells

○武田 悠史、小野 雄平[1]、内田 真祐子、鈴木 武人、宮崎 陽子、田中 和明、滝沢 達也 （麻布大院・獣医、[1]麻布大・獣医）

○Yuji Takeda, Yuhei Ono[1], Mayuko Uchida, Takehito Suzuki, Yoko Miyazaki, Kazuaki Tanaka, Tatsuya Takizawa (Azabu Univ, Grad. Sch. Vet. Med., [1]Azabu Univ, Vet. Med.)

【目的】*Rhizopus oryzae*菌の水抽出物（ROU-we）はウシの妊娠率やニワトリの産卵能力など動物の繁殖能力を向上させることが知られ、飼料添加物として用いられている。近年、肝障害モデルラットにおいて、ROU-weの経口投与によって肝障害マーカーの減少、肝組織の再生が認められたと報告されている。また一酸化窒素（NO）は肝臓において正負両面の作用をもつと考えられている。本研究では、ROU-weの肝臓に及ぼす作用にiNOSの発現が関与していると仮説し、ラット株化肝実質細胞（RLN-10）におけるiNOS mRNA発現およびNO産生に及ぼすROU-weの影響を検討した。
【方法】ラット正常肝実質細胞から株化された株化肝実質細胞(RLN-10)を用いた。Rou-we(1mg/ml)およびリポポリサッカライド（LPS, 1μg/ml）を培養液に添加し、添加後、経時的に細胞および培養液を回収し、RNAを抽出後、iNOS mRNA、iNOS antisense（iNOS AS）RNAの発現をRT-PCRによって解析した。またNF-kBの核内移行を抗p65抗体を用いた免疫蛍光染色によって観察した。さらに、培養液中のNO代謝産物量をGriess法によって、細胞内のNO産生をDiaminofluorescein法によって解析し、NO産生量とした。
【結果】Rou-we添加2時間後からiNOS mRNAの発現がみられ、添加4時間後にピークを示し、その後経時的に減少した。NO代謝産物量も添加7時間後に高い蓄積が確認された。iNOS mRNAの発現はLPS添加群よりもROU-we添加群で高値を示した。NF-kBの核内移行では、添加15分～60分後のいずれにおいてもRou-we添加群よりもLPS添加群で高値を示した。このことからRou-weによるiNOSの誘導はNF-kBには強く依存していないと考えられた。次にiNOS mRNAの分解を抑制するiNOS ASの発現に及ぼすRou-weの影響を検討した。iNOS AS RNAの発現もROU-we添加4時間後で約30倍に増加し、iNOS mRNAの発現と一致した。さらに、iNOS ASの発現を阻害するデキサメタゾンで前処理した後、ROU-we添加24時間後におけるNO代謝産物量を測定した結果、NO代謝産物量はデキサメタゾン濃度依存的に有意に低下した。以上の結果から、RLN-10細胞においてROU-weはiNOS mRNAを誘導し、NO産生をもたらすこと、またその誘導経路はNF-kBの核内移行に強く依存するものではなく、iNOSアンチセンスの発現を促進することでiNOS mRNAの高発現とNO産生を引き起こしていると考えられた。

Rizopus oryzae, iNOS, iNOS antisense RNA

講演番号：3C28p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎28会場

中心子目植物に含有する抗酸化性含窒素色素Betaxanthinの体内動態と生理作用

Gastrointestinal pharmacokinetics and bioavailability of betaxanthin

○高橋　あずさ、新関　えりか[1]、堅田　優実[1]、奥村　純子[1]、福田　絵里[1]、菊地　裕人[2]、有塚　勉[2]、渡辺　純、鈴木　卓、知地　英征[1]（北大・院農、[1]藤女子大・食物栄養、[2]日甜総研、[3]食総研）

○Azusa Takahashi, Erika Niizeki[1], Yūmi Katada[1], Junko Okumura[1], Eri Fukuda[1], Hiroto Kikuchi[2],Tsutomu Aritsuka[2],Jun watanabe[3], Takashi Suzuki, Hideyuki Chiji[1] (Hokkaido Uni, [1]Fuji Women's Uni, [2]Nittensoken, [3]NFRI)

【目的】Betalain（赤色の Betacyanin、橙黄色の Betaxanthin）色素は中心子目植物（などしこ目）に特異的に含有している抗酸化性含窒素色素であるが、その生体内吸収動態や生理機能については未だ不明な点が多い。以前に Betacyanin は胃や小腸から吸収されることを報告した。本研究では Betaxanthin（Indicaxanthin）の生体内動態と生理作用を解明するために、小腸結紮ループによる吸収実験とラットにおけるアルコール性胃粘膜障害とを行った。

【方法】SD/SPF 系雄ラット 6 週齢（n=6）を 1 週間 25%カゼイン飼料で飼育後、麻酔下で開腹し十二指腸側と盲腸側を結紮した。十二指腸側から Indicaxanthin 溶液 5 mL を注入し、5、10、20、30 分後に門脈から採血、小腸を摘出し、血清及び内容物中の色素量を LC-MS で分析した。

胃結紮ループ実験では噴門側と幽門側を結紮し、小腸結紮ループ実験と同様の方法で行い、血清中の色素量を LC-MS で分析した。また、アルコール性胃粘膜障害抑制実験では、SD 系雄性ラット 7 週齢（n=6)を 24 時間絶食後、実験の 1 時間 30 分前に Betanin、Indicaxanthin を 100 mg/kg B.W、300 mg/kg B.W を、対照群には生理的食塩水をそれぞれ経口投与し、30 分後に 99.5%エタノールを 5 mL/kg B.W 投与した。1 時間後に麻酔下で開腹後、胃を摘出し 5%ホルマリンで固定した。その後、画像解析により潰瘍部の面積を算出した。

【結果】ラットを用いた吸収動態実験を行った結果、Indicaxanthinの小腸注入5分後にその色素の血中濃度が最大に達した後、時間の経過とともに減少し、10分後に半減、30分後には3分の1近くまで減少した。また、この時のORAC値を測定した結果、注入5分後から徐々に上昇し、20分後に最大値に達し、30分後には減少した。続いて、胃結紮ループ作成後に採血した門脈血清中IndicaxanthinをLC-MSで分析した結果、採血したどの時間からも色素は検出されなかった。これらの結果から、Indicaxanthinは小腸から速やかに吸収され、緩やかに血中抗酸化能を上昇させ、赤紫色のBetacyaninとは異なるメカニズムで吸収されることが示唆された。また、アルコール性胃粘膜障害実験で、精製したBetanin及びIndicaxanthin（300mg/kg B.W）の前投与は 0.9%NaCl (Control) 群に対して潰瘍部面積が有意に減少し、同程度の強い抗潰瘍活性を示した。以上の結果から、Betaxanthinの一種であるIndicaxanthinは小腸で急速に吸収され、生体内において抗酸化性を発揮することが明らかとなった。

Keyword 1, Betalain, Keyword 2, Gastrointestinal pharmacokinetics, Keyword 3, gastric mucosal injury

講演番号：3C28p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎28会場

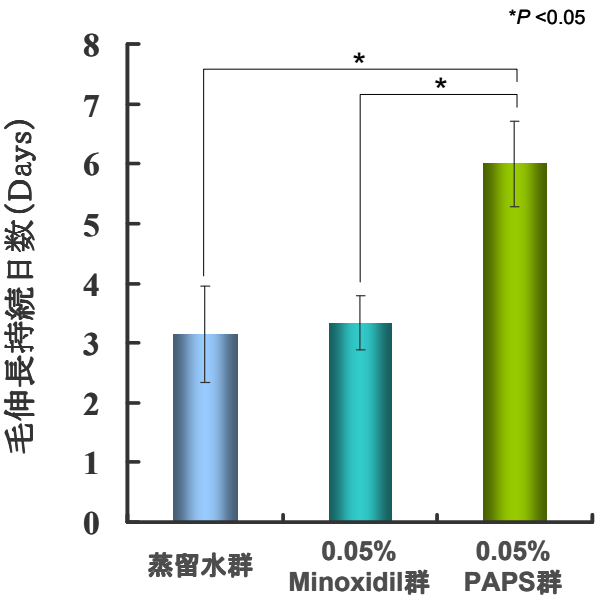
生体内硫酸基供与体3’-phosphoadenosine-5’-phosphosulfateの育毛効果

Effect of 3’-phosphoadenosine-5’-phosphosulfate on human hair follicle.

○中川原康介、加藤真一[1]、柴　肇一[1]、石毛和也（ヤマサ醤油・医薬化成品、[1]リジェンティス）
○Kosuke Nakagawara, Shin-ichi Kato[1], Toshikazu Shiba[1], Kazuya Ishige
(Biochemicals Division, Yamasa Corp., [1]RegeneTiss Inc.)

【目的】3’-Phosphoadenosine-5’-phosphosulfate（以下PAPS）は生体内における様々な硫酸化反応の硫酸基供与体であり、コンドロイチン硫酸やデルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸といったグリコサミノグリカンや硫酸化タンパク質などの生合成に不可欠な物質である。報告者らは、このPAPSの量産技術を確立すると共に、その生理活性に関して研究を進めてきた。毛周期の制御において重要な組織である毛乳頭は細胞外基質に富み、成長期特異的にSyndecan-1やVersican等のプロテオグリカンが発現することが知られており、PAPSの毛周期に対する作用が期待された。そこで本研究では、ヒト頭髪由来器官培養毛包及びヒト頭髪由来毛乳頭細胞を用いて、PAPSの育毛効果を評価した。

【方法・結果】ヒト毛包器官培養において、毛包の毛伸長を維持する、すなわち、毛周期の成長期を維持するためには、IGF-Iまたはインスリンの培地への添加が不可欠であり、これらを培地に添加せずに器官培養した場合、数日内に毛包が退行期の形態に変化して毛伸長が停止し、毛幹が毛包から脱落する。従って、IGF-I／インスリンを培地に添加せずにヒト毛包を器官培養することで、毛周期を成長期から退行期に誘導することができ、この際に評価対象の薬剤を添加することで、当該薬剤のヒト毛包に対する成長期を維持・延長する効果を評価できる。当該評価系にて、既存の育毛剤成分であるミノキシジルやアデノシンと共にPAPSの効果を評価した。その結果、ミノキシジルやアデノシンには効果が認められなかったのに対し、PAPSには毛包の成長期を延長する有意な効果が認められた（右図）。このヒト頭髪毛包に対する成長期延長効果の分子機構に迫るべく、PAPSがヒト頭髪毛包由来の毛乳頭細胞の遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響を解析した。その結果、IGF-Iやプロスタグランジン Fシグナルなど、毛包の成長期の誘導や維持に関わる遺伝子群の発現亢進が認められ、器官培養ヒト毛包に対する作用を良く説明するものであった。



3’-Phosphoadenosine-5’-phosphosulfate, Hair follicle, Dermal papilla

講演番号：3C28p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ C校舎28会場

UVA照射ヘアレスマウスに対する緑藻シフォナキサンチンの光老化抑制作用

Protective effects of siphonaxanthin from green algae against UVA induced skin photoaging in hairless mice

○松尾　明香、菅原　達也、平田　孝（京大院・農）
○Asuka Matsuo, Tatsuya Sugawara, Takashi Hirata （Kyoto University）

【目的】紫外線（UV）による皮膚の光老化はシワ形成の主要因と言われており、血管新生が深く関与することが示唆されている。したがって血管新生を抑制することでシワの形成を制御できる可能性が期待される。これまでの研究で、ミル、クビレズタなどの緑藻類に多く含まれるシフォナキサンチンが強力な血管新生抑制作用を有することを見出した（Ganesan P. *et al.*, 2010）。そこで本研究では、UVAを照射した光老化モデルマウスに対して、シフォナキサンチン塗布が皮膚の性状と機能に与える影響を評価した。

【方法】緑藻の一種であるミル（*Codium fragile*）を凍結乾燥後、ミルミキサーで粉砕し、10倍容のアセトンを加えて4℃で一晩撹拌した。フィルター濾過して得られた粗抽出液をTLCに供し、粗シフォナキサンチン画分を分取した。得られた画分をHPLCに供し、保持時間約8分に現れるピークを回収した。LC/MSにより、精製物がシフォナキサンチンであることを確認した。

ヘアレスマウス（Hos:HR-1）背部に20 J/cm^2/day のUVAを週5回、8週間照射し、光老化モデルとした。UVA照射の1～2時間前に0.001%または0.01%シフォナキサンチン溶液、もしくは溶媒（プロピレングリコール/エタノール/水=3:2:5）のみを背部皮膚に塗布した。試験期間中、経時的に皮膚粘弾性、経皮水分蒸散量、表皮水分含有量の測定および皮膚レプリカの採取を行った。皮膚レプリカの三次元画像解析により、シワの形成を定量的に評価した。試験期間終了後、皮膚の組織切片を作成し、表皮厚および表皮細胞総数を測定することで表皮の肥厚化を評価した。採取した皮膚をホモジナイズしてゼラチンザイモグラフィーにより、皮膚中の細胞外マトリックス分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP-2）の活性を評価した。

【結果】UVA照射により、経皮水分蒸散量の上昇、表皮の肥厚化、シワ形成の促進が認められ、光老化が亢進していることを確認した。0.001%および0.01%シフォナキサンチン溶液の塗布により、これらはいずれも有意に抑制された。また、皮膚のMMP-2の活性はUVA照射によって上昇し、0.01%シフォナキサンチン溶液の塗布により有意に抑制された。以上の結果より、シフォナキサンチンは光老化抑制作用を示すことが確認された。

siphonaxanthin, photoaging, hairless mice

講演番号：3C28p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ C校舎28会場

北方系小果実類（*Aronia melanocarpa*）のラット肝グルタチオン代謝への影響

Effects of Black chokeberry grown in Hokkaido on glutathione-related enzyme activities in rat liver.

○水口 喜代、黒坂 友里恵、齋藤 靖香、中村 由貴子、高橋 あずさ[1]、鈴木 卓[1]、知地 英征、中河原 俊治（藤女子大院・食物栄養、[1]北大院・農）

○Nobuyo Mizuguchi, Yurie Kurosaka, Yasuka Saito, Yukiko Nakamura, Azusa Takahashi[1], Takashi Suzuki[1], Hideyuki Chiji, Shunji Nakagawara (Graduate School Human Life Sci. Fuji Women's University, [1]Graduate School Agriculture, Hokkaido University)

【目的】　アロニア（*Aronia melanocarpa* Elliot、Black Chokeberry）は北米原産のバラ科の植物で、*in vitro* で抗酸化活性を示すアントシアニン類を含むことが知られている。生体内の還元状態の維持にはグルタチオンなどの還元剤や NADPH 生成系を含めた活性酸素消去系酵素群が機能している。そこでラット肝臓におけるアセトアミノフェン（APAP）誘導肝障害に対するこれら生体防御機構の応答にアロニア果汁成分が与える影響について調べた。測定した酵素は、グルタチオンパーオキシダーゼ(GPx)、SOD、カタラーゼ(CAT)、グルタチオン還元酵素(GR)、グルコース−6−リン酸脱水素酵素(G6PDH)、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PGDH)である。同時に肝組織中のグルタチオンおよび過酸化物(TBARS)を定量した。

【方法】　SD/SPF 系雄ラット 6 週齢を予備飼育後 4 群（n=7）に分け、AIN-93G 飼料、または 4%アロニア果汁粉末添加飼料で 2 週間飼育した後、APAP（1g/kg 体重）を単回経口投与し、5 時間後に解剖した。得られた肝組織は直ちに液体窒素で凍結し、−80℃で保存した。融解後、0.25 M sucrose buffer(pH7.2)でホモジナイズし、105,000×*g* で 60 分間遠心分離した上清を粗酵素液とした。GPx および GR 活性は、NADPH の減少を分光光度計（340 nm）で測定した。CAT 活性は、H_2O_2 の減少を 240 nm で測定した。G6PDH、6PGDH 活性は、NADPH の生成を 340 nm で測定した。グルタチオン並びに TBARS の定量は、常法にしたがった。各群から得られた測定値は多重比較検定による有意差検定を行った。

【結果および考察】　APAP 投与群は、投与後 5 時間以内に肝重量（g/100 g 体重）の有意な増加を示したことから、APAP の作用を確認した。APAP 投与群では、GR 活性が低下したが、アロニア果汁粉末添加群では有意な回復がみられた。このとき、GPx、CAT 活性や GSH 含量においても APAP 投与群で低下したが、アロニア果汁粉末添加群では回復がみられ、同様の応答を示した。いっぽう、NADPH 生成系である G6PDH、6PGDH 活性は、APAP 投与に対しほとんど変化せず、アロニア果汁粉末添加群では増加傾向を示し、NADPH 供給の増加が示唆された。TBARS は、APAP 投与群、アロニア果汁粉末添加群において、ともに低下傾向を示した。これらのことからアロニア果汁粉末が APAP による酸化ストレスに対し、NADPH 生成系を含むグルタチオン代謝に防御的に作用することが示唆された。

Black chokeberry, antioxidant, glutathione

講演番号：3C28p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎28会場

心筋Mn-SODはミトコンドリア呼吸とタンパク質アセチル化を制御する

Mn-SOD regulates Mitochondrial Respiration and Protein Acetylation in Heart

○戸田 年彦[1,2,3]、川上 哲[3]、野尻 英俊[3,4]、清水 孝彦[1,3]（[1]千葉大・院医・先進加齢医学、[2]ジェー・エー・シー、[3]都健康長寿医療センター・老化機構、[4]順天堂大・医）

○Toshihiko Toda[1,2,3], Satoru Kawakami[3], Hidetoshi Nojiri[3,4], Takahiko Shimizu[1,3] ([1]Chiba Univ., [2]JAC Co.,Ltd., [3]Tokyo Metro. Inst. of Gerontol., [4]Juntendo Univ.)

【目的】Mn-SODはミトコンドリアに局在する主要な抗酸化酵素であり、心筋/骨格筋特異的な遺伝子欠損(H/M-*Sod2*$^{-/-}$)によって拡張型心筋症様の症状を呈することが知られている[1]。本研究では、ミトコンドリアROSの上昇が心機能の障害をもたらすメカニズムを明らかにするために、様々な酵素活性によって生じる代謝産物がMn-SOD欠損によってどのように変化するのかを解析した。
【方法】*MCK-Cre*$^{Tg/Wt}$, *Sod2*$^{Flox/Flox}$マウスおよびControlマウス(14週齢,オス)より心室筋を摘出し、CE-TOFMSのカチオンモード/アニオンモードによる測定を行った。心筋より抽出したタンパク質では、抗アセチル化リジン抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。また、解剖前(12週齢)における自発行動量と酸素消費量を測定し、個体レベルでの代謝解析を行った。
【結果】メタボローム解析の結果、250のピーク(カチオン136,アニオン114)が検出され、心筋中のクレアチニン値では顕著な低下が認められた。これは遺伝的な心筋傷害によるものと推察され、同時期の自発行動量はクレアチニン値と比例するように減少を示していた。また、心筋中の尿酸値に顕著な増加が認められた。心室内腔において結石様の塊が視認できる個体もあることから、H/M-*Sod2*$^{-/-}$では血中においても高尿酸症を併発していることが示唆された。一方、プリン体の蓄積量はControlの半分程度まで低下しており、著しいATP低下が認められた。個体レベルでの呼吸商および基質別エネルギー消費量を算出した結果、脂肪の消費量が顕著に減少していたことから、Mn-SOD欠損によるミトコンドリア呼吸経路の障害が示唆された。ミトコンドリアにおける主要な脂質代謝経路であるβ酸化は、SIRT3による脱アセチル化の制御を受けることが示唆されている[2]。そこで、心筋のタンパク質を用いてウェスタンブロット解析を行った結果、多くのタンパク質でアセチル化が顕著に亢進していることが示された。このことから、H/M-*Sod2*遺伝子欠損による拡張型心筋症モデルではアセチル化応答を介してミトコンドリア呼吸に障害が起きていることが示唆された。

[1] H. Nojiri *et al.*, J Biol Chem., 2006, 281, 33789-33801.
[2] M.D.Hirschey *et al.*, Mol. Cell, 2011, 44, 1-14.

Dilated cardiomyopathy (DCM), Manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD), Reactive oxygen species (ROS)

講演番号：3C28p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎28会場

細胞質で代謝する活性酸素は細胞死を制御する

CuZn-SOD deficiency causes apoptosis by intrinsic ROS generation.

○渡辺 憲史[1,2]、澁谷 修一[1,2]、清水 孝彦[1,3]（[1]千葉大院医・先進加齢医学、[2]株式会社ジェー・エー・シー、[3]都健康長寿研・老化機構）

○Kenji Watanabe, Syuichi Shibuya[1] Takahiko Shimizu([1]Dept. of Adv. Aging Med., Chiba Univ. Grad. Sch. of Med., [2]JAC Co.Ltd, [3]Tokyo Metro. Inst. of Gerontol.)

【目的】Superoxide dismutase (SOD)は生体内でO_2^-をO_2とH_2O_2に不均化する主要な酸化還元酵素である。このSODは構造と局在の違いによって３種類あり、CuZn-SOD(SOD1)は細胞質、Mn-SOD(SOD2)はミトコンドリア、EC-SOD(SOD3)は細胞外に存在する。SOD1欠損マウスは加齢黄斑変性、赤血球数減少、脂肪肝、筋萎縮、骨密度減少などを示し、老化モデルマウスとして有用である[1]。一方、SOD2を欠損させると胎生致死を示すことから、我々は組織特異的欠損マウスを作製し解析してきた。脳特異的SOD2欠損マウスは生後3週間で死亡する[2]。また、心臓特異的SOD2欠損マウスは拡張型心筋症を示し、生後半年迄に全て死亡する[2]。このように欠損させた酵素による表現型が個体レベルで異なっていることから、細胞レベルでSODを欠損させたときにどのような表現型を示すか解析した。

【方法】SOD1欠損マウスとtamoxifen誘導型SOD2欠損マウスからfibroblastとMouse embryonic fibroblastを作製し、これらの細胞の表現型を調べた。また、細胞内活性酸素、細胞周期、アポトーシスをフローサイトメーターで解析した。

【結果】*Sod1*欠損細胞は通常大気下(20% O_2)では培養することが出来ず、低酸素条件下(1% O_2)でのみ培養出来た。*Sod2*欠損細胞は培養開始から６対象日目には対照細胞と比べて有意に細胞数が減少したが、通常条件下で培養出来た。活性酸素産生はどちらの細胞でも検出したが、*Sod1*欠損細胞ではO_2^-が3～5倍増加していて、H_2O_2は約100倍増加していることが分かった。*Sod2*欠損細胞は2倍程度の増加であった。アポトーシスは*Sod1*欠損細胞でのみ検出され、*Sod1*欠損細胞の細胞数減少の原因と考えられた。*Sod2*欠損細胞ではアポトーシスは検出されず細胞周期異常が認められた。*Sod2*欠損細胞の細胞数減少はアポトーシスではなくその他の要因が原因となっていることが示唆された。細胞レベルでは個体レベルと異なりSOD1酵素の欠損が細胞死を導くことが明らかになった。

[1]Nojiri H, et al., J Bone Miner Res.2011 Nov;26(11):2682-94

[2]Shimizu T, et al., Geriatr Gerontol Int. 2010 Jul;10 Suppl 1:S70-9.Review

Superoxide dismutase, Reactive oxygen species, Apoptosis

講演番号：3C28p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎28会場

皮膚と被毛における細胞質スーパーオキシドの役割

Role of cytoplasmic superoxide on skin and hair

○澁谷　修一[1, 2]、小澤　裕介[1, 2]、清水　孝彦[1, 3]　([1]千葉大院医・先進加齢医学、[2]ジェー・エー・シー、[3]都健康長寿医療セ・老化機構)

○Shuichi Shibuya[1, 2], Yusuke Ozawa[1, 2], Takahiko Shimizu[1, 3] ([1]Dept. of Adv. Aging Med., Chiba Univ. Grad. Sch. of Med., [2]JAC, [3]Mol. Gerontol., Tokyo Metro. Inst. Gerontol.)

【目的】核受容体の転写活性調節に関わる哺乳類*hairless*(*Hr*)遺伝子は突然変異によりヒトおよびマウスで先天性の脱毛疾患を引き起こす[1]。HRタンパクは皮膚および脳で高発現し、*Hr*突然変異マウスは甲状腺ホルモン受容体やビタミンD受容体などの転写活性が低下し、毛胞欠損や皮膚嚢胞の増加など上皮発達や機能に影響を及ぼすことが明らかになっている[2]。また、これまで我々は老年病と酸化ストレスの関連を調べてきた過程で、CuZn-SOD(SOD1)欠損はコラーゲン合成不全による皮膚萎縮を引き起こし[3]、更にアルツハイマー病の症状を増悪させることを明らかにしてきた[4]。本研究では、*Hr*突然変異マウス(ヘアレスマウス、HR-1)の*Sod1*を欠損させ、皮膚と被毛における細胞質スーパーオキシド(O_2^-)の影響を評価した。

【方法・結果】HR-1マウスと*Sod1*$^{-/-}$マウスを交配し、HR-1, *Sod1*$^{-/-}$二重変異マウスを作製した。HR-1, *Sod1*$^{-/-}$マウスは約4週齢までにほぼ脱毛し、HR-1マウスと同様に無毛を呈した。HR-1, *Sod1*$^{-/-}$マウス皮膚はHR-1, *Sod1*$^{+/+}$マウスと比較して表皮層及び真皮層の厚さが減少し皮膚の萎縮が認められた。さらに、HR-1, *Sod1*$^{-/-}$マウスは皮膚過酸化脂質および8-isoprostane量が増加し酸化ストレス蓄積が認められた。しかしながら、皮膚嚢胞はHR-1, *Sod1*$^{+/+}$マウスとHR-1, *Sod1*$^{-/-}$マウスともに形成が見られ顕著な差は認められなかった。また、HR-1, *Sod1*$^{-/-}$マウスは骨量減少、赤血球数減少、脂肪肝、筋萎縮、脾臓肥大も見られ、*Sod1*$^{-/-}$マウスと同様に酸化ストレスに起因する老年病様症状を呈していた。以上の結果から、*Hr*変異が関わる脱毛と皮膚病態は内因性細胞質O_2^-による影響を受けないことが示唆された。また、HR-1, *Sod1*$^{-/-}$マウスは酸化ストレスを起因とする老年病様症状を呈し、皮膚に対する抗酸化物質の評価や経皮吸収試験に用いる優れたモデルであると考えられる。

[1]Ahmead, W. et al. *Science* 297:720-724 1998

[2]Mann, S. J. *Anat Rec* 170:485-499 1971

[3]Murakami, K. et al. *Biochem Biophys Res Commun* 382:457-461 2009

[4]Murakami, K. et al. *J Biol Chem* 2012

hairless, superoxide, skin atrophy

講演番号：3C28p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎28会場

酸化ストレスに起因した皮膚萎縮に対するグルコサミンの改善作用

Glucosamine improves skin atrophy induced by intrinsic oxidative stress.

○合田彩美[1,2]、小林慶司[1,3]、澁谷修一[1,2]、清水孝彦[1,4]（[1]千葉大院医・先進加齢医学、[2]ジェー・エー・シー、[3]順天堂大院医・整形外科、[4]都健康長寿医療センター・老化機構）

○Ayami Goda[1,2], Keiji Kobayashi[1,3], Shuichi Shibuya[1,2], Takahiko Shimizu[1,4]([1]Chiba Univ., [2]JAC Co.,Ltd., [3]Juntendo Univ., [4]Tokyo Metro.Inst. of Gerontol.)

【目的】グルコサミンは皮膚や関節軟骨の主成分ヒアルロン酸の構成分子である。これまでの研究から、グルコサミンの内服により関節炎モデルの関節軟骨病態の改善や[1]、紫外線照射（UV-B）による光老化誘導皮膚において、皮膚水分含量や表皮厚の皮膚状態改善効果が示めされている[2]。一方、我々はSOD1欠損マウスの解析から内因性活性酸素による酸化障害が皮膚萎縮や骨量減少などの老化様病態を示すことを明らかにしてきた[3,4]。また、SOD1欠損マウス皮膚から採取した皮膚線維芽細胞は20%酸素環境下で過剰なスーパーオキシドが発生し、アポトーシスによる細胞死に致ることが明らかになっている[5]。本研究では、グルコサミンによるSOD1欠損皮膚線維芽細胞に対する抗酸化効果、およびSOD1欠損マウスに対するグルコサミンの皮膚病態改善作用を検討した。

【方法】SOD1欠損マウスから皮膚線維芽細胞を単離、培養した。0.1ー2 mMグルコサミンを添加後に20%酸素条件下で培養し、ジヒドロエチジウムを用いた細胞内スーパーオキシド量、MTT assayによる細胞生存率を測定した。また、6週齢のSOD1欠損マウスに1%グルコサミンを9週間飲水投与し、皮膚厚と骨密度を測定した。

【結果】SOD1欠損皮膚線維芽細胞のスーパーオキシド量は未添加群と比較してグルコサミン添加群で有意に低下していた($p = 0.002$)。MTT assayではグルコサミン添加群で有意な細胞増殖が認められた($p = 0.001$)。また、SOD1欠損マウスの皮膚厚は水投与群と比較してグルコサミン投与群で有意に増加した($p = 0.03$)。皮膚と同様にコラーゲンが多く存在する骨組織についても骨密度の増加が認められた($p = 0.02$)。以上のことから、グルコサミンは皮膚線維芽細胞のスーパーオキシド量を低下させ、酸化ストレスに起因した皮膚萎縮を改善することが示唆された。

[1]Y.Tamai et al., Carbohydrate. Polymers., 2002, 48, 369-378.
[2]田中美登里、野村義宏, グルコサミン研究会, 2011, 3, 19-23.
[3]K.Murakami et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009, 382, 457-461.
[4]H.Nojiri et al., J. Bone. Miner. Res., 2011, 26, 2682-2694.
[5]S.Shibuya et al., Handbook of Diet, Nutrition and the Skin., in press.

Glucosamine, Superoxide dismutase 1

講演番号：3C28p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ C校舎28会場

細胞質酸化ストレスによるアミロイド β オリゴマー形成能および記憶異常の促進

Cytoplasmic oxidative stress drives amyloid β oligomerization and cognitive impairment

○ 村上 一馬[1,2]，村田 央[2]，野田 義博[2]，田原 正一[2]，金子 孝夫[2]，木下 憲明[3]，初田裕幸[2]，村山 繁雄[2]，入江 一浩[1]，白澤 卓二[4]，清水 孝彦[2,5]
（[1]京大院農，[2]都老人研，[3]免疫生物研究所，[4]順天大院医，[5]千葉大院医）

○ Kazuma Murakami[1,2], Nakaba Murata[2], Yoshihiro Noda[2], Shoichi Tahara[2], Takao Kaneko[2], Noriaki Kinoshita[3], Hiroyuki Hatsuta[2], Shigeo Murayama[2], Kazuhiro Irie,[1] Takuji Shirasawa[4], and Takahiko Shimizu[2,5] ([1]Grad. Agri., Kyoto Univ., [2]TMIG, [3]IBL, [4] Grad. Med., Juntendo Univ., [5]Grad. Med., Chiba Univ.)

【目的】アルツハイマー病（AD）の原因物質である，アミロイドβ（Aβ）はオリゴマー化することによって，記憶異常およびシナプス毒性を誘導する．近年，生体内ラジカルの消去能の低下に伴う酸化ストレスは様々な神経変性疾患の原因とされているが,[1)] AD におけるオリゴマー形成との関係はほとんど明らかにされていない．本研究では，種々の老化症状[2)]（加齢黄斑変性，骨粗鬆症，皮膚の菲薄化，脂肪肝等）を示す細胞質スーパーオキシドディスムターゼ（SOD1）欠損マウスと AD モデルマウス（Tg2576）とを交配させることによって，細胞質酸化ストレスの各種 AD 症状への影響を調べた．

【方法】ELISA あるいはウェスタンブロッテイング法を用いて Aβ オリゴマー量，酸化ストレス，シナプス毒性，Aβ 産生酵素量，SOD 量を，免疫組織染色実験によって老人斑および神経炎症反応を，またモリス水迷路試験によって空間認知機能を、それぞれ評価した．

【結果】SOD1 を欠損した AD マウスは，AD マウスに比べて早期に（若齢時: 6~8 ヶ月齢）重篤な記憶異常を示すとともに，本症状はオリゴマー形成能，酸化ストレス，シナプス毒性の亢進とよく相関していた．また，本二重変異マウスは老齢時（15~17 ヶ月齢）では大脳皮質および海馬領域に顕著な Aβ 老人斑が認められ，アストログリアおよびマイクログリアに異常な炎症が観察された.[3)] さらに，Aβ の産生に関与する酵素量を調べたところ，細胞質酸化ストレスによって約 2 倍に増大した.[4)] 興味深いことに，ヒト AD 患者脳を用いて各種 SOD アイソザイムの量を調べたところ，非 AD 脳に比べて SOD1 のみ顕著に低下していた.[3)] 以上の結果より，SOD1 は AD 治療の有望な標的になることが示唆された．最近，細胞内オリゴマーと AD 発症との関連が注目されていることから，細胞質における酸化ストレスは新しい AD の増悪因子である可能性がある．

【参考文献】

1) Murakami, K. *et al., J. Amino Acids* **2011**, *2011*, ID654207.
2) Shimizu, T. *et al., Geriatr. Gerontol. Int.* **2010**, *10*, S70-S79.
3) Murakami, K. *et al., J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, in press.
4) Murakami, K. *et al.,* submitted for publication.

amyloid β, Alzheimer’s disease, oxidative stress

講演番号：3C28p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ C校舎28会場

インスリン抵抗性による高インスリン血症はアルツハイマー病様症状を増悪しない

Insulin resistance and hyperinsulinemia does not exacerbate Alzheimer's-like phenotypes in mice

○清水 孝彦[1,2]，村上 一馬[2,3]，横山慎也[2]，村田央[2]，小澤裕介[1,2]，入江 一浩[3]，白澤 卓二[4]
（[1]千葉大院医，[2]都健康長寿研，[3]京大院農，[4]順天大院医）

○ Takahiko Shimizu[1,2], Kazuma Murakami[3], Shinya Yokoyama[2], Nakaba Murata[2], Yusuke Ozawa[1,2], Kazuhiro Irie[3], Takuji Shirasawa[4] ([1]Chiba Univ., [2]TMIG, [3]Kyoto Univ., Juntendo Univ.)

【目的】インスリン抵抗性は、糖尿病などのメタボリック症候群の主要なリスク因子と考えられている。糖尿病罹患者はアルツハイマー病（AD）の発症リスクが高まる報告があり[1)]、糖尿病やインスリン抵抗性、および高インスリン血症とアルツハイマー病発症との関連が注目されている。これまで我々は、インスリン受容体の細胞内チロシンキナーゼ領域にアミノ酸変異を導入することで、人為的なインスリン抵抗性モデルマウスを作出してきた（インスリン受容体変異マウス）[2)]。本マウスはインスリン抵抗性による高インスリン血症を示すが、血糖は正常値を維持し糖尿病を発症せず、野生型と同等の個体寿命を示した[2,3)]。また興味深いことに Mn-SOD の発現亢進に伴う酸化ストレス耐性を示した[2)]。本研究では、インスリン受容体変異マウスと AD モデルマウス（J20 系統）とを交配することによって、インスリン抵抗性や高インスリン血症の各種 AD 症状への影響を調べた.

【方法】比色法と ELISA 法で血糖値および血中インスリン濃度を、ELISA 法と免疫組織染色法によって老人斑およびアミロイドβ（Aβ）量、脳酸化ストレスマーカーを定量した。またモリス水迷路、高架式十字迷路、および Y 迷路試験によって認知機能を評価した.

【結果】AD マウスにインスリン受容体変異を導入した二重変異マウスは、高インスリン血症を示すが、血糖値は正常値を示し、インスリン抵抗性のみを示す前糖尿病状態を維持していた。AD マウス（J20 系統）は 12 ヶ月齢で顕著な老人斑形成が認められる。12 ヶ月齢の二重変異マウスでは大脳皮質および海馬領域に有意な Aβ 老人斑の減少が認められたが、脳抽出物での Aβ 定量では減少は認められなかった。さらに３種の迷路試験において、２重変異マウスは，AD マウスと同様に顕著な記憶・学習異常を示した。さらに脳内酸化ストレスマーカーは有意な減少を示した。以上の結果から、インスリ受容体変異によるインスリン抵抗性は高インスリン血症を示すが、脳内アルツハイマー病様変化を増悪せず、認知機能も悪化させなかった[4)]。この結果は、アルツハイマー病の発症リスクはインスリン抵抗性ではなく、高血糖による糖尿病病態が必要であることが示唆された。

【参考文献】

1) Biessels, G.J. *et al., Lancet Neurol*. **2006**, *5*, 64-74.
2) Baba, T. *et al., J. Biol. Chem*. **2005**, *280*, 16417-16426.
3) Shimizu, T. *et al., J. Aging Res*. **2011**, *2011*, 315640.
4) Murakami, K. *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2011**, *409*, 34-39.

Insulin resistance, Hyperinsulinemia, Insulin signaling, Alzheimer's disease, Amyloid β

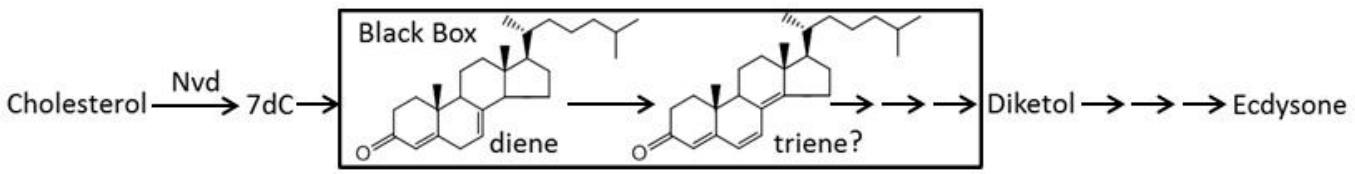
講演番号：3C28p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ C校舎28会場

Ecdysone生合成におけるBlack Box初期経路の中間体候補物質の解析

Analysis of candidate intermediates in the ecdysone biosynthesis pathway.

○木村亮太，吉永直子，森直樹，西田律夫，小野肇（京大農・応用生命）
○Ryohta Kimura, Naoko Yoshinaga, Naoki Mori, Ritsuo Nishida, Hajime Ono(Kyoto Uiversity, Department of Agriculture)

【目的】昆虫は脱皮，変態の過程を経て成長し，その形態変化は，ecdysone の分泌によって引き起こされる．Ecdysone はステロイドホルモンであり，昆虫は生体内でステロイド骨格を合成することができないため,摂食によって取り込んだcholesterol を前胸腺でecdysone に変換している．しかし，その中間体には不安定なものが多いため，生合成経路には Black Box が存在し，7-Dehydrocholesterol(7dC)から diketol までの経路が未解明である（図）．そこで本研究では，ショウジョウバエを用いて,Black box 内初期の中間体候補物質である cholesta-5,7-diene-3-one (diene)，cholesta-4,6,8(14)-triene-3-one（triene）について検討した．
【方法】Ecdysone の生合成経路において，cholesterol から7dC への生合成酵素として Neverland(Nvd)が同定されている．*Nvd*の遺伝子発現をRNAi法によりノックダウンしたショウジョウバエの１齢幼虫は，外部からのcholesterolの摂食だけでは脱皮できずに致死する．しかし，7dC を与えた場合は，ecdysoneを生合成して脱皮できることが報告されている．これより，7dC以降の中間体をエサとして与えた場合は，幼虫は脱皮できると考えられる．そこで中間体の候補物質であるdiene，trieneを有機合成し，幼虫のエサ酵母に添加し，その後の発育を観察した．
【結果】7dCをOppenauer酸化することでdieneを合成した（収率 41%）．さらに，dieneをDDQ酸化することでtrieneを得た（収率 21%）．まず，合成したdiene，trieneをエサ酵母に添加して1日後に残存率を調べたところ，dieneでは22%が，またtrieneでは43%が残ることを確認した．これより，1日ごとにエサを追加することで分解量を補うことができると考えた．
摂食試験の結果，エサ酵母のみ，あるいはtrieneを摂食させた場合では，共に2%が１齢から２齢に脱皮した．このことから，trieneはecdysoneの中間体である可能性が少ないと考えられる．一方，dieneを摂食させた場合では，58%の幼虫が１齢から２齢に脱皮した．以上より生体内でdieneからecdsysoneが合成されたと考えられ，dieneが中間体であることが強く示唆された．



Ecdysone予想生合成経路

Ecdysone, Black Box, *Drosophila melanogaster*

講演番号：3C28p20
講演日時、会場：3月24日17:48～ C校舎28会場

Ecdysone生合成中間体候補物質となる3-オキソステロイド類の解析

Conversion of 3-oxo steroids into ecdysteroids triggers molting in *Drosophila melanogaster*

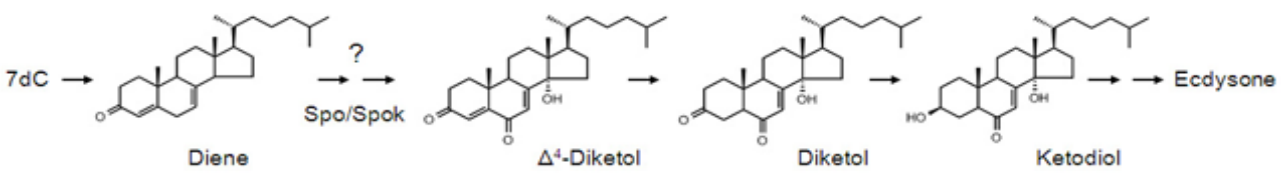
○小野 肇，森田 沙代，浅倉 一洋，木村 亮太，吉永 直子，森 直樹，西田 律夫（京大院農・応用生命）

○Hajime Ono, Sayo Morita, Takahiro Asakura, Ryohta Kimura, Naoko Yoshinaga, Naoki Mori, Ritsuo Nishida (Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】昆虫の脱皮ホルモンであるecdysoneの生合成経路は，いまだに完全に解明されていない．Ecdysone生合成経路では，cholesterolが7-dehydrocholesterolへと変換された後，数段階を経てエクジステロイド骨格を持つdiketolへと変換される．しかし，この過程は明らかにされておらず，Black Boxと呼ばれている．一方，ショウジョウバエからSpook(Spo)とSpookier(Spok)がBlack Boxで機能しているecdysone生合成酵素として同定されている．Spokは幼虫期に発現しているため，遺伝子発現をRNAi法でノックダウンした幼虫（*spok*-RNAi幼虫）は脱皮できずに1齢の段階で致死となる．これより，*spok*-RNAi幼虫を用いて，中間体候補物質となる3-オキソステロイド類の解析を行った．

【方法】*Spok*-RNAi幼虫は1齢致死であるが，ecdysoneやBlack Box以降の下流の中間体を摂取させると脱皮が可能となる．これより，中間体候補物質の3-オキソステロイド類(図)を与えて発育を観察した．さらに活性のあった中間体について，幼虫体内で変換されたエクジステロイドの定量とecdysone由来の20-hydroxyecdysone(20E)によって誘導される転写因子の発現を解析した．

【結果】*Spok*-RNAi幼虫にcholesta-5,7-diene-3-one (diene)，Δ^4-diketol，diketol，ketodiolを含む酵母エサを摂食させた．その結果，diketolやketodiolを与えた場合，約80%の1齢幼虫が2齢へと脱皮し，約10%の幼虫が3齢まで発育した．Δ^4-diketolを与えた場合，約15%の1齢幼虫が2齢へと脱皮したのち死亡した．なお，dieneを与えた場合は全ての幼虫が1齢で死亡した．次に，1齢幼虫の抽出物中のエクジステロイドを定量した．その結果，酵母エサのみを摂食させた場合に比べて，Δ^4-diketolあるいはdiketolを摂取させた場合，それぞれ，約8.5倍，約30倍のエクジステロイドが検出された．４種類の20E誘導遺伝子の発現量を解析した結果，diketolを摂取した1齢幼虫では，E74A，E74B，E75Aおよびβ-Ftz-F1は野生型幼虫と同程度に誘導された．一方，Δ^4-diketolを摂取した1齢幼虫では，E75Aのみが野生型幼虫と同程度に誘導された．E75Aは微量の20Eによって誘導されることから，Δ^4-diketolは*spok*-RNAi 幼虫体内で微量ながらエクジステロイドへと変換され，脱皮を引き起こすと考えられる．



Δ^4-Diketol, Spookier, *Drosophila melanogaster*

講演番号：3C29a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ C校舎29会場

Scr3のパルミトイル化依存的なエキソソーム分泌

Palmitoylation-dependent exosomal secretion of Scr3

○猪川亮[1]、犬塚達俊[1]、陳岑[1]、木津久美子[2]、柴田秀樹[1]、成田宏史[2]、牧正敏[1]
([1]名大院生命農・応用分子生命科、[2]京女大・食物栄養)

○Akira Inokawa[1], Tatsutoshi Inuzuka[1], Cen Chen[1], Kumiko Kizu[2] , Hideki Shibata[1], Hiroshi Narita[2], Masatoshi Maki[1] ([1]Dept.Appl.Mol.Biosci.,Grad.Sch.Bioagric.Sci., Nagoya Univ. [2]Dept.Food.Nutr.,Kyoto Women's Univ.)

【目的】Phospholipid scramblase(Scr)ファミリーには5種類のアイソフォーム（Scr1-5）が存在する。Scr1は主に細胞膜に局在し、核内において転写を制御することやパルミトイル化されてない変異体は核に移行することが知られている。また、Scr1は2-bromopalmitate(2-BP)によるパルミトイル化阻害剤の影響を受けずに細胞外に分泌されていることが報告されている。一方、当研究室ではScr1と相同性の高いScr3は2-BPの影響を受けて、細胞外への分泌量が減少することを報告した（犬塚ら　2011年日本農芸化学会中部・関西支部合同大会)。これはScr3のパルミトイル化が阻害されたことでエキソソームに取り込まれなかったのか、それともエキソソーム分泌に関わる他のタンパク質のパルミトイル化を阻害した結果なのか明確ではない。そこで本研究では、Scr3のパルミトイル化領域に変異を加えることで、Scr3のパルミトイル化がエキソソームとして分泌されることに影響を与えているか明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】Scr3のパルミトイル化領域におけるシステインをアラニンに置換したScr3の変異体を作製した。これをHEK293T細胞に発現させ、培養上清を回収し、100,000×ｇで遠心後のエキソソーム画分を回収した。Scr3特異抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、変異体ではScr3の分泌量が減少した。Scr3のパルミトイル化はエキソソームに取り込まれる過程に関与していると考えられた。次に、Scr3をHEK293T細胞に発現させ、前述のように回収し、NH_2OH（脱パルミトイル化試薬）で処理して、ウエスタンブロットを行った結果、Scr3のバンドがシフトした。これはエキソソーム画分のScr3はパルミトイル化されていることを示唆している。これらの実験結果からScr3はパルミトイル化依存的にエキソソームに取り込まれていると示唆された。さらに我々はS-パルミトイル化酵素であるDHHCの23種類を網羅的に調べ、どのDHHCがScr3のパルミトイル化に関与しているか、また、パルミトイル化によってScr3の分泌量が増加するかどうか目下検討中である。

exosome, palmitoylation, DHHC

講演番号:3C29a02
講演日時、会場:3月24日09:11～ C校舎29会場

ESCRT-III関連因子CHMP1Aのリン酸化に関する解析

Analysis of ESCRT-III-related protein, CHMP1A phosphorylation

○前本佑樹、木曽里美、大迫洋平、柴田秀樹、牧正敏（名大院生命農・応用分子生命科）
○Yuki Maemoto, Satomi Kiso, Yohei Osako, Hideki Shibata, Masatoshi Maki (Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ)

【目的・背景】

ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) はエンドサイトーシス経路に関与するタンパク質複合体で、細胞表面タンパク質の選別輸送の場であるMVB (multivesicular body) 形成に関与する。ESCRTにはESCRT-0, -I, -II, -IIIの4つの異なる複合体が存在し、その中でも数種類のCHMP (Charged multivesicular body protein)ファミリータンパク質からなるESCRT-III複合体は、膜への結合や自身のポリマー化によってレトロウイルスの出芽や細胞質分裂の最終段階など細胞膜の変形やくびり切りの際に機能する。

一方、CHMP1AはChromatin modifying proteinという別名があり他のCHMPタンパク質と異なり、核にも局在し、クロマチン凝集への関与が報告されている。

またCHMPと相同性の高いESCRT-III関連因子で、細胞質分裂の進行に寄与するIST1はCHMP1Aと結合する。

【方法・結果】

当研究室において培養動物細胞にFLAGタグ付加CHMP1Aを発現させると、FLAG抗体特異的に複数のバンドが検出された。IST1とCHMP1Aの相互作用解析ではCHMP1Aの高分子量側のバンドが優先的にIST1と結合することが明らかとなった。

その複数のバンドをさらに解析するため、電気泳動条件を検討したところ、バンドが4本あることが明らかになり、さらに脱リン酸化実験によりそのシフトの原因がリン酸化であることがわかった。さらに作製したCHMP1A（Δ173-196）の欠損変異体はシングルバンドであったため、173-196アミノ酸中のリン酸化される可能性のあるアミノ酸残基をそれぞれAlaに置換した変異体を作製し、CHMP1Aのリン酸化部位を明らかにした。

また免疫染色実験による局在解析では、C末端欠損CHMP1Aは野生型CHMP1Aと異なり核に局在しない。そのためリン酸化がCHMP1Aの局在および、機能に重要である可能性が示唆された。

ESCRT, CHMP, IST1

講演番号：3C29a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎29会場

小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送におけるカルシウム結合タンパク質 ALG-2 と annexin A11 の生理的役割

Physiological roles of Ca^{2+}-binding proteins ALG-2 and annexin A11 on ER-to-Golgi protein transport

○京卓志、横山健、山室南、杉浦洋文、牧正敏、柴田秀樹（名大院生命農・応用分子生命科）
○Takashi Kanadome, Takeru Yokoyama, Minami Yamamuro, Hirofumi Sugiura, Masatoshi Maki, Hideki Shibata (Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】小胞体からゴルジ体への順行輸送は COPII 小胞が担っている。我々は、5 つの EF-hand 構造を繰り返してもつ Ca^{2+}結合タンパク質 ALG-2 が、COPII 被覆構成タンパク質 Sec31A に Ca^{2+}依存的に結合することを報告している。さらに、ALG-2 はホモ 2 量体を形成することで 2 種のタンパク質の相互作用を橋渡しする Ca^{2+}依存的アダプターとして機能すると考えられるが、ALG-2 の標的タンパク質のひとつである annexin A11（AnxA11）が ALG-2 依存的に Sec31A と相互作用することを見出している。本研究では、ALG-2 と AnxA11 の COPII 小胞を介するタンパク質輸送における生理機能の解明を目指し、以下の解析を行なった。
【方法】分泌経路のタンパク質輸送を追跡するために、緑色蛍光タンパク質 SGFP2 を融合させた VSV-G tsO45（tsO45-GFP）を恒常的に発現する細胞株を作製した。VSV-G tsO45 は、水疱性口内炎ウィルス由来の糖タンパク質の温度感受性変異体であり、非許容温度（39 ℃）で小胞体に滞留するが、許容温度（32 ℃）で小胞体からの分泌経路に沿った輸送が開始される。小胞体に存在する VSV-G に付加された N 結合型糖鎖は endoglycosidase H（Endo H）で切断される。一方、medial Golgi 以降の分泌経路に存在する VSV-G の糖鎖は Endo H の基質とはならない。よって、Endo H 耐性の獲得はゴルジ体へ到達したことの指標となる。まず、RNA 干渉法により tsO45-GFP 恒常発現細胞の ALG-2 および AnxA11 の発現量を低下させ、39 ℃で一晩培養後、32 ℃に移し経時的に細胞溶解液を調製した。次に、溶解液を Endo H で処理し、SDS-PAGE にて展開後、抗 GFP 抗体を用いて tsO45-GFP をブロットした。そして、tsO45-GFP の輸送効率をバンドシフトの割合から算出した。また、tsO45-GFP の局在様式を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。
【結果】ALG-2 および AnxA11 が比較的多く発現しているヒト繊維芽肉腫細胞 HT1080 において、32 ℃への温度シフト 30 分後に、約 50%の tsO45-GFP が Endo H に耐性となった。これに対し、ALG-2 および AnxA11 を発現抑制した細胞では、20 分ですでに約 50%が Endo H 耐性であった。また、10 分後から 20 分後の Endo H 耐性割合の増加率に顕著な違いが検出された。この現象は、tsO45-GFP の局在様式の変化からも観察された。つまり、ts045-GFP のゴルジ体への集積が、ALG-2 および AnxA11 の発現抑制細胞では、温度シフト後、早い時間帯から観察された。これらの結果は、ALG-2 と AnxA11 が小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送において抑制的に機能していることを示している。

calcium, COPII, vesicular transport

講演番号：3C29a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎29会場

新規ALG-2相互作用因子CHERPの細胞内局在と分子特性解析

Analyses of subcellular localization and molecular properties of the novel ALG-2-interacting protein CHERP

○大杉　桂奈江、井元　千晶、柴田　秀樹、牧　正敏（名大院生命農・応用分子生命科）
○Kanae Osugi, Chiaki Imoto, Hideki Shibata, Masatoshi Maki (Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】ALG-2はアポトーシス関連遺伝子にコードされる約20 kDaのタンパク質として同定され、分子内にカルシウム結合モチーフであるEF-handが5つ連続したpenta-EF-handドメインが存在する。カルシウムが結合することによってALG-2の構造が変化し、様々なタンパク質と相互作用することが知られているが、生理機能については不明な点が多い。ALG-2の新たな機能解明の手がかりを得るために新規相互作用因子の探索を行った結果、これまでに数種類の候補が得られていた。その1つであるCHERP（Calcium Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein）は、Ins(1,4,5)P_3受容体と同様に小胞体など核周辺部に局在し、細胞周期や細胞内カルシウム動員の制御に関わっていることが報告されている。一方、CHERPにはデータベース上、SerとArgに富む領域やRNAポリメラーゼⅡのC末端と相互作用するCID（CTD-Interacting Domain）など、RNAプロセシングに関与する領域が複数存在する。本研究はCHERPの細胞内局在と分子特性を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】主にスプライシング過程においてエキソン認識機能をもつSRタンパク質ファミリーが共通してもつSerとArgに富む領域はRSドメインと称されるが、CHERPに存在するSerとArgに富む領域はRSドメインとして注釈されておらず、共通の性質をもつかどうか不明であった。そこで、我々は、リン酸化RSドメインを共通に認識する抗体を用いたウェスタンブロッティング解析を行ったところ、CHERPに相当する特異的なバンドが検出され、CHERPは、恒常的にリン酸化されたRSドメインをもっていることが強く示唆された。次に、CHERPの分子的特性を調べるため、CHERPの細胞内局在解析を行った。GFP融合CHERPをHeLa細胞に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、これまでに報告されていたような小胞体や核周辺部ではなく、主に核質に局在を示した。抗CHERPポリクローナル抗体を作製し、内在性CHERPタンパク質の免疫染色を行ったところ、GFP-CHERPと同様の局在を示した。また、17S U2 snRNPの構成因子であり、核スペックルに局在するSF3A2と一部共局在した。さらに、細胞分画の結果、CHERPは核画分に分画され、生化学的解析においてもCHERPが核に局在することが判明した。そこで、HEK293T細胞の核画分を用いてGST-ALG-2プルダウン法によりCHERPとALG-2の相互作用を解析した。その結果、RNase処理をしてもCHERPはALG-2との相互作用を示したが、カルシウムキレート剤EGTAを加えるとその相互作用は検出されなかった。さらにSF3A2もCHERPと共にALG-2のプルダウン産物中に検出された。以上の結果より、CHERPが核内において、SR様タンパク質として機能している可能性が示唆され、またALG-2の新規相互作用因子であることが明らかとなった。

ALG-2, calcium, RNA processing factor

講演番号:3C29a05
講演日時、会場:3月24日09:44～ C校舎29会場

mRNA輸送因子DBP5の核-細胞質間輸送とmRNA輸送の相関性

The relativity of DBP5, which is essential for mRNA export, nucleocytoplasmic transport and mRNA export

○志岐拓哉、宮前友策、永尾雅哉、神戸大朋、増田誠司（京大生命・統合生命）
○Takuya Shiki, Yusaku Miyamae, Masaya Nagao, Taiho Kambe, Seiji Masuda (Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ.)

【目的】真核生物においてmRNAは核内で合成される。その後、mRNAは核膜孔を通過して核から細胞質へと輸送されタンパク質合成の鋳型として利用される。DBP5は、mRNAが核膜孔を通過して核から細胞質へ輸送されるために必須の因子である。また核膜孔の細胞質側に局在することが機能発現に重要であることが知られている。一方出芽酵母では、DBP5は核内に移動することが報告されており、DBP5の機能と局在の関係は未解明のまま残されている。本研究は、DBP5の核内移行とmRNA輸送との関係を明らかにすることを目的として行った。
【方法】ヒトDBP5が核内に移動するかについて、ヒト培養細胞を用いて免疫蛍光染色により解析した。次にDBP5内の核内・核外移行に重要な領域について、様々な変異体を作製しその局在変化を観察して核内・核外移行に必要な領域を決定した。またDBP5の核-細胞質間輸送様式を検証するため、DBP5とタンパク質輸送担体との結合性を観察した。最後にDBP5の核-細胞質間移行とmRNA輸送の関係性を検証するため、作製した変異型DBP5が野生型DBP5と同様に、機能発現に重要な核膜孔の細胞質側に配位するかについて免疫蛍光染色により解析した。またRNA-FISHを用いて細胞内mRNAを可視化し、各変異型DBP5発現時のmRNA輸送能を検証した。
【結果】ヒトDBP5は主として細胞質に局在したが、核から細胞質へのタンパク質輸送担体CRM1の阻害により核内に局在が変化した。そこで様々な変異DBP5を作製し、核から細胞質、細胞質から核への移動に重要な領域を決定した。またヒトDBP5は細胞質から核へのタンパク質輸送担体であるImportinαとの結合性を有し、またCRM1との結合性も観察した。これら局在変化と結合解析の結果から、ヒトDBP5はRan-GAP系を介して核-細胞質間移行することを明らかにした。さらに核-細胞質間移行の変異型DBP5は、mRNA輸送に重要な核膜孔の細胞質側に局在できなかった。しかも野生型DBP5は、内因性DBP5のノックダウン時に見られるRNAの核内への蓄積を補完できるのに対し、各変異型DBP5は補完できなかった。これらのことよりヒトDBP5の核内移行はmRNA輸送に関与しており、『DBP5は細胞質から直接核膜孔に配位せず、細胞質から核に移動した後、再度細胞質へ移動する時に核膜孔の細胞質側に配位する。その後DBP5は核膜孔の細胞質側でmRNAを輸送する。』というモデルを考えた。

mRNA export, DBP5, nucleocytoplasmic transport

講演番号：3C29a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ C校舎29会場

ヒト老化細胞における核内構造の変化

Structural changes of the nuclear envelope in human senescent cells

○ 新井　留実、谷脇　歩美、三木　健輔[1]、藤井　道彦[1]、鮎沢　大[1]
（横浜市大・国際総合・環境生命、[1]横浜市大・生命ナノシステム）
○Rumi ARAI, Ayumi TANIWAKI, Kensuke MIKI[1], Michihiko FUJII[1], Dai AYUSAWA[1] (Int' l. Grad. Sch. of Arts and Sci., Yokohama City Univ., [1]Grad. Sch. of Nanobiosci., Yokohama City Univ.)

【目的】細胞老化の誘導手段と表現型は非常に多様である。当研究室では核膨張および核膜の構造変化が老化細胞に共通の現象であることを見いだした。核内膜はヘテロクロマチンと結合し、核膜構造の維持と細胞老化特異的遺伝子の発現抑制を行っている。我々は、細胞老化に伴う核膨張がこの結合を破壊すると考えている。本研究では、核膜とヘテロクロマチンの結合を仲介する複数のタンパク質が細胞老化に伴いどのように変化するか調べた。
【方法】過剰チミジンはDNAの複製遅延(細胞の不均衡増殖)を引き起こすことによって細胞老化を誘導する。一方、BrdUは直接DNAに取り込まれ、クロマチン構造を変化させることで細胞老化を誘導する。この２つの老化誘導法を用いて老化誘導させたヒト子宮頸癌細胞(HeLa)の核膜タンパク質について免疫染色を行い、老化細胞における核膜構造の変化を検討した。また、核膜構造の変化の詳細を検討するために、核膜とヘテロクロマチンの結合に関与するタンパク質に蛍光タンパク質を融合させてHeLa細胞で発現させた。
【結果】老化細胞では、いくつかの核膜タンパク質について局在変化が見られた。現在その詳細について検討中である。

Keyword1 senescence, Keyword2 nuclear, Keyword3 nuclear envelope

講演番号：3C29a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎29会場

老化による血管の機能変化とその予防法の確立

Functional changes in senescence of blood vessel and its application

○都築 毅、谷中美由紀、池田郁男（東北大院・農）
○Tsuyoshi Tsuduki, Miyuki Yanaka, Ikuo Ikeda (Tohoku Univ.)

【目的】近年、血管の老化が動脈硬化症や糖尿病などの加齢に伴って増加する老化性疾患の発症と関連があるとして注目されているが、詳細は明らかではない。そこで本研究では、その関連を明らかにするために、培養細胞試験にて血管内皮細胞の老化による機能変化について詳細に検討した。また、血中glucose濃度が高いと血管老化が進行することが知られている。老化は疾患ではなく、加齢に伴って徐々に進行するため、老化性疾患の予防には食事や食品による老化遅延法が有効である。そこで、血管内皮細胞を高血糖状態にて老化を促進し、桑葉に多く含まれる食品成分（1-deoxynojirimycin, DNJ）による血管内皮細胞の老化制御についても検討した。
【方法】① ヒト血管内皮細胞HUVECを細胞分裂限界に達するまで培養し、老化モデル細胞を作製した。WST-1法による細胞増殖試験、SA-β-Gal染色による老化細胞の検出、老化関連遺伝子pai-1、p21のmRNA発現量の測定にて、老化の評価を行った。また、老化による機能変化を詳細に検討するため、PDL9、30のHUVECを用いて、計84個の内皮細胞機能に関わる遺伝子のmRNA発現量をリアルタイムPCRにて測定した。② 桑葉に多く含まれ食後の高血糖を抑制する働きをもつDNJをHUVECに長期暴露し、①と同様に老化の評価を行った。コントロール（CO ： glucose濃度5.6 mM）群、高glucose（HG ： glucose濃度30 mM）群、HG＋DNJ（10 μM）群で、老化の進行度について比較検討した。
【結果】① 細胞増殖能はPDLの増加に伴い低下し、試験開始150日後のPDL30で細胞分裂限界に達した。SA-β-Gal染色にて老化による細胞形態の変化を観察したところ、PDLの増加により細胞は巨大化し、老化細胞の割合は有意に増加した。老化関連遺伝子pai-1、p21のmRNA発現量は、共にPDL9と比較してPDL30で有意に増加した。これより、細胞老化はPDLの増加により進行することが確認された。また、PDL9と比較してPDL30で、内皮細胞機能に関わる84遺伝子のうち14遺伝子の発現が2倍以上に上昇した。特に、単球接着を促進する接着分子（icam1、sele、ccl2、itgb3、itgav、itgb1）の発現上昇が特徴的だった。実際に、PDL9、30のHUVECと、Calcein AMで蛍光標識したヒト単球細胞THP-1とを共培養し、単球接着試験を行ったところ、PDL30で単球接着の増加が認められ、老化により単球接着が促進されることが明らかとなった。単球接着は動脈硬化症の最も初期に必ず見られるイベントであることから、血管内皮細胞の老化による単球接着促進が動脈硬化症発症の原因の一つであることが示唆された。② CO群と比較してHG群で細胞増殖能の低下が観察されたが、HG＋DNJ群で改善された。また、PDL30における老化細胞の割合は、CO群と比較してHG群で有意に増加したが、HG群と比較してHG＋DNJ群で有意に減少した。これより、DNJは高glucoseによって誘導される血管内皮細胞の老化を遅延し、老化性疾患の予防に有効であることが示唆された。

senescence, HUVEC, 1-deoxynojirimycin

講演番号：3C29a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ C校舎29会場

老化関連因子による肝機能制御に関する研究

Senescence-associated genes regulate hepatic functions.

○ 續　祐実、鵜殿　美弥子、片倉　喜範[1]（九大院・生資環、[1]九大院・農院）

○ Yumi TSUDUKI, Miyako UDONO, Yoshinori KATAKURA[1] (Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [1]Fac. Agri., Kyushu Univ.)

【目的】最近になり、細胞の老化誘導に対して必須の役割を演じるような細胞老化関連遺伝子の同定が進み、これらの遺伝子と個体老化や加齢性疾患発症に対する関係性に関する研究が精力的に行われている。これまでの本研究室における研究で、ヒト正常線維芽細胞（TIG-1）をモデル細胞として16種の細胞老化関連因子（Senescence associated genes：SAGs）の同定に成功した。本研究では、これらSAGsによる肝機能制御の可能性について明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法】遺伝子の発現解析は、定量RT-PCR法により行った。SAGsのノックダウン及び強制発現はレトロウイルス発現系を用いて検証した。細胞老化表現型・肝細胞表現型は、各種マーカーを用いてImaging Cytometer（IN Cell Analyzer 1000, GE Healthcare)により定量的な評価を行った。

【結果と考察】まずSAGsの細胞老化の進行に伴う発現変化を、若いTIG-1細胞（PDL37）と老化したTIG-1細胞（PDL63）を用いて検証した。その結果、細胞の分裂老化に伴い発現が増強する遺伝子として4種（SAG3, SAG5, SAG12, SAG13)、減少する遺伝子10種（SAG1, SAG2, SAG4, SAG6, SAG8, SAG9, SAG10, SAG14, SAG15, SAG16）を同定した。

次にこれら遺伝子の中で、ミトコンドリア機能を制御するPPARγ coactivater-1α(PGC1-α)と複合体を形成し、肝臓の脂肪酸酸化遺伝子の転写活性を誘導していることが知られているSAG10に焦点を絞り詳細な解析を行うこととした。まずSAG10の細胞老化表現型の誘導・抑制に及ぼす影響を明らかにするため、SAG10をノックダウンしたTIG-1細胞及び強制発現したTIG-1細胞を作製した。これらの細胞の細胞老化表現型をIN Cell Analyzer1000を用いて評価した結果、SAG10をノックダウンした細胞では細胞老化マーカーSA-β-Gal活性の増強、強制発現した細胞ではその低下が観察された。以上の結果から、SAG10は若い細胞において抗老化効果を発揮し、その発現低下が細胞老化誘導に結びついているものと考えることができた。

次に、肝細胞における脂肪滴合成へのSAG10の関与を調べるため、脂肪肝のモデル細胞としてヒト肝臓がん由来(HepG2)細胞を用いた。5日間のパルミチン酸処理を行ったところ、SAG10の発現の低下とそれに伴う脂肪滴の蓄積が観察された。今後は、脂肪肝発生に対する細胞老化プログラム及びSAG10の関与についてさらに詳細に明らかにする予定である。

Keyword1, senescence . Keyword2, Hepatocyte . Keyword3, Senescence-associated gene

講演番号：3C29a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎29会場

アルギニン変異導入法によるABCA1のTM6とTM12の配向性の予測

Prediction of orientations of TM6 and TM12 of ABCA1 by Arginine-scanning mutagenesis

○伊藤 晋平[1]、山崎 亮[1]、長尾 耕治郎[2]、植田 和光[1,2]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大・iCeMS）
○Shimpei Ito[1], Ryo Yamasaki[1], Kohjiro Nagao[2], Kazumitsu Ueda[1,2]（[1]Kyoto univ. Agric., [2]Kyoto univ. iCeMS）

【目的】ABCA1は、細胞中の過剰なコレステロールを血漿中の脂質アクセプターであるapoA-Iに受け渡すことによって高密度リポタンパク質（HDL）を新生する。ABCA1の輸送基質は、ABCA1が持つ12本の膜貫通ヘリックスから構成される膜貫通領域において認識されると考えられるが、膜貫通領域中のどのアミノ酸残基が基質認識部位を形成しているかは不明であり、ABCA1の基質輸送機構の詳細は明らかにされていない。一方、同じABCタンパク質であるMDR1（ABCB1）では、12本の膜貫通ヘリックスのうち、6番目と12番目のヘリックス（TM6とTM12）が基質認識において重要であるとX線結晶構造により示されていることから、ABCA1の基質認識においてもそれらが重要であると考えられる。本研究では、アルギニン変異導入法を用いて、まずABCA1のTM6とTM12の配向性を予測することを目的とした。
【方法】アルギニンは高い正電荷を持つアミノ酸であり、膜タンパクの膜貫通ヘリックスにアルギニン残基を導入すると、その周囲に親水性領域が形成される。もし膜貫通ヘリックスの脂質二重膜と相互作用する疎水性領域にアルギニン残基を導入した場合、その変異体は大きく立体構造を崩し、細胞の品質管理機構により小胞体あるいはゴルジ体に留められると期待される。一方、アルギニン残基を親水性面に導入した場合、立体構造への影響は小さく、その変異体の細胞膜への局在は抑制されないと予想される。本研究では、TM6とTM12を構成するアミノ酸を順番に1つずつアルギニン残基に置換した変異体23種と22種をそれぞれ作成し、それらの細胞膜への局在の有無を検討した。各変異体の作成には、HAタグ（YPYDVPDYA）が細胞外領域に挿入されたGFP融合型ABCA1を用い、それらをヒト培養細胞HEK293に発現させ、細胞膜への局在を抗HA抗体による免疫染色とGFPの蛍光観察を行うことで検討した。
【結果】免疫染色の結果、各変異体のHA染色の蛍光強度は、まったく観察できないものから野生型ABCA1と同程度に確認できるものまで様々であった。そこで、各変異体の細胞膜への局在性を3段階に分類し、ヘリカルホイールにプロットしTM6とTM12それぞれについて基質通過領域側と脂質二重膜と相互作用する領域を予測した。

ABCA1, HDL, cholesterol

講演番号：3C29a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ C校舎29会場

Cyclospoline AによるABCA1の阻害機構の解析

Analysis of mechanism for inhibition of ABCA1 by cyclospoline A

○長尾 耕治郎[1]、前田 南[2]、植田 和光[1,2]（[1]京大・iCeMS、[2]京大院農・応用生命）
○Kohjiro Nagao[1], Maeda Minami[2], Kazumitsu Ueda[1,2]（[1]Kyoto univ. iCeMS、[2]Kyoto univ. Agric.）

【背景・目的】ABCトランスポーターであるABCA1は血液中のapolipoproteinA-I(apoA-I)に細胞の過剰なコレステロールを受け渡すことで、善玉コレステロールとして知られる高密度リポタンパク質（HDL）を形成する。HDL形成が末梢組織の過剰なコレステロールを除去する唯一の経路であるため、ABCA1は体内のコレステロール恒常性の維持に重要である。しかし、ABCA1がどのようにしてHDLを形成するのか、その機構は良くわかっていない。そこで、本研究ではABCA1と同じABCトランスポーターであるMDR1(ABCB1)の阻害剤がABCA1へ与える影響を調べることで、ABCA1によるHDL形成の機構を解析することにした。
【方法】ハムスター培養細胞BHK細胞に過剰発現させたヒトABCA1のHDL形成活性へのMDR1阻害剤cyclosporine A(CsA)、FK506、rapamycinの影響を解析した。また、これまでに我々はABCA1の機能がapoA-I受容体と脂質トランスポーターの２つにわけられ、両者がHDL形成に必須であることを報告した。本研究では、ABCA1のこれらの機能へ与えるMDR1阻害剤の影響を解析した。
【結果】ABCA1によるapoA-Iに依存したコレステロール排出をCsA、FK506、rapamycinは濃度依存的に阻害した。また、これらの阻害剤はABCA1のapoA-I受容体としての機能と脂質トランスポーターとしての機能の両方を阻害した。しかし、ABCA1の発現量はこれらの阻害剤によって低下しなかった。CsAとFK506はカルシニューリン（PP2B）を、rapamycinはmTORを阻害することが知られている。しかし、ABCA1を阻害するためには高濃度の阻害剤が必要であり、低濃度ではカルシニューリンやmTORは阻害されたが、ABCA1は阻害されなかった。このことから、これらの阻害剤によるABCA1の阻害はPP2BやmTORの阻害を介したものではないことが示された。さらに、精製ABCA1と放射性同位体標識したCsAは直接結合した。以上の結果から、これらの阻害剤はABCA1に直接結合し、ABCA1のapoA-I受容体としての機能と脂質トランスポーターとしての機能の両方を阻害することで、HDL形成を抑制することが明らかになった。

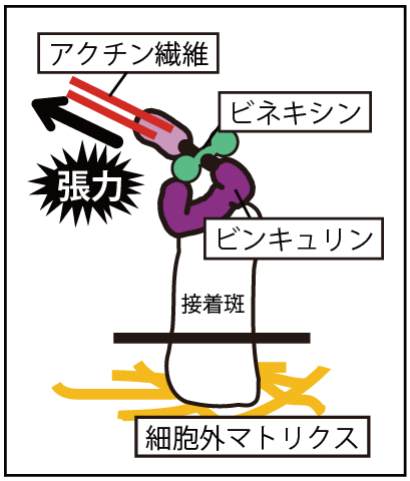
ABCA1, cholesterol, cyclosporine A

講演番号：3C29a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ C校舎29会場

接着斑でのメカノセンシングにおけるビネキシンの役割

Vinexin is involved in the focal adhesion-mediated mechanosensing.

○山下　寛[1]、市川　尚文[1]、松山　大輔[1]、植田　和光[1,2]、木岡　紀幸[1]（[1]京大院・農、[2]京大・iCeMs）
○Hiroshi Yamashita[1]、Takafumi Ichikawa[1]、Daisuke Matsuyama[1]、Kazumitsu Ueda[1,2]、
Noriyuki Kioka[1]（[1]Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ.、[2]iCeMs, Kyoto Univ.）



【背景・目的】近年、「細胞外基質(ECM)の堅さ」が細胞の運命決定に重要であることが分かってきた。例えば、多能性幹細胞は周囲のECMの堅さに応じて、やわらかいと神経細胞や脂肪細胞に、堅いと骨芽細胞へ分化する。これまでの研究から、細胞はECMとの接着部位(FA)に繋がるアクチン繊維で、FAごとECMを引っ張り、そこに掛けることのできる張力の最大量を知ることでECMの堅さを感知していると考えられている（右図）が、そのメカニズムはよく分かっていない。我々は、FAにアクチン繊維を繋ぎ留めるタンパク質「ビンキュリン」と、その結合タンパク質「ビネキシン」に着目し、その相互作用が「堅さを感知するメカノセンサー」として機能する可能性を検証している。まず、重合度の異なるアクリルアミドゲルに等量のコラーゲンIをコートすることで、「ECMの堅さ」だけを任意に変えることのできる細胞培養系を確立し、このゲル上でマウス胎児由来の繊維芽細胞(MEF)を培養した。この時、ECMが堅い時ほど、FAでの界面活性剤耐性なビンキュリン量が増加していることを昨年報告した。これは、アクチン繊維と強く結合したビンキュリンが増加したことを示している。

【方法・結果】これまでの研究から、「ECMの堅さに応じてビンキュリンがFAに安定的に存在するようになる」という仮説を立て、FRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching)法を用いて、ビンキュリンのターンオーバーを解析した。その結果、ECMが堅いとビンキュリンのFAでのターンオーバーが抑制され、より安定的にFAに局在していた。この時、ビネキシンと結合できないビンキュリン変異体では、堅さの違いによるビンキュリンのターンオーバーの変化は見られなかった。さらに、ビネキシン遺伝子欠損(KO) MEFでは堅さの違いによるビンキュリンのターンオーバーの変化は起こらず、ビネキシンを再発現させることで再び変化するようになった。以上より、ECMの堅さ依存的なビンキュリンの安定化にはビネキシンとの相互作用が必須であることが明らかとなった。そこで、ビネキシンがFA全体を安定化させている可能性を調べるため、別のFAタンパク質パキシリンの安定性をFRAPにより評価した。すると、ビンキュリンとは逆に、ECMが堅い時ほどターンオーバーが促進されていた。しかし、KO MEFではこの変化が見られず、パキシリンの変化にもビネキシンが必要であることがわかった。以上の結果から、ECMの堅さに応じてビンキュリンービネキシン相互作用が促進され、FAの構成分子の安定性を変化させることが、メカノセンシングのメカニズムの一端であると考えている。

ECM, cell adhesion, rigidity

講演番号：3C29a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ C校舎29会場

間葉系幹細胞における接着斑タンパク質ビンキュリンの細胞外基質の堅さに応じた挙動変化

Behavior of focal adhesion protein vinculin is altered by the rigidity of extracellular mtrix in mesenchymal stem cells.

○和田 洋樹[1]、山下 寛[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1]（[1]京大院・農・応用生命、[2]京大・iCeMS）

○Hiroki Wada[1], Hiroshi Yamashita[1], Kazumitsu Ueda[1,2], Noriyuki Kioka[1]（[1] Applied Life Sciences・Graduate School of Agriculture・Kyoto Univ., [2]iCeMS・Kyoto Univ.）

【目的】多分化能を持つ間葉系幹細胞が脂肪細胞、筋芽細胞、骨芽細胞等への分化方向を決定する際、細胞外基質(ECM)の堅さが関与していることが近年明らかになってきた。細胞はECMとの接着構造(接着斑)を介して堅さを感知していると考えられている。これにはアクチン繊維を利用した細胞内張力が重要であるとされているが、その詳細な仕組みは解明されていない。我々は接着斑に集積する主要なタンパク質で、アクチン繊維と結合するビンキュリンに着目して研究を進めている。これまでにマウス胚性繊維芽細胞では、(a)ECMが堅いときほど接着斑に存在するTritonX-100に耐性なビンキュリンが増え、さらに接着斑での局在が安定化していること(b)この現象はビンキュリン結合タンパク質ビネキシンの発現に依存していること、を示しており、繊維芽細胞においてはビンキュリンービネキシン相互作用がECMの堅さを感知する装置の一部として機能している可能性を示してきた。しかし、間葉系幹細胞においてビンキュリンが同様の機能を持つかは不明であった。本研究では間葉系幹細胞においても繊維芽細胞と同様にECMの堅さに応じて接着斑でビンキュリンの挙動が変化し、これがビネキシンとの相互作用に依存するかを検証することを目的とする。

【方法】顕微鏡観察用のカバースリップ上にビスアクリルアミドの濃度を変えることで堅さの異なるアクリルアミドゲルを作製した。これをコラーゲンIでコートした後、このゲル上でマウス骨髄由来間葉系幹細胞株のST2細胞を培養した。TritonX-100を含むバッファーで処理することで細胞を透過し、細胞骨格およびそれに強く結合している成分以外を洗い流した。これを4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗ビンキュリン抗体、抗ビネキシン抗体を用いて免疫染色を行い共焦点蛍光顕微鏡により観察した。また、その結果をImageJを用いて定量化した。

【結果】ST2細胞のTritonX-100に耐性な接着斑に局在するビンキュリンの染色強度は、堅いゲル上の細胞ほど強かった。またビンキュリンを含む接着斑の大きさの平均は、堅いゲル上の細胞では柔らかいゲル上の細胞に比べて大きかった。この結果は繊維芽細胞を用いて行った実験の結果と同様のものであった。このことは、間葉系幹細胞においてもビンキュリンがECMの堅さに応じて接着斑での挙動を変化させていることを示しており、ビンキュリンは間葉系幹細胞においてもECMの堅さを感知するための装置の一部として機能していることが期待される。現在ビネキシンの安定過剰発現株、及びshRNAを用いたビネキシンの発現抑制株を用いて、ビネキシンービンキュリン相互作用の重要性についても検討しており、合わせて報告する。

mesenchymal stem cell、 focal adhesion、 vinculin

講演番号：3C29a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ C校舎29会場

クローン病関連タンパク質Dlg5とTGF-βI型受容体の結合部位の同定

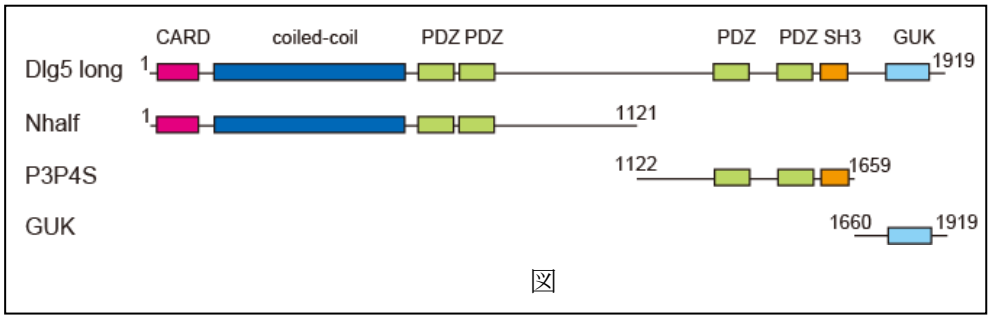
Identification of the binding site on Dlg5 for TGF-β type I receptor.

○瀬崎　拓人[1]、市川　尚文[1]、Lucia Tomiyama [1]、植田　和光[1,2]、木岡　紀幸[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大iCeMS）

○Takuhito Sezaki[1], Takafumi Ichikawa[1], Lucia Tomiyama[1] Kazumitsu Ueda[1,2], Noriyuki Kioka[1] ([1]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ., [2]iCeMS., Kyoto Univ)

【目的】クローン病関連因子Dlg5/lp-dlgは、N末側からCARDドメイン、coiled-coilドメイン、4つのPDZドメイン、SH3ドメイン、GUKドメインを持つ、MAGUKファミリータンパク質に属するアダプター型のタンパク質である。これまでにDlg5は細胞-細胞間接着領域に局在し、細胞-細胞間接着分子E-カドヘリンの主要な裏打ちタンパク質であるβ-カテニンやビネキシンと結合することが分かっている。我々はこれまでにDlg5が高レベルに発現している近位尿細管由来上皮細胞LLc-PK1細胞において、Dlg5がTGF（Transforming growth factor）-β受容体に依存したp38やJNKキナーゼを調節し、上皮間葉転換を抑制していることを報告してきた。また前回大会で、野生型Dlg5はTGF-βI型受容体(TβRI)と結合し、分解することを報告した。本研究ではDlg5とTGF−βI型受容体の結合部位を同定することを目的とした。

【方法】TβRIとの結合部位同定実験を行うために、GFPタグを付加した様々なDlg5の欠失変異体を作製した（図）。293T細胞に作製したDlg5変異体とFlagタグを付加したTβRIを共発現させ、抗GFP抗体を用いた免疫沈降を行った後、共沈降してきたTβRIを抗Flag抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。



図

【結果】Dlg5のCARD、coiled-coil、N末側の2つのPDZドメインを含む欠失変異体（Nhalf）及び、C末側の2つのPDZドメイン、SH3ドメインを含む欠失変異体（P3P4S）はTβRIと結合した。この結果から、Dlg5には少なくとも二か所のTβRI結合領域が存在することが明らかになった。

Dlg5, EMT, TGF-β

講演番号：3C29p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ C校舎29会場

ヒト上皮ナトリウムチャネル活性化剤S3969の蛍光膜電位測定による活性評価

Evaluation of hENaC activator S3969 using the membrane potential-sensitive dye

○松田　龍星[1]、櫻井 敬展[1,2]、石丸 喜朗[1]、森　直紀[1]、渡邉　秀典[1]、三坂 巧[1]、阿部 啓子[1]、朝倉 富子[1]（[1]東大院農生科･応生化、[2]日清食品HD･食総研）

○Ryusei Matsuda[1], Takanobu Sakurai[1,2], Yoshiro Ishimaru[1], Naoki Mori[1], Hidenori Watanabe[1], Takumi Misaka[1], Keiko Abe[1], Tomiko Asakura[1]

([1]University of Tokyo, [2]Nissin Foods Holdings)

【目的】ヒト上皮ナトリウムチャネル(以下hENaC)は、腎臓におけるナトリウムイオンの再吸収に深く関わり、生体における塩化ナトリウムの恒常性の維持に重要な働きをすることが知られている。hENaCの活性化剤としてはLu, M. et al.(2008)がS3969を見出しており、電気生理学的手法によりその効果が検証された。本研究では、膜電位感受性色素を用いて、S3969のhENaC活性化作用の計測が可能であるか、ひいては、hENaC活性化剤のハイスループットスクリーニングに適用可能かどうかを検証することを目的とする。

【方法】hENaCα,β,γの三つのサブユニットを、遺伝子導入により一過的に発現させた培養細胞に、膜電位感受性色素(FLIPR Membrane Potential Assay Kit, Molecular Device製)を低ナトリウムバッファー中で負荷した。ここに、一定濃度の塩化ナトリウムを含むサンプル溶液を添加すると、hENaCを通したナトリウムイオンの流入が起こるので、培養細胞の膜電位変化が引き起こされる。この変化を、膜電位感受性色素の蛍光強度の変化値として観測した。また、添加する塩化ナトリウム含有サンプル溶液は、S3969添加と無添加のものを用意し、両者間の差を検討した。

【結果】塩化ナトリウムを添加すると、その終濃度が1 mM～50 mMの範囲で塩化ナトリウムの濃度依存的な蛍光強度の変化が認められた。S3969添加群と無添加群の蛍光変化の差は、添加する塩化ナトリウムの終濃度が低いほど顕著になり、その終濃度が20 mM以下の条件で、S3969添加と無添加の間で有意な差が認められた。このときの両群間の蛍光強度変化値の差が、S3969のhENaC活性化作用を反映しているといえる。また、計測条件の最適化を検討したところ、蛍光色素の細胞内からの流出を抑えるために使用されるプロベネシドの添加により、S3969の活性化は大きく検出されるようになり、実験条件としては、プロベネシド存在下で塩化ナトリウムの終濃度が5 mMの条件が、測定誤差とS3969の効果の大きさの観点から最適であった。イオンチャネルの機能評価に一般的に使用される電気生理学的手法に比べ、膜電位感受性色素を用いた評価系は一度の実験でより多くの検体をより短時間で調べることが可能であった。これらのことから、この系が、膜電位を用いたS3969のhENaC活性化作用を計測するに適当であること、また、hENaC活性化剤のハイスループットスクリーニングに適用可能であることが示された。

ENaC, NaCl, FlexStation

講演番号：3C29p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ C校舎29会場

β-ユーデスモールによる冷受容チャネルの活性化

Activation of transient receptor potential channel A1 by sesquiterpene, β-eudesmol.

○小原　一朗、北尾 紗代子、岡田 紘幸、高橋 千佳、眞鍋 簡利、大内 潤[1]、佐々木 克敏[1]、
形山　幹生
（キリンホールディングス株式会社、[1]協和発酵キリン株式会社）

○Kazuaki Ohara, Sayoko Kitao, Hiroyuki Okada, Chika Takahashi, Fumitoshi Manabe, Jun Ouchi[1], Katsutoshi Sasaki[1], Mikio Katayama (Kirin Holdings Co., Ltd., [1]Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.)

【目的】ビール醸造に用いるホップの中には、官能評価において冷涼感あるいはスパイシー感と表現されるような香味を呈する品種（ヘルスブルッカー種）が知られており、様々なビール系飲料の香味設計において重要な役割を果たしてきた。本研究では、この特徴をもたらす化合物やメカニズムの詳細を明らかにし、安定的な香味構築にむけた基礎知見を得ることを目的とした。
【方法】TRPA1チャネルは冷涼感受容に関与する分子として報告され、１７度以下の低温で活性化されることが明らかにされている。また、ワサビに含まれるアリルイソチオシアネートやシナモンの主成分であるシンナムアルデヒドによって引き起こされるスパイシーな感覚の受容に対しても、関与することが明らかにされている。本研究では、ホップ精油の主要構成成分であるテルペン類を対象とし、TRPA1を一過的に発現させた動物細胞を用いた細胞内カルシウム濃度測定、さらにはアフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理試験によりアゴニスト活性を測定した。
【結果】ヘルスブルッカー種ホップに特徴的に多く含まれるセスキテルペンの一種であるβ-ユーデスモールが、冷涼感やスパイシー感の受容に関与するTRPA1を活性化することを明らかにした。このβ-ユーデスモールは、ホップ以外にユーカリなどに含まれる成分として知られ、以前から抗炎症作用、抗ウイルス作用が報告されている化合物である。今回、β-ユーデスモールの新たな機能として、温度感受性TRPチャネルの活性化に関与することを初めて明らかにした。

TRPchannel, Hop, β-eudesmol

講演番号：3C29p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎29会場

マウス味細胞における酸味物質およびATPの受容機構の解析

Analysis of the perception mechanism of sour substance and ATP in mouse taste cells

○北田 亮、松村 成暢、呉 性姫、林 由佳子（京大院・農）
○Ryo Kitada, Shigenobu Matsumura, Seong-Hee Oh, Yukako Hayashi (Grad. Sch. Kyoto Univ)

【目的】
味細胞はその形態や機能によってⅠ～Ⅲ型の3種類に分類される。Ⅰ型細胞は支持細胞であり、味の受容には関与しないと考えられている。Ⅱ型細胞は甘味・うま味・苦味を、Ⅲ型細胞は酸味を受容すると言われている。味細胞で受容されたこれらの味質は次に味神経に伝達されるが、味神経とシナプスを形成しているのはⅢ型細胞のみであり、Ⅱ型細胞で受容された味質がどのようにして味神経に伝達されるのかは、まだはっきりとわかっていない。現在、味刺激を受けたⅡ型細胞がATPを放出し、このATPの情報をⅢ型細胞が受容して、味神経に味情報を伝達するという説が提唱されている。この説が正しいとすると、Ⅲ型細胞は「味受容細胞としての役割」と「Ⅱ型細胞から伝達された味情報を統合する役割」の２つの役割があるということになる。しかし、1種類の味細胞がこれら複数の役割を担っているのか、複数の味細胞がそれぞれ役割を分担しているのかということについてはわかっていない。そこで本研究では酸味物質であるHClとATPに着目し、それらの受容機構についての解析を行った。
【方法】
実験動物にはC57BL/6J系統マウスを使用した。味細胞のATPやHClに対する応答性およびそれらに応答した細胞の細胞型を調べるために、カルシウムイメージングおよび免疫細胞染色を行った。また、味蕾中のATP受容体および酸味受容体の分布を調べるために、免疫組織染色を行った。
【結果】
<u>HClとATPは異なる細胞で受容される</u>
カルシウムイメージングと免疫細胞染色の結果から、ATPはⅡ型細胞とⅢ型細胞の両方で、HClは主にⅢ型細胞で受容されるということが示唆された。しかし、ATPとHClは異なる味細胞で受容されることが多かった。また、HClに応答した味細胞はATP受容体の抗体でほとんど染色されなかった。これまで、ATPとHClはともにⅢ型細胞で受容されると考えられていたが、今回の結果から、ATPはⅡ型細胞でも受容されること、そしてⅢ型細胞の中にもATPを受容するものとHClを受容するものがあることが明らかになった。このことから、Ⅲ型細胞は味を受容する細胞とⅡ型細胞から伝達される味を統合する細胞に分類できる可能性が示唆された。
<u>味細胞における酸味受容体およびATP受容体の分布</u>
免疫組織染色の結果から、ATP受容体であるP2X2、P2X3は味神経、P2Y1はⅡ型細胞、P2Y2とP2Y4はⅡ型細胞とⅢ型細胞の両方に発現していた。また、酸味受容体であるPKD2L1は主にⅢ型細胞に発現していた。

taste cell, sour taste, ATP

講演番号：3C29p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ C校舎29会場

消化管内分泌細胞におけるカゼインによるCCK分泌機構の解析

CCK secretion mechanism induced by casein in entroendocrine cells

○後藤 健仁[1]、比良 徹[1]、中島 進吾[1]、原 博[1]（[1]北海道大学大学院農学院）
○Kento Gotou[1], Tohru Hira[1], Shingo Nakajima[1], Hiroshi Hara[1]([1]Grad Sch Agr, Hokkaido Univ)

【背景と目的】
コレシストキニン(CCK)は小腸上部に存在する消化管内分泌細胞 I Cellから分泌される消化管ホルモンである。その生理機能は主なものとして食欲抑制、胃排出遅延、膵外分泌促進などがある。近年、消化管内分泌細胞において様々な栄養素の受容体が発見されているが、食品たんぱく質の受容機構に関しては未だ不明な点が多い。本研究では、消化管内分泌細胞のモデルとしてマウス小腸由来CCK産生細胞株であるSTC-1細胞を用い、α-カゼインによるCCK分泌の機構について解析した。
【方法】
STC-1 細胞を 48 ウェルプレートに培養し、サブコンフルエントの状態で CCK 分泌試験を行った。培地を除去後、HEPES バッファーに溶解した試料を各ウェルに添加し、37℃、1 時間インキュベートした。上清を回収し、ELISA 法によって CCK の分泌量を測定した。各種阻害剤処理下で CCK 分泌試験を行い、細胞内情報伝達経路を解析した。
【結果】
STC-1 細胞において α-カゼイン刺激により濃度依存的な CCK 分泌が見られた。Transient Receptor Potential A1 (TRPA1)のリガンドであるアリルイソチオシアネート（AITC）による CCK 分泌が見られ、TRPA 阻害剤処理によって、α-カゼインおよび AITC に対する CCK 分泌は有意に減少した。また RT-PCR により TRPA1 の発現を確認した。BAPTA-AM による細胞内 Ca イオンのキレート、および PKA 阻害剤によって α-カゼイン応答性 CCK 分泌量は有意に減少した。これらの結果より α-カゼインによる CCK 分泌において TRPA1、および細胞内 Ca イオン、cAMP が関与することが示唆された。

Keyword1 CCK, Keyword2 Casein, Keyword3 TRPA1

講演番号：3C29p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ C校舎29会場

Title　Synergistic effect of lysophosphatidylcholine on NGF-induced survival signaling pathways through receptor TrkA in PC12 cells

○QIMUGE WUHAN, Katsuhiko KITAMOTO, Manabu ARIOKA
(Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【Object】The aim of this study is to elucidate the molecular mechanism in which Lysophosphatidylcholine (LPC) displays neurotrophin-like activity, and to develop a new therapeutic method for combating neurodegenerative diseases.

【Method and Result】We have demonstrated that LPC displays neurotrophin-like activity in PC12 and cerebellar granule neurons. In this study, we further examined the effect of LPC on nerve growth factor (NGF)-induced signaling pathways in PC12 cells. LPC, at the physiological concentration (1 μM), significantly increased NGF-induced MAPK (Fig. 2) and Akt phosphorylation (Fig. 3). Results from quantitative RT-PCR indicated that LPC up regulates the expression of immediate early genes, c-*fos* and *NGF-IA* triggered by NGF. LPC also enhanced the phosphorylation of NGF-induced MEK and TrkA proteins (Fig. 3), which are located upstream of MAPK. However, LPC did not affect epidermal growth factor (EGF)- (Fig. 2) and fibroblast growth factor-induced MAPK phosphorylation, as well as insulin-like growth factor-1-induced Akt phosphorylation. Furthermore, LPC did not affact EGF receptor (EGFR) phosphorylation induced by EGF (Fig. 4). Collectively, these findings indicate that LPC specifically enhances NGF-induced MAPK and Akt signaling pathways by enhancing the phosphorylation of its receptor TrkA in PC 12 cells (Fig. 1).

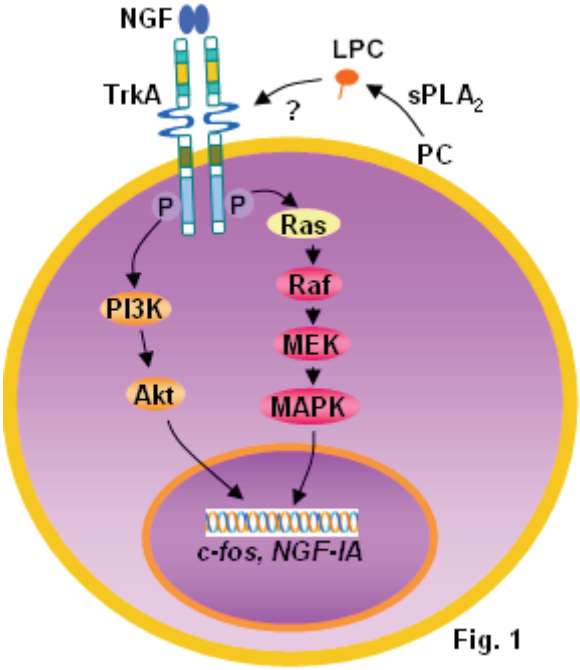
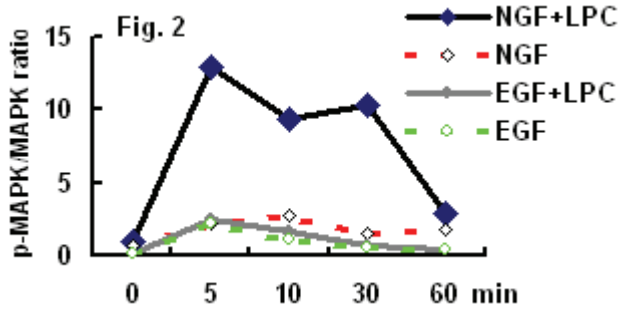


Fig. 1



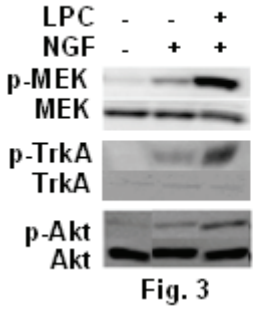


Fig. 3

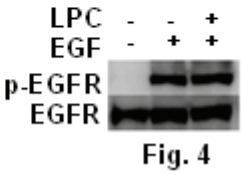


Fig. 4

Lysophosphatidylcholine, Nerve growth factor, TrkA

講演番号:3C29p07
講演日時、会場:3月24日15:05～ C校舎29会場

ヒト毛乳頭細胞におけるアーユルヴェーダハーブの生理作用

Effects of ayurvedic herbs on human dermal papilla cells

○山口 葉子、Mohammad N Hossain、三木 健輔、山下 律郎[1]、藤井 道彦、鮎沢 大(横浜市大・生命ナノシステム、[1](株)SLH BCLカンパニー)

○Yoko Yamaguchi, Mohammad N Hossain, Kensuke Miki, Ritsuo Yamashita[1], Michihiko Fujii, Dai Ayusawa (Yokohama City University, [1]SLH BCL COMPANY)

【目的】男性の薄毛の原因は、様々な要因が絡み合っている。これまでに、男性ホルモンであるテストステロンを5αリダクターゼ(5αR)がジヒドロテストステロンに変換し、このジヒドロテストステロンが男性の脱毛を引き起こす原因になることが報告されている。また、毛乳頭細胞から産生されたFGF-7が毛母細胞に作用することで毛母細胞の分裂を刺激し、毛を成長させることが分かっている。そこで本研究では、インドの伝承医学であり、世界最大の植物利用学であるアーユルヴェーダに着目し、毛乳頭細胞における5αRとFGF-7の発現量を変化させるハーブの探索を行った。

【方法】バングラデシュより輸入したハーブから抽出液を作製し、50%EtOHをコントロールとして数種類の濃度のハーブ抽出液を毛乳頭細胞にそれぞれ添加した。培養後、毛乳頭細胞のRNAを抽出し、RT-PCRで5αRとFGF-7の発現量を比較した。

【結果】ハーブ番号B31が5αR2型の発現量を減少させた。FGF-7については現在検討中である。

5alpha-reductase, dermal papilla cell, herb

講演番号：3C29p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎29会場

アーユルヴェーダハーブによるヒト線維芽細胞の増殖効果

Proliferative effect of human fibroblasts by ayurvedic herbs

○三木　健輔、三田　充真、藤井　道彦、Mohammad N Hossain、山下　律郎[1]、鮎沢　大（横浜市大・生命ナノシステム、[1]（株）ＳＬＨ　ＢＣＬカンパニー）

○ Kensuke Miki, Jyuma Mita, Michihiko Fujii, Mohammad Nazir Hossain, Ritsuo Yamashita, Dai Ayusawa (Yokohama City Univ., [1]SLH BCL COMPANY)

【目的】真皮線維芽細胞は、表皮の下部にあたる真皮に存在し、細胞外マトリックスを構築することで皮膚の多重構造を支え、皮膚のハリを保っている。老化した皮膚では、増殖遅延により細胞外マトリックスが減少するため、美肌再生には線維芽細胞の増殖が重要であると考えられる。我々はインド亜大陸５千年の歴史を持つ伝承医学アーユルヴェーダで用いられているハーブに着目した。アーユルヴェーダは世界最大の植物利用学であるが、その膨大な資料はすべて経験と感性の世界にあり、その生理学的検証はほとんど行われていない。

そこで我々は、アーユルヴェーダ植物を新規生理活性物質の宝庫と考え、バングラデシュの専門大学と連携し、有望だと判断されるハーブ約200種類を輸入し、顔面真皮由来の線維芽細胞（HDF細胞）の増殖作用について調べた。

【方法】それぞれのハーブを破砕し、50%エタノール抽出液を作製した。約200種類のハーブ抽出液をHDF細胞に様々な濃度で添加し、細胞の増殖を指標としたスクリーニングを行った。

【結果】いくつかのハーブ抽出液は、HDF細胞の増殖を顕著に亢進した。現在、最も有望なハーブ抽出液に関してHPLCを用い有効成分の同定と増殖促進機序の解明を試みている。

Ayurveda, herb, fibroblasts

講演番号：3C29p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎29会場

アマラキ（*Emblica officinalis*）の不死化ヒト表皮角化細胞に対する生理作用

Physiological actions of Amalaki (*Emblica officinalis*) in immortalized human keratinocytes

○杉本　量平、三木　健輔、山上　義巳、Mohammad Nazir Hossain、山下　律郎[1]、藤井　道彦、鮎沢　大（横浜市立大・生命ナノシステム、[1]（株）ＳＬＨ　ＢＣＬカンパニー）

○ Ryohei Sugimoto, Kensuke Miki, Yoshimi Yamakami, Mohammad Nazir Hossain, Ritsuo Yamashita, Michihiko Fujii, Dai Ayusawa (Yokohama City Univ., [1]SLH BCL COMPANY)

【目的】古今東西、人は、生活の質を高めるために日々、若々しくいたいと望んできた。美肌は、その重要な要素の１つである。我々は、ヒト表皮角化細胞を用いて、肌の健康維持のために有用なハーブを見出すため、増殖効果を指標としてアーユルヴェーダハーブのスクリーニングを行なった。それにより、アマラキ（*Emblica officinalis*）が見出された。その後の研究により、その抽出液は細胞を未分化の状態に維持する効果を持つことが示唆された。本研究では、不死化したヒト表皮角化細胞株（HaCaT）を用いて、アマラキ抽出液の細胞に対する分化抑制効果、増殖効果を調べることを目的として実験を行なった。

【方法】

試験1. アマラキ抽出液によるヒト表皮角化細胞の増殖試験

HaCaT細胞に様々な希釈率のアマラキ抽出液を加え、2週間程度培養し、増殖促進効果を観察した。

試験2. アムラ抽出液の細胞分化抑制作用の検証試験(RT-PCR)

Ca^{2+}を用いてHaCaT細胞を分化誘導した。Ca^{2+}添加時に、アムラ抽出液も共に添加し、顕微鏡にて細胞の形態を観察した。また、RT-PCRを行い、未分化マーカーおよび分化マーカーについて調べた。

【結果】

アマラキ抽出液はHaCaT細胞において増殖促進効果を示した。分化抑制作用については現在検討中である。

stem cells, keratinocytes, *Emblica officinalis*

講演番号：3C29p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎29会場

Gタンパク質γサブユニットGNG11の細胞老化における役割

The role of G protein gamma subunit GNG11 in cellular senescence

○工藤　生，伊藤　陽平，古賀　慎太郎，Mohammad N Hossain，三木　健輔，藤井　道彦，鮎沢　大　（横浜市大・生命ナノシステム）

○Ikuru Kudo，Yohei Ito，Shintaro Koga，Mohammad N Hossain，Kensuke Miki，Michihiko Fujii，Dai Ayusawa（Yokohama city Univ.）

ヒト細胞は慢性的なダメージの蓄積により老化し、MAPK の活性化や特異的遺伝子の誘導が起こる。我々はマクロアレイ解析により細胞老化応答遺伝子をスクリーニングし、GNG11 に着目した。GNG11 の発現は細胞が老化する際に転写レベルで顕著に誘導される。GNG11 は三量体 G タンパク質のγサブユニットファミリーの 13 成分のうちの 1 つであり、脳以外の全ての組織で発現していることが分かっているが、その機能は明らかになっていない。最近、我々は GNG11 の過剰発現がヒト正常線維芽細胞（TIG-7）を老化誘導することを見出した。この時、ERK1/2 の活性化が確認された。また GNG11 の過剰発現は、ある種の不死化細胞を特異的に老化誘導した。さらに GNG11 は、過酸化水素により迅速に発現誘導されるため、酸化ストレス応答にも関与していることが示唆されている。我々は GNG11 の機能を探るために、GNG11 を認識する抗体、および RNAi 法を用いたノックダウンベクターを作製した。これらを用いて GNG11 の細胞老化・不死化における役割を調べたので、その結果について報告する。

GNG11, senescence, MAPK

講演番号：3C29p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ C校舎29会場

高脂肪食がアルツハイマー病モデルマウスの記憶形成に与える影響

The effect of High Fat Diet on memory formation of Alzheimer’s Disease model mouse

○田村　南、Bruno Herculano 、大庭　彩香、久恒　辰博（東大院・新領域・先端生命）
○ Minami Tamura, Bruno Herculano, Ayaka Ohba, Tatsuhiro Hisatsune (Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

【目的】糖尿病はアルツハイマー病(AD)の危険因子の１つであり、発症のリスクを倍増させる。当研究室では、アルツハイマー病モデルマウスに高脂肪食(HFD)を給餌することで、肥満や脂質異常症、ひいては糖尿病のような危険因子を再現した、AD早期発症の病態モデルの作製を試みてきた。このモデルにおいて行動実験で記憶障害が観察されており、その原因として酸化ストレスが考えられたため、これまでに抗酸化作用を有する食品成分として知られている鶏肉に含まれるカルノシンをモデルマウスに投与し記憶能力が改善することを報告してきた。そこで本研究では、緑茶に含まれるカテキンを投与し、抗酸化物質がHFD給餌モデルマウスの記憶形成に与える影響を解析した。
【方法】4ヶ月齢のAPPswe/PS1dE9 ADモデルトランスジェニックマウスに、2ヶ月間HFDを給餌しADマウスで観察される認知機能障害の発症を早めた。HFD給餌開始2週間後から並行してカテキンの投与を始め、HFD給餌期間終了後、恐怖条件付け課題を用いて記憶能力を評価した。
【結果】HFD給餌を行ったトランスジェニックマウスにおいて、通常食を給餌した群と比較して有意な記憶障害が観察された。HFD給餌と併せてカテキンを投与した群では、通常食群と同程度の記憶能力が認められ、記憶の低下が改善されることが分かった。現在は、新生ニューロンや酸化ストレスマーカーなどの免疫染色を行い、研究を進めている。

Alzheimer’s Disease, High Fat Diet, antioxidant

講演番号：3C29p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ C校舎29会場

タイトル　脳の加齢変化を評価するMRI計測を用いた網羅的画像解析

Title　Comprehensive image analysis using the MRI measurement which evaluates a brain aging change.

○大庭彩香、阿部欣史、陳揚、左達秀敏[1]、仁木佳文[1]、時光一郎[1]、久恒辰博（東大院・新領域・先端生命、花王株式会社・ヒューマンヘルスケア研究センター[1]）

○Ayaka Ohba, Yoshifumi Abe, Yo Chin, Hidetoshi Sadachi[1], Yoshifumi Niki[1], Ichiro Tokimitsu[1], Tatsuhiro Hisatsune (Dept. Integrated Biosciences, Univ. of Tokyo, Human Health Care, Kao Corporation[1])

【目的】動物モデルを用いた研究により、運動や栄養成分摂取などの生活習慣の改善が海馬の構造に変化をもたらし、認知機能を改善することが明らかとなってきた。これらの動物における研究の成果をヒトの健康維持に活かしていくためには、非侵襲的な画像診断装置であるMRI「Magnetic Resonance Imaging」を用いた研究が有効である。本研究では、生活習慣改善による脳機能への影響を評価する画像解析を行うために適したMRI計測方法と画像解析方法の確立を目的とした。

【方法】研究対象は健常男性ボランティア10名(20～30代 5名、50代 5名)である。MR装置はSiemens社製MAGNETOM Verio 3 Tを用いた。本研究では、定常状態の脳神経回路の活動をBOLD信号により網羅的にとらえるrs-fMRI「resting state functional MRI」、脳組織の構造変化をとらえるsMRI「Structural MRI」など複数の方法を用いて撮像を行った。その結果をSPM8とSPM-Extension tool box-RESTを用いて解析した。

【結果】rs-fMRIを用いて記憶を司る海馬と各脳領域の結びつきを解析したところ、20～30代の健常男性群と50代の健常男性群間で差がみられた。20～30代の健常男性群では海馬と前部帯状回の結びつきが顕著であり、小脳や反対側の海馬を含め広域に結びつきがみられた。50代の健常男性群では、視覚野・感覚野との結びつきが顕著となった。本研究により、rs-fMRIを用いて20～30代と50代健常男性間で海馬と脳領域の結びつきの違いが今回初めて明らかになった。今後の展望としては、fMRIを用いて運動や栄養成分の摂取などの生活習慣の改善による脳機能への影響を評価する画像解析を行っていきたいと考えている。

aging , hippocampus, MRI

講演番号：3C29p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎29会場

イメージングサイトメーターを用いた細胞老化プロセスの定量化解析

Quantitative Evaluation of Cellular Senescence Phenotypes by Using an Imaging Cytometer

○黒田 真衣、鵜殿 美弥子[1]、片倉 喜範[1, 2]（九大院シス生・シス生、[1]九大院生資環・遺資工、[2]九大院農院・生機科）

○ Mai KURODA, Miyako UDONO[1], Yoshinori KATAKURA[2] (Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Agri., Kyushu Univ.)

【目的】本研究室では、細胞老化制御の分子基盤に関する研究を行っている。本研究では、新たに導入した全自動細胞機能解析装置（イメージングサイトメーター：IN Cell Analyzer 1000, GE Healthcare）を用いて、細胞老化表現型を定量的に評価するシステムを構築することを目的として研究を行った。

【方法】まずはヒト正常線維芽細胞（TIG-1）をモデル細胞として用い、分裂老化に伴う細胞表現型の変化をIN Cell Analyzer 1000を用いて追跡した。細胞老化の誘導は、細胞老化マーカーとして知られる老化関連β-ガラクトシダーゼ（SA-β-Gal）活性により評価した。この際、β-ガラクトシダーゼの蛍光基質としては、ImaGene Green C_{12} FDG（Invitrogen）を用いた。またそれ以外の細胞老化マーカーとしては、リン酸化MAPキナーゼp38、CDKインヒビターp21及びp16を採用し、その活性・発現量を免疫染色法により定量した。次にさらなるモデルケースとして、ヒト表皮ケラチノサイトに誘導される皮膚老化の定量的な評価を試みた。ヒト表皮ケラチノサイト由来HaCaT細胞を用い、UVクロスリンカー（フナコシ）を用いて紫外線照射を行い、それに伴い誘導される皮膚老化の定量的な評価を行った。

【結果】細胞老化表現型をIN Cell Analyzer 1000を用い評価することで、老化したTIG-1細胞における細胞及び核の大きさの増大、SA-β-Gal活性の増強を定量的に明らかにすることができた。さらに、リン酸化p38、p21及びp16が老化細胞において増強されていることを明らかにすることができた。以上の結果から、IN Cell Analyzer 1000が接着細胞における細胞老化のような表現型の変化を定量的に評価するために強力なツールになり得ることを明らかにすることができた。さらに、HaCaT細胞に対してUVB（10 mJ/cm^2）を2回照射することで、細胞及び核の大きさの増大、SA-β-Gal活性の増強などが観察され、これら細胞老化表現型をもとにHaCaT細胞に対する皮膚老化の誘導を定量的に評価することができた。以上の結果から、IN Cell Analyzer 1000は、線維芽細胞・上皮細胞をはじめとする接着細胞の表現型を定量的に評価する際に強力なツールになり得ることを明らかにすることができた。

imaging cytometer, senescence, senescence-associated β-galactosidase

講演番号：3C29p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎29会場

バルプロ酸のヒストン脱アセチル化酵素阻害活性を介したオリゴデンドロサイト前駆細胞系への老化作用

Valproic acid induces cellular senescence in oligodendrocyte precursor cell line via Hdac inhibitory activity

丸橋　拓人、○長井　薫（山梨大院・医工総合）
Takuto Marubashi, ○Kaoru Nagai (Univ. Yamanashi)

【目的】抗てんかん薬として用いられているバルプロ酸は、エピジェネティクス調節分子の一つであるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤としても知られている。バルプロ酸の胎生期における曝露が自閉症の原因となることが報告されているが、その発症に対する作用機序は明らかにされていない。一方、自閉症患者脳の解剖学的な特徴として、発達期における白質発達過程の異常が知られている。自閉症患者は、生後約5年間は白質が早く成長し、その後成長速度が低下することで、6年目以降は正常よりも小さい傾向を示す。この、発達期における成長の低下が白質を構成する細胞の老化による継続的な増殖能の低下によるという仮説を立てた。白質を構成する主な細胞は、オリゴデンドロサイトおよび神経細胞の軸索であり、白質の発達にはオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖が重要であることが知られている。

本研究の目的は、バルプロ酸のオリゴデンドロサイト前駆細胞に対する作用を解析することで、バルプロ酸が白質発達異常の原因となる可能性について明らかにすることである。

【方法】オリゴデンドロサイト前駆細胞系であるCG4-16細胞を用い、バルプロ酸で一定期間処理後の細胞増殖能や分化能への影響について細胞生物学的に解析を行った。細胞増殖能については、バルプロ酸処理を行った細胞をバルプロ酸非存在下で培養し、経時的に細胞数の増加を定量することにより行った。細胞老化については、老化関連β-ガラクトシダーゼ活性化細胞数や老化様形態変化について解析を行った。

【結果】バルプロ酸で処理を行ったCG4-16細胞は、3日以上の前処理において不可逆的な増殖能の低下が見られた。また、老化マーカーである老化関連β-ガラクトシダーゼ陽性細胞の有意な増加が認められた。細胞形態については、処理後6日間までは、肥大・扁平化という老化細胞に特徴的な変化が認められたが、それ以上の処理では、分化オリゴデンドロサイト様の形態変化が見られた。HDAC阻害活性を示さない類縁化合物であるバルプロミドについてはこれらの作用は認められなかったことから、この作用はHDAC阻害活性依存的であると考えられた。また、本結果は発達初期における白質増大傾向と、その後の成長速度の低下という患者脳で見られる症状と一致する結果だと考えられた。

valproic acid, oligodendrocyte progenitor cell, cellular senescence

講演番号：3C29p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎29会場

ブラジル産プロポリスによるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)活性制御と神経保護作用

Neuroprotective effect of Brazilian propolis extracts via regulating activities of HDAC families

○石合 忍、田原 渉[1]、山本 倫大[1]、長井 薫（山梨大院・医工総合、[1]日本自然食品(有)）
○Shinobu Ishiai, Wataru Tahara[1], Rindai Yamamoto[1], Kaoru Nagai（Univ. Yamanashi, [1]Nihon Natural Foods）

【目的】HDAC が関与するエピジェネティクス機構は、DNA やヒストンの修飾による遺伝子配列に依存しない遺伝子発現調節機構であり、生体内において重要な役割を担っている。発現調節にはヒストンのアセチル化・脱アセチル化が重要な役割を果たしている。近年、この脱アセチル化に働く HDAC の活性制御による細胞機能への影響が多数報告されており、ガンや認知症等の治療薬の標的として注目されている。認知症に関しては、これまでにクラス I，II HDAC の阻害作用、およびクラス III HDAC である SIRT1 の活性化による予防・治療効果に関して報告されている。天然物由来のこれら酵素の活性制御分子としては、低級脂肪酸類や一部のポリフェノール類等が報告されている。プロポリスは、ミツバチが木や植物の新芽や樹脂から作る膠状物質であり、これまでに成分の同定に関する研究や多様な生理活性が報告されている。また、産地によりその含有成分や生理作用が異なることも知られている。

本研究の目的は、ブラジル産プロポリスによる HDAC 活性制御作用の有無を明らかにし、認知症予防食品としての可能性を検討することである。

【方法】ブラジル産プロポリス原塊から 80%エタノールによる成分抽出を行った。その抽出成分について、クラス I，II HDAC の阻害作用および SIRT1 活性化作用に注目し、蛍光基質ペプチドを用いた活性測定法によりそれぞれの作用の有無について解析を行った。また、神経系培養細胞に対する保護効果に関しても解析を行った。細胞保護効果は、ストレスによる細胞死に対する抑制効果を細胞生存率の定量解析を行うことにより評価した。

【結果】ブラジル産プロポリス抽出成分には、クラス I，II HDAC の活性阻害作用および SIRT1 活性化作用両方の作用を有する物質が含まれることを明らかにした。また、神経系培養細胞に対する保護効果を有することも見出した。本結果は、ブラジル産プロポリスが HDAC 活性制御を介した認知症予防などの健康食品として利用できる可能性を示唆している。

propolis, HDAC, neuroprotection

講演番号：3C29p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎29会場

準致死量の界面活性剤によるヒト正常細胞の未成熟老化の誘導機構

Molecular Basis for Premature Senescence Induced by Surfactants in Normal Human Cells

○山上 義巳、藤井 道彦、鮎沢 大(横浜市大・バイオ科学)
○Yoshimi Yamakami, Michihiko Fujii, Dai Ayusawa (Yokohamashidai)

【目的】準致死量の界面活性剤はヒト正常細胞において未成熟老化を誘導する。その作用機構を解明するために研究を行った。
【方法】ヒトの正常細胞等を用い、界面活性剤が誘導する未成熟老化において種々の阻害剤がどのような影響を及ぼすかを調べた。
【結果】NP-40のような合成中性界面活性剤を含む準致死量の界面活性剤はヒト正常細胞において未成熟老化を非常に効率的に誘導する。我々は弱い老化誘導剤であるオレイン酸が界面活性剤の効果を抑制することを見出した。フルオレセインで蛍光標識したオレイン酸は急速に細胞表面に結合し、そしてこの結合は明瞭に他の界面活性剤によりブロックされた。このことは界面活性剤及びオレイン酸が同じ細胞表面リセプタに結合することを示唆している。次に我々はこれらの現象において様々なリン酸化酵素阻害剤の効果を検証した。p38の阻害剤はNP-40により誘導される老化を抑制したが、ERK1/2やJNKの阻害剤を含む他の阻害剤は何の効果も示さなかった。最後に我々はこれらの現象において蛋白合成阻害剤シクロヘキシミドの効果を検証した。シクロヘキシミドは増殖停止及び界面活性剤による形態変化を抑制し、界面活性剤の存在下での継続的な増殖をもたらした。これらの結果は界面活性剤が特異的な細胞表面リセプタを標的とし、p38シグナル経路を活性化し、不均衡増殖を誘導していることを示唆している。

surfactant, cellular senescence, oleic acid

講演番号：3A30a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ A校舎30会場

イネの病害抵抗性を制御する転写因子OsWRKY53の機能発現機構の解析

Molecular mechanisms for disease resistance in rice that is regulated by the transcription activator OsWRKY53

○小川 哲史[1]、清水 崇史[1]、宮本 皓司[1,2]、西澤 洋子[3]、南 栄一[3]、増田 優花[1]、中条 哲也[1]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1]、山根 久和[1]（[1]東大・生物工学セ、[2]学振DC1、[3]農生資研）

○Satoshi Ogawa[1], Takafumi Shimizu[1], Koji Miyamoto[1,2], Yoko Nishizawa[3], Eiichi Minami[3], Yuka Masuda[1], Tetsuya Chujo[1], Kazunori Okada[1], Hideaki Nojiri[1], Hisakazu Yamane[1] ([1]Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [2]JSPS, [3]NIAS)

植物が病原菌に感染した際、病原菌細胞表層由来のキチンオリゴマー等がエリシターとなって植物細胞表面の受容体と結合する。それが引き金となって様々な二次シグナル物質の生産を含むシグナル伝達がおこり、それによりエリシター応答性転写因子の発現が誘導される。発現した転写因子は標的遺伝子の発現を誘導し、最終的に抗菌性低分子化合物や抗菌性タンパク質の生産等様々な病害抵抗性反応が誘導される。OsWRKY53 はキチンエリシターにより発現が誘導される転写活性化因子であり、これをイネ体内で過剰発現させることでイネにいもち病菌(*Magnaporthe oryzae*)に対する抵抗性を付与することができることから、イネの病害抵抗性を正に制御する重要な分子スイッチの 1 つであると考えられている。また、最近、他の植物の OsWRKY53 ホモログが MAP キナーゼカスケードによりリン酸化されることで活性化されるという知見をもとに、OsWRKY53 についてもリン酸化の関与について検討を行ったところ、OsWRKY53 はキチンエリシターにより活性化される MAP キナーゼカスケードにより N 末端の予想リン酸化サイトのセリンがリン酸化されること、OsWRKY53 の N 末端の予想リン酸化サイトのセリン 6 箇所を全てアスパラギン酸に置換した擬似リン酸化 OsWRKY53 (OsWRKY53Asp) の転写活性化能は OsWRKY53 のそれより高いことが示された。そこで本発表では、*OsWRKY53* 過剰発現株および *OsWRKY53Asp* 過剰発現株を作製し、いもち病菌に対する抵抗性を調べた。その結果、*OsWRKY53* 過剰発現株においてもベクターコントロール株と比較していもち病菌に対する抵抗性が上昇する傾向は見られたが、*OsWRKY53Asp* 過剰発現株においてより強い抵抗性が見られた。このことから、OsWRKY53 のリン酸化が病害抵抗性の発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。現在、OsWRKY53 の病害抵抗性発現機構の解明に向けてさらに知見を得るため、ChIP-Seq 等による標的遺伝子の同定および yeast two-hybrid screening による OsWRKY53 と相互作用するタンパク質の探索を試みている。

Keywords: rice, WRKY transcription factor, pathogen-resistance

講演番号：3A30a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ A校舎30会場

イネのジテルペン型ファイトアレキシン生合成を制御する新規転写因子の同定

Identification of a New Transcription Factor Involved in the Regulation of Biosynthesis of Diterpenoid Phytoalexins in Rice

中川 仁[1]・田中 惇訓[1,2]・岡田 憲典[3]・前田 哲[1]・鎌倉 高志[2]・山根 久和[3]、○森 昌樹[1]
([1]農業生物資源研、[2]東理大院・理工、[3]東大・生物生産工学研究センター)
Hitoshi Nakagawa[1], Atsunori Tanaka[1,2], Kazunori Okada[3], Satoru Maeda[1], Takashi Kamakura[2], Hisakazu Yamane[3], ○Masaki Mori[1] ([1]NIAS, [2]Graduate School of Science and Technology, Tokyo Univ. of Science, [3]Biotechnology Research Center, The Univ. of Tokyo)

【目的】我々はこれまでイネのブラシノステロイド生合成変異体*brd1*を用いて、ブラシノライド添加により発現誘導される遺伝子について解析を行ってきた。その過程で見出した転写因子*BU2*遺伝子の過剰発現イネを作製すると、生育後期にラミナジョイントの屈曲と擬似病斑の出現が認められ、一部のファイトアレキシン生合成遺伝子の発現増大が見いだされた。また、*BU2*遺伝子の発現の組織特異性をWTイネで調べたところ、葉、根、穂で発現していたが、出穂前の幼穂では発現していなかった。本年度は*BU2*遺伝子のジテルペン型ファイトアレキシン生合成における役割を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】*BU2*過剰発現イネの擬似病斑の出現している葉について、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現レベルを詳細に調べた。すると、*OsCPS4, OsKSL4*等のモミラクトン生合成に関与する遺伝子群、及び*OsCPS2, OsKSL7*等のファイトカサン生合成に関与する遺伝子群の発現レベルが顕著に増大していた。さらに*BU2*過剰発現イネの葉及びモミ（頴）についてファイトアレキシン蓄積量を定量したところ、モミラクトンA,B及びファイトカサンA-Eは全てWTに比べ増加していた。また擬似病斑が出現している植物体の方が、出現してない植物体よりも葉やモミでの蓄積量が高い傾向が認められた。*BU2*過剰発現イネでは、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成に関わる既知の転写因子*OsTGAP1*の発現レベルは増大していなかったので、BU2はOsTGAP1を介さずにジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現を制御すると考えられた。
次に*BU2*の発現を抑制するイネをRNAi法により作製し、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現を調べたところ、上記のモミラクトン生合成に関与する遺伝子群、及びファイトカサン生合成に関与する遺伝子群の葉における発現レベルが顕著に減少していた。さらに、ジテルペン型ファイトアレキシンはいもち病菌感染により蓄積が増大することが知られているので、いもち病菌に感染したWT葉における*BU2*の発現を調べた。すると感染2日後、4日後において*BU2*の発現レベルは増大していた。以上よりBU2は、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の組織特異的な発現に加えて、いもち病誘導的な発現も制御している可能性が示唆された。

phytoalexin, rice, transcription factor

講演番号：3A30a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ A校舎30会場

イネのファイトアレキシン生合成酵素遺伝子クラスターに存在するP450遺伝子の機能解析

Characterization of P450 genes in diterpenoid phytoalexins biosynthesis gene cluster in rice chromosome 2

○山崎 浩平[1], 蓑田 裕美[1], 岡田 敦[1], 岡田 憲典[1], 宮崎 翔[2], 川出 洋[2], 渋谷 直人[3], 古賀 仁一郎[4], 矢島 新[5], 薮田 五郎[5], 豊増 知伸[6], 野尻 秀昭[1], 山根 久和[1]（[1]東大生物工学セ, [2]東農工大・連合農, [3]明治大農・生命科、[4]明治製菓, [5]東農大応生科・醸造, [6]山形大農・生物資源）

○Kohei Yamazaki[1], Hiromi Minoda[1], Atsushi Okada[1], Kazunori Okada[1], Sho Miyazaki[2], Hiroshi Kawaide[2], Naoto Shibuya[3], Jinichiro Koga[4], Arata Yajima[5], Goro Yabuta[5], Tomonobu Toyomasu[6], Hideaki Nojiri[1], Hiasakazu Yamane[1] ([1]Biotechnology Research center, The Univ. of Tokyo, [2]United Grad. School of Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric & Technol., [3]Dept. of Life Sci., Meiji Univ., [4]Biosci. laboratories, Meiji Seika Kaisha, Ltd, [5]Dept. of Fermentation Sci., Tokyo Univ. of Agric., [6]Dept. of Bioresource Engineering, Yamagata Univ.)

イネにおいてこれまで単離・同定されているファイトアレキシンの内、14種は環状ジテルペン型(momilactones、phytocassanesなど)で、これらは、共通の前駆体であるゲラニルゲラニル二リン酸からジテルペン環化酵素による二段階の環化と、それに続く数段階の酸化反応を経て生合成される。我々は、momilactonesの生合成に関与する2種のジテルペン環化酵素遺伝子 (*OsCPS4, OsKSL4*)、2種のP450遺伝子(*CYP99A2, A3*)およびdehydrogenase遺伝子がイネ4番染色体上でクラスターを構成し、それらが病原菌感染後同調的に発現誘導されていることを明らかにした。一方、イネ2番染色体上では、phytocassanes生合成に関与する2種のジテルペン環化酵素(*OsCPS2, OsKSL7*)と、その近傍に6つのP450遺伝子(*CYP71Z6, Z7, CYP76M5, M6, M7, M8*)が存在し、phytocassanes生合成酵素遺伝子クラスターを形成していることが示されている。我々はこれまで、RNAi法により作製したノックダウン変異体の解析によって、CYP71Z7がphytocassanesの2位水酸化に、CYP76M8がphytocassanesの1位水酸化に関与している可能性を報告してきたが、今回は新たに*CYP71Z7* T-DNAタグラインを用いた解析の結果を報告する。

これまでに解析された*CYP71Z7*のRNAi株では、2位oxygenated phytocassanesであるphytocassanes A, B, Dの蓄積が減少し、一方でphytocassanes C, Eの蓄積が増加していた。しかし、*CYP71Z7*と相同性が高く、発現量の低い*CYP71Z6*の発現抑制の有無とそれによる影響が不明であった。今回、*CYP71Z7*の発現が特異的に顕著に抑制されているT-DNAタグラインを解析したところ、これらの植物体においても、RNAi株と同様のphytocassanesの蓄積が観察された。さらに、GC-MSによる解析を行ったところ、新規phytocassanes生合成中間体と考えられる2-deoxyphytocassane Aが変異株特異的に蓄積することを発見した。また、T-DNAタグラインに対する*CYP71Z7*の相補により、2位oxygenated phytocassanesの蓄積が回復し、CYP71Z7がphytocasasnes2位水酸化酵素であることが、より強く示唆された。現在は、*in vitro*での機能解析に取り組んでおり、その結果も合わせて報告したい。

rice, phytoalexin, P450monooxygenase

講演番号：3A30a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ A校舎30会場

イネのジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子クラスターの発現制御におけるヒストン修飾の関与

Involvement of histone modification in the regulation of expression of a diterpenoid phytoalexin biosynthetic gene cluster in rice

○宮本　皓司[1,2]、岡田　憲典[1]、野尻　秀昭[1]、山根　久和[1]（[1]東大生物工学セ、[2]日本学術振興会特別研究員DC）

○Koji Miyamoto[1,2], Kazunori Okada[1], Hideaki Nojiri[1], Hisakazu Yamane[1]（[1]Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [2]JSPS Research Fellow）

植物は病原菌の感染を認識すると、ファイトアレキシンの生産を含む様々な抵抗性反応を示す。イネにおいては、ジテルペン型とフラボノイド型のファイトアレキシンが存在し、ジテルペン型ではモミラクトン類およびファイトカサン類が主要成分として知られている。ジテルペン型ファイトアレキシンは、メチルエリスリトールリン酸 (MEP)経路由来のゲラニルゲラニル２リン酸を共通の前駆体として、ジテルペン環化酵素による環化反応およびP450などによる酸化反応を経て生合成される。我々はこれまでにモミラクトン生合成酵素遺伝子が４番染色体上において、ファイトカサン生合成酵素遺伝子が２番染色体上において、それぞれ遺伝子クラスターを形成していることを見出している。さらに、キチンエリシター応答性bZIP型転写因子OsTGAP1がMEP経路遺伝子・モミラクトン生合成酵素遺伝子・ファイトカサン生合成酵素遺伝子の発現制御に関与することを報告した。しかし、最近我々が行ったChIP-seq解析の結果から、OsTGAP1はファイトアレキシン生合成酵素遺伝子クラスター中の一部の遺伝子の上流域にのみ結合していることが明らかになっており、OsTGAP1による発現制御機構の詳細は不明であった。さらに、OsTGAP1過剰発現株において、定常時ではファイトアレキシン生合成酵素遺伝子などの下流遺伝子の発現は微弱にしか誘導されず、キチンエリシター処理後に初めて顕著に発現が誘導されることから、OsTGAP1による下流遺伝子の転写の誘導には翻訳後修飾や相互作用タンパク質などの他の因子が関与している可能性が考えられた。

そこで、本発表においては、yeast two-hybrid法を用いて、OsTGAP1と相互作用するタンパク質を探索した。スクリーニングの結果から得られたpositive cloneのシークエンスを解析したところ、10個の候補遺伝子を得た。その中には、トウモロコシにおいてヒストン修飾に関与することが報告されているENT-domain containing proteinのホモログ遺伝子が含まれていた。まず、pull-down assayによりこの遺伝子産物とOsTGAP1との相互作用を確認した。さらに、ヒストン抗体を用いたChIP解析により、モミラクトン生合成酵素遺伝子*OsKSL4*の遺伝子領域および上流域のヒストン修飾を解析したところ、翻訳開始点付近の領域においてキチンエリシター処理により、ヒストンH3K9/14のアセチル化およびヒストンH3K4のトリメチル化が誘導されることが明らかになった。現在は、遺伝子クラスター中の他の遺伝子領域におけるヒストン修飾を解析するとともに、OsTGAP1の過剰発現がこれらの領域のヒストン修飾に与える影響を解析している。

rice, bZIP transcription factor, phytoalexin

講演番号：3A30a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ A校舎30会場

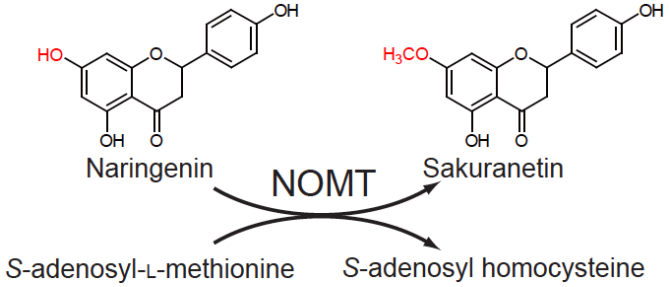
イネのサクラネチン合成酵素OsNOMTの単離とキャラクタリゼーション

Title Identification and characterization of rice sakuranetin synthase OsNOMT

○ 清水 崇史、林 鳳秋、長谷川 守文[1]、岡田 憲典、野尻 秀昭、山根 久和（東大生物工学セ、[1]茨大・農）

○Takafumi Shimizu, Fenqiu Lin, Morifumi Hasegawa[1], Kazunori Okada, Hideaki Nojiri, Hisakazu Yamane (Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [1]Faculty of agriculture, Ibaraki University)

サクラネチンは、イネの葉において UV 照射、いもち病菌接種、塩化銅やジャスモン酸の処理等により顕著に生産誘導されるイネの主要なファイトアレキシンの一つである。サクラネチンはナリンゲニンを前駆体とし、naringenin 7-*O*-methyltransferase (NOMT)により生合成される。この NOMT の活性はイネ葉においてサクラネチンの蓄積に先立って誘導されることや、いもち病菌に対する抗菌活性はナリンゲニンからサクラネチンへの変換で上昇することから、イネの病害抵抗性発現機構を理解する上で NOMT を単離しその発現制御機構を解明することは非常に重要であると考えられた。しかしサクラネチンがイネのファイトアレキシンとして同定されてから今日まで、イネの NOMT (OsNOMT)は長年にわたり未同定であった。以前の研究で、活性を指標に、野生型イネからの NOMT 精製が試みられたが、活性画分から得られた主要成分は caffeic acid *O*-methyltransferase (OsCOMT1)であった。これはイネ内生に多量に存在する OsCOMT1 が、微量にしか存在しない OsNOMT の精製を困難にしている可能性を示すものと考えられたので、本研究では *OsCOMT1* の変異株 *oscomt1* を用い OsNOMT の単離同定を試みた。UV 処理を行った *oscomt1* の葉約 200 g から粗酵素溶液を調製した後、硫安塩析、陰イオン交換、adenosine agarose によるアフィニティ精製を順次行うことで、NOMT の比活性を 400 倍に濃縮することができた。活性の濃縮率の高かったアフィニティ精製後に SDS-PAGE 上で約 40 kDa の位置に新たなバンドが見出されたため、このバンドを切り出し、MALDI-TOF/TOF 分析に供したところ、イネゲノム上にコードされる 2 種の *O*-methyltransferase (OMT1, 2)が見いだされた。これら 2 種の OMT を GST タグ付加型の組換え酵素として大腸菌で発現させたところ、OMT1 は NOMT 活性を示さなかったのに対し、OMT2 は強い NOMT 活性を示した。また、OMT2 はイネ葉に対するいもち接種や JA 処理により転写レベルで発現が誘導されることも示された。以上の結果から OMT2 が OsNOMT であることが示された。



rice, phytoalexin, *O*-methyltransferase

講演番号：3A30a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ A校舎30会場

Myc-LCOの化学酵素合成とミヤコグサ共生関連遺伝子の発現誘導活性

Chemoenzymatic synthesis of Myc-LCOs and their symbiosis-related gene-inducing activity in *Lotus japonicus*

○河原　千春，秋山　康紀[1]，林　英雄[1]（阪府大・生命環境，[1]阪府大院・生命環境）
○Chiharu Kawahara, Kohki Akiyama[1], Hideo Hayashi[1] (Osaka Prefecture Univ.)

【目的】アーバスキュラー菌根菌（arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌）と植物との共生は80%以上もの陸上植物に見られ，「地球上で最も普遍的な共生」と呼ばれる。AM 菌と植物はそれぞれが生産するシグナル物質により互いの存在を認識する。植物の根から分泌されるストリゴラクトンは AM 菌の宿主認識反応である菌糸分岐を誘導する。一方，AM 菌は Myc ファクター（Myc factor, MF）と呼ばれる共生シグナルを生産すると考えられてきたが，ながらくその活性本体は解明されなかった。2011 年初頭，フランスのグループが Nod ファクター（Nod factor, NF）に極めて似たリポキトオリゴ糖（mycorrhizal lipochitooligosaccharide, Myc-LCO）を MF として同定した。今回 Myc-LCO が実際に MF として機能しているのかどうかを検証するために，Myc-LCO およびそれらのアシル鎖改変誘導体を化学酵素法により合成し，ミヤコグサ共生関連遺伝子の発現誘導活性について調べたので報告する。

【方法および結果】*Rhizobium etli* および *Sinorhizobium meliloti* の菌体 DNA を鋳型として RTS 100 E. coli LinTempGenSet, His-tag キットを用いて，直鎖状鋳型 DNA を二段階の PCR により調製した後，無細胞タンパク質合成システム RTS 100 E. coli HY expression キットにより NodB (chitin deacetylase)および NodH (sulfotransferase)を C 末端 His タグ融合タンパクとしてそれぞれ合成した。キチン 4 糖の非還元末端の GlcNAc 残基を NodB により脱アセチル化することにより *N*-モノ脱アセチルキチン 4 糖を得た。これを DMT-MM [4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride]を縮合剤として種々の脂肪酸と反応させることにより非硫酸化 Myc-LCO を合成した。硫酸化 Myc-LCO は非硫酸化 Myc-LCO の還元末端側 GlcNAc 残基の 6 位水酸基を PAPS (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate)を硫酸基供与体として NodH により硫酸化することにより合成した。アシル鎖としてフランスのグループにより報告された Myc-LCO と同じ C16:0 と C18:1Δ9*Z* に加え，AM 菌に比較的多量に含まれる C16:1Δ11*Z*, C20:1Δ11*Z*, C20:4Δ5,8,11,14*Z*, C22:1Δ13*Z*, C24:1Δ15*Z* の 7 種のアシル基を有する非硫酸化・硫酸化 LCO 計 14 種を合成した。これら LCO について *Cbp1* プロモーター，*SbtS*, *NIN*, *NSP2* などミヤコグサ共生関連遺伝子の発現誘導活性を GUS レポーターアッセイや qRT-PCR により調べたところ，非硫酸化 LCO C16:0, C18:1Δ9*Z*, C16:1Δ11*Z*, C20:1Δ11*Z* が強い活性を示し，非硫酸化 LCO C22:1Δ13*Z*, C24:1Δ15*Z* およびすべての硫酸化 LCO には弱い活性しか見られなかった。強い活性が見られた非硫酸化 LCO C16:0, C18:1Δ9*Z*, C20:1Δ11*Z* をそれぞれ 100 nM 含む混合液で処理した NF 受容体変異体である *nfr1* では *SbtS*, *NIN*, *NSP2* の発現誘導は野生型に比べて大きく低下した。

arbuscular mycorrhizal fungi, lipochitooligosaccharide, symbiosis

講演番号：3A30a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ A校舎30会場

イネ根圏土壌でのヒ素代謝に関わる微生物の関与

Involvement of bacteria in arsenic metabolism in rice rhizosphere

○倉俣 正人、片岡 良太、馬場 浩司、石坂 真澄、山崎 健一、安部 匡、井倉 将人、高木 和広、平舘 俊太郎、石川 覚 （農環研）
○Masato Kuramata, Ryota Kataoka, Koji Baba, Masumi Ishizaka, Kenichi Yamazaki, Tadashi Abe, Masato Igura, Kazuhiro Takagi, Shuntaro Hiradate, Satoru Ishikawa (National Institute for Agro-Environmental Sciences)

【目的】　高ヒ素土壌で湛水栽培したイネの玄米には、メチル化されたヒ素の一種であるジメチルアルシン酸（DMA）が多く含まれる。しかし土壌溶液中の DMA 濃度は低く、土壌と玄米の DMA 濃度間には関連性が見られない。同様の現象は多数報告されているが、その原因は未だ不明である。近年、微生物からヒ素のメチル化酵素遺伝子が同定されたことから、土壌微生物によってヒ素がメチル化され、それをイネが直接吸収している可能性が考えられた。そこで、イネにおけるヒ素吸収経路の解明に向け、根圏微生物によるヒ素の代謝について研究を行った。
【方法】　初めにイネ根面におけるヒ素化学形態変化を確認するため、水耕栽培したイネ根部を用いて実験を行った。無機ヒ素を含む木村氏 B 液に 0.2 μm フィルタ滅菌処理と未処理の根部磨砕汁をそれぞれ添加後 1 週間、暗所で静置培養しヒ素の化学形態変化を確認した。次に高ヒ素濃度の土壌（8.0ppm）で湛水栽培したイネの根圏土壌と水耕栽培のイネ根面から平板希釈法により細菌の単離を行い、その中から DMA を生産する細菌の探索を行った。なお、菌の培養には R2 培地を用いた。ヒ素の化学形態分析では 4 種のヒ素標品［三価無機ヒ素，五価無機ヒ素，モノメチルアルソン酸，DMA］を用い HPLC-ICP-MS で分析した。
【結果】　未滅菌の根磨砕汁を添加した培養液では DMA の生成が認められたが、滅菌処理区では添加ヒ素の形態変化は見られなかった。一方、土壌および根面から分離した細菌からヒ素のメチル化に関与する菌株を選抜した。またその中には未知ヒ素を合成する菌株も存在し、その部分的な構造が明らかとなった。DMA を無機ヒ素に変える細菌の存在も確認されたことから、イネの根面や根圏土壌では様々な細菌によってヒ素の化学形態が変化している可能性があり、イネに吸収されるヒ素の化学形態には微生物の関与が示唆された。

講演番号：3A30a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ A校舎30会場

タバコ葉トライコームのカドミウム蓄積および排出に関与する遺伝子の探索

Genes for cadmium accumulation and exudation in tobacco leaf trichomes

○原田英美子[1,2]、金志娥[1]、Andreas J. Meyer[3,4]、Ruediger Hell[3]、Stephan Clemens[2,5]、崔龍義[1]（滋賀県大・環境科学、[1]江原大・山林資源、[2]ライブニッツ植物生化学研、[3]ハイデルベルク大、[4]ボン大、[5]バイロイト大）

○Emiko Harada[1,2], Ji-Ah Kim[1], Andreas J. Meyer[3,4], Ruediger Hell[3], Stephan Clemens[2,5], Yong-Eui Choi[1] (School of Environmental Science, University of Shiga Prefecture, [1]College of Forest and Environmental Sciences, Kangwon National University, [2]Leibniz Institute of Plant Biochemistry, [3]University of Heidelberg, [4]University of Bonn, [5]University of Bayreuth)

【目的】トライコームは葉、茎など地上部の器官の表皮細胞より形成される毛状突起である。我々は、カドミウム（Cd）処理したタバコ(*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi)葉のトライコームからCdが炭酸塩の形で排出されていることをすでに報告している（Isaure *et al.*, 2010)。本研究では、タバコ葉の重金属蓄積・排出機構を詳しく調べるため、タバコ葉のトライコームからESTライブラリを作成し、重金属耐性をはじめとするストレス応答に関連する遺伝子群の単離を試みた。
【方法】タバコを水耕栽培の系で生育させ、Cd処理および未処理の植物体を得た。液体窒素で凍らせた葉の表面を細い針金で掻きとることによりトライコームのみを集め、組織特異的なESTライブラリを作成した。得られた候補遺伝子の組織特異性およびCdに対する応答性ををRT-PCR法で調べた。細胞質のグルタチオン(GSH) をmonochlorobimaneで*in vivo*蛍光ラベルする手法を用い、トライコームにおけるチオールの分布を共焦点レーザー電子顕微鏡を用いて調べた。
【結果】トライコーム特異的なESTライブラリからは、光合成関連遺伝子とともに、pathogenesis-related (PR)タンパク質に属するmetallocarboxypeptidase inhibitor、Bet v 1類縁タンパク質、non-specific lipid transfer proteinをコードする遺伝子などストレス応答に関与する遺伝子が高いスコアで得られた。Cysteine-rich なPRタンパク質の多くはトライコーム特異的に発現しており、重金属キレーターとして機能している可能性が考えられた。Osmotin と thaumatin-like protein 遺伝子もトライコームで発現が強く、カドミウム処理で誘導されることがわかった。葉の表面に分泌されている抗菌活性タンパク質であるT-phylloplaninの類縁タンパク質をコードする遺伝子群も得られた。GSHはトライコーム頂部のTip Cellに表皮細胞の約3倍の濃度で蓄積していた。GSHはそれ自身が重金属耐性に関連するとともに、Cysteine-richタンパク質の酸化還元制御に寄与していると考えられる。GSH peroxidase 遺伝子がトライコームで強く発現していることも確認された。

これらの知見から、タバコ葉のトライコームは種々の環境ストレスに応答する機構を備えた器官であり、重金属解毒機構にイオウ代謝系が関連している可能性が示唆された。

References: Isaure *et al.*, (2010) *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74 5817-5834.; Harada et al., (2010) *Plant Cell Physiol* 51(10): 1627-1637.

glutathione, pathogenesis-related protein, trichome

講演番号：3A30a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ A校舎30会場

シロイヌナズナ細胞質型APX変異体の強光ストレス応答性

Analysis of a response to high-light stress in Arabidopsis cytosolic APX mutants

○大森 瑶子、岩間 勝久、丸田 隆典、澤 嘉弘、重岡 成[1]、石川孝博（島根大・生資科・生命工、[1]近畿大・農・バイオ）

○Yoko Omori, Katsuhisa Iwama, Takanori Maruta, Yoshihiro Sawa, Shigeru Shigeoka[1], Takahiro Ishikawa (Shimane Univ., [1]Kinki Univ.)

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）は、活性酸素種の発生部位となる植物細胞内コンパートメントに多数のアイソザイムが存在し、過酸化水素代謝の中心的役割を果たしている。これまでに我々は、APXアイソザイムの中でも細胞質型APXが細胞内レドックス調節に重要な役割を果たしていることを明らかにしている（Plant Physiol., 2011; PCP, 2004, 2005）。本研究では、強光ストレス応答時の細胞内レドックス状態と細胞応答におよぼす細胞質型APXの影響を明らかにすることを目的に、シロイヌナズナ細胞質型APX（APX1）過剰発現体（cAPX-OE）および破壊株（cAPX-KO）を用いて解析した。

APX1を過剰発現させたcAPX-OEラインおよびcAPX-KOの定常状態（明/暗=16時間/8時間、100 μmol m^{-2} s^{-1}）におけるAPX活性は、野生株に比較してそれぞれ約300-600％および約30％であった。この時、葉中の過酸化水素レベルを測定すると、cAPX-KOでは野生株とほぼ同等であったが、cAPX-OEラインでは約30％程度低下していた。48時間暗適させた各植物体に、1,000 μmol m^{-2} s^{-1}の強光ストレス処理を行ったところ、cAPX-KOの葉中過酸化水素レベルは、野生株と比較して、強光照射1時間まで顕著な過酸化水素の蓄積が観察されたのに対し、cAPX-OEでは過酸化水素の蓄積は抑制されていた。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、強光ストレス下のcAPX-OEでは、約1,400遺伝子に有意な発現変動が認められた。*HsfA2*や*HSP18.1*などさまざまなレドックス応答性遺伝子の転写レベルを定量的PCRにより確認したところ、強光ストレス後のcAPX-OEで発現抑制されており、マイクロアレイの結果を支持していた。また、二次元電気泳動法により、強光ストレス応答時のcAPX-OEとcAPX-KOにおけるリン酸化・脱リン酸化タンパク質について調べたところ、いくつかのタンパク質がリン酸化修飾の影響を受けることが示唆された。

ascorbate peroxide, redox, high-light, Arabidopsis

講演番号：3A30a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ A校舎30会場

ユーグレナチオレドキシンペルオキシダーゼの同定と機能解析

Identification and characterization of thioredoxin peroxidase in *Euglena*

○玉木 峻、山口 由貴、丸田 隆典、澤 嘉弘、重岡 成[1]、石川 孝博（島根大生資科・生命工、[1]近畿大農・バイオ）

○Shun Tamaki, Yuki Yamaguchi, Takanori Maruta, Yoshihiro Sawa, Shigeru Shigeoka[1], Takahiro Ishikawa (Shimane Univ., [1]Kinki Univ.)

【目的】カタラーゼを持たないユーグレナ(*Euglena gracilis* Z)は、細胞質に局在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)が主要な過酸化水素代謝酵素として機能している。またESTデータベースより、APX以外にもグルタチオンペルオキシダーゼやチオレドキシンペルオキシダーゼ(TPX、ペルオキシレドキシン）などのチオールペルオキシダーゼ相同遺伝子の存在も示唆されているが、その機能については未解明である。今回、ユーグレナTPXに着目し、ユーグレナTPXの同定と機能解析を試みた。

【結果】ユーグレナEST情報に基づき、PCRにより*TPX1*（ELL00006268）および*TPX2*（ELL00002589）の完全長cDNAを単離した。得られたTPX1およびTPX2の推定分子量は、それぞれ約22.7 kDaおよび23.3 kDaで、他生物由来の2-Cys型TPXと約60％程度の同一性を示した。膜貫通ドメイン予測プログラム（TMHMM）の結果から、TPX1とTPX2はそれぞれ細胞質と葉緑体に局在することが示唆された。pColdIIベクターと大腸菌BL21starの系により組換え体TPXを発現後、Hisタグを利用して精製酵素を調整した。活性測定のため大腸菌由来のチオレドキシン（Trx）/Trx還元酵素（NTR）系用いた場合、組換え体TPXは活性測定ができなかったが、酵母由来のTrx/NTR系により測定が可能であったことから、ユーグレナTPXの基質特異性は既報のTPXと異なることが示唆された。組換え体TPX1およびTPX2はいずれも過酸化水素とアルキルヒドロペルオキシドに対して有意な活性を示した。組換え体TPX1とTPX2の過酸化水素に対するK_m値はそれぞれ34.7 μMおよび40.5 μMであり、既知のTPXと比べて高い値を示した。また組換え体TPX1とTPX2の触媒効率(k_{cat}/K_m)はそれぞれ0.014 $\mu M^{-1}\ s^{-1}$および0.037 $\mu M^{-1}\ s^{-1}$であり、ユーグレナAPX（16.5 $\mu M^{-1}\ s^{-1}$）と比較して著しく低いことが示された。

暗条件で定常期まで培養した暗適応ユーグレナ細胞に120 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$の光を照射し、光適応時におけるTPX発現について検討した。その結果、TPX活性およびタンパク質レベルはいずれも光照射後24時間までに低下することが示され、光適応時に発現レベルが増加するAPXとは対照的であることが示された。

Euglena gracilis, thioredoxin peroxidase, reactive oxygen species

講演番号：3A30a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ A校舎30会場

LC-MS/MSによる新奇ストリゴラクトン探索法の確立

An analyzing method for searching new strigolactones by liquid chromatography/tandem mass spectrometry

○上野 琴巳[1]、水谷 正治[1]、滝川 浩郷[1,2]、杉本 幸裕[1,2]（[1]神戸大院農・生機科、[2]JST/JICA SATREPS）

○Kotomi Ueno[1], Masaharu Mizutani[1], Hirosato Takikawa[1,2], Yukihiro Sugimoto[1,2] ([1]Grad. School of Agric. Sci., Kobe Univ., [2]JST/JICA SATREPS)

ストリゴラクトン（SL）は根寄生雑草種子の発芽やAM菌の菌糸分岐を誘導するだけでなく、植物の枝分かれ抑制活性も示す。これまで根寄生雑草種子に対する発芽刺激活性を指標に、十数種類に及ぶSLが単離同定されてきた。しかしSLの生合成能力を有している植物においてもSLは生理活性物質として作用していることから、植物体内にはSL代謝不活性化経路も存在していると考えられ、その経路上のSLでは根寄生雑草種子の発芽も誘導できない可能性がある。また植物体内に含まれるSLは微量であり、単離が困難である場合も多い。そこでLC-ESI-MS分析におけるSLのイオン化やフラグメントパターンの特徴を明確にすることで、植物が生産する未知のSLの化学的特徴を得る方法を体系化することにした。

LCの移動相を水-メタノールの混合溶媒としてSLのESI-MS分析を行うと、全ての標品においてプロトンやナトリウムイオンが付加した分子イオンが検出されただけでなく、水が付加したと考えられる$[M + 18]^+$ の分子イオンが検出された。またこれら分子イオンの生成比はコーン電圧に依存し、低いコーン電圧では水付加分子イオンが、高いコーン電圧ではナトリウム付加分子イオンが多く生成した。Strigol, orobanchol及びsorgomolは分子内に水酸基を1つ有する構造異性体であり、生成する分子量関連イオンは全て同じである。しかしコーン電圧を30 Vに設定した場合それらの生成比には違いが見られ、orobancholではプロトン付加イオンが最も強く検出されたのに対し、sorgomolではナトリウム付加イオンの方が強く検出された。それに加えsorgomol及びstrigolではフラグメントイオンを生成しやすく、sorgomolでは$[M - 29]^+$ が、strigolでは脱水イオンが観察された。またこれらの生成もコーン電圧の影響を大きく受け、電圧の変化に伴い生成比が変化した。MS/MS分析において、ナトリウム付加イオンからは主に$[M - 97]^+$ のフラグメントイオンが生成したのに対し、プロトン付加イオンと水付加イオンからはSLの構造的特徴でもあるメチルフラノン環（D環）由来のフラグメントイオンm/z 97だけでなく、三環ラクトン（ABC環）由来のフラグメントイオンが生成した。これらの情報から各SL特有のMRMチャンネルを設定することで、LCだけでなくMSでも構造異性体の識別が可能となった。またorobancholとorobanchyl acetateのように置換基の位置が同じである類似化合物間では生成するフラグメントパターンが類似していた。この結果より、MS/MSのフラグメントパターンの類似性から未知のSLでも置換基の位置を推定することが可能であると思われる。

Strigolactone, LC-MS/MS, identification

講演番号:3A30a12
講演日時、会場:3月24日11:21～ A校舎30会場

合成ストライゴラクトン GR24 の植物による代謝と生成物の同定

Metabolism of GR24 in plants and identification of metabolites

○中嶌　瞳[1, 2]、平垣内　雅規[1]、本並　宜子[1]、上野　琴巳[1]、水谷　正治[1]、
滝川　浩郷[1, 2]、 杉本　幸裕[1, 2] ([1]神戸大院・農、 [2]JST/JICA, SATREPS)
○Hitomi Nakashima[1, 2], Masaki Hiragakiuchi[1], Noriko Motonami[1], Kotomi Ueno[1],
Masaharu Mizutani[1], Hirosato Takikawa[1, 2], Yukihiro Sugimoto[1, 2]
([1]Grad. School Agric. Sci., Kobe Univ., [2]JST/JICA, SATREPS)

【目的】
コウモリカズラ（*Menispermum dauricum*）及びソルガム（*Sorghum bicolor*）は側鎖に水酸基を有するストライゴラクトンであるストライゴールとソルガモールを生産する。 これらに合成ストライゴラクトン GR24 を投与し、その代謝物を LC-MS/MS で解析した結果、既知の 4-hydroxy GR24 の他に新たに GR24 が水酸化されたと思われる化合物がコウモリカズラから 1 種類、ソルガムから 2 種類検出された。 生成物は A 環部分のいずれかの炭素が水酸化されていると考えられたが、生成量は微量であり、植物体から抽出し構造解析することは困難であった。 そのため、 5, 6, 7, 8 位のいずれかが水酸化された GR24 を合成し、LC-MS/MS を用いて保持時間の挙動を比較することで構造解析することを企図した。
【方法】
市販の 4-, 5-, 6-, 7-hydroxy-1-indanone を出発原料とし、まず水酸基を MOM 基で保護した。 次いで NaH 存在下、炭酸ジメチル、ブロモ酢酸エチルと反応させた後、酸加水分解とそれに続く脱炭酸を行いケトカルボン酸を得た。 ケトカルボン酸を NaOH 中で $NaBH_4$ を用いて還元し、続く HCl 処理により三環性ラクトンを得た。 次にフェノール性水酸基を TBS 基で保護し、ホルミル化、bromo butenolide とのカップリング、最後に TBS 基の脱保護を行った。 現在までに 5-hydroxy GR24 及び 6-hydroxy GR24 を合成した。 合成した hydroxy GR24 と植物から得られた代謝物を LC-MS/MS を用いて分析し、その挙動を比較した。
【結果】
LC-MS/MS の分析の結果、5-hydroxy GR24 と保持時間が一致したことから、生成物の 1 つが 5-hydroxy GR24 であることが判明した。 また、6-hydroxy GR24 はいずれの生成物とも一致しなかった。 現在残りの生成物の構造を同定するために 7-hydroxy GR24 及び 8-hydroxy GR24 の合成を進めている。

GR24, hydroxylation, metabolism

講演番号：3A30a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ A校舎30会場

ストリゴラクトン生合成阻害剤の植物に対する効果

Effects of strigolactone biosynthesis inhibitor on plants

○伊藤　晋作、戸塚　直哉、梅原　三貴久[1]、花田　篤志[1]、山口　信次郎[1]、浅見　忠男（東大院・農生科・応生化、[1]理研・PSC）

○Shinsaku Ito, Naoya Totsuka, Mikihisa Umehara[1], Atsushi Hanada[1], Shinjiro Yamaguchi[1], Tadao Asami (Dept. Appl.Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [1]RIKEN, PSC)

【目的】ストリゴラクトン（SL）は根寄生植物の発芽促進作用、アーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導作用、及び植物の枝分かれ抑制作用を有する生理活性物質である。我々はこれまでに、イネにおいて分げつ促進活性を有し、SLの一種である2’-*epi*-5-deoxystrigol（*epi*-5DS）の内生量を減少させる化合物TIS13を同定してきた。また、TIS13を構造展開することにより、より低濃度で*epi*-5DS内生量を減少させることができ、副作用の少ないSL生合成阻害剤TIS108を見いだした。しかし、TIS108がイネ以外の植物体に対しても効果を有するか、また、*epi*-5DS以外のSLに関しても内生量を減少させるのかは検討されていない。そこで今回我々はイネ、ソルガム、ミヤコグサ培養根、シロイヌナズナに対するTIS108の効果を検討した。

【方法】イネ及びソルガムに関してはリン欠乏水耕液を用いて水耕栽培し、根滲出液及び根中のSL量をLC-MS/MSにより定量した。ミヤコグサ培養根は培養液中及び根中のSL量をLC-MS/MSにより定量した。シロイヌナズナに関してはSLが検出できなかったため、枝分かれ促進活性を指標としてSL生合成阻害活性を評価した。

【結果】イネ、ソルガム、ミヤコグサ培養根においてそれぞれ*epi*-5DS及び*epi*-orobanchol、5DS、5DSが検出され、TIS108処理によりこれらの内生量がTIS108の濃度依存的に減少した。シロイヌナズナに関しては、TIS108含有水耕液を用いて水耕栽培することでTIS108の濃度依存的に枝分かれ数が増加した。この時矮化作用等の副作用は観察されなかった。またTIS108と合成SLであるGR24とを共処理することでTIS108による枝分かれの増加が抑制された。以上の結果より、TIS108は様々な植物で効果のあるSL生合成阻害剤であると考えられる。

strigolactone, biosynthesis, inhibitor

講演番号：3A30a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ A校舎30会場

新規ストリゴラクトンミミックDebranoneの創製研究

Synthesis and biological evaluation of the new strigolactone mimic Debranone

○福井　康祐、伊藤　晋作、浅見　忠男（東大院・農）
○Kosuke Fukui, Shinsaku Ito, Tadao Asami (The Univ. Tokyo)

【目的】根寄生植物の一種である*Striga*や*Orobanche*の種子発芽誘導物質として発見されたストリゴラクトン（SL）は、近年の研究により根共生菌の一種であるアーバスキュラー菌根菌（AM菌）の菌糸分岐誘導活性や、植物体内で枝分かれを抑制するホルモン活性を有することが明らかとなった。根寄生植物の農作物への被害はアフリカや地中海沿岸で甚大であり、防除法としてSLの散布による自殺発芽誘導が提案されている。また、枝分かれの形質は農作物にとって重要な形態であり、収量や品質に直接結びつく因子である。以上のことから、SLの農業への応用を目的とし、SLミミックの合成研究を行うこととした。

【方法】当研究室が所有する化合物の中から、天然型SLと一致する部分構造を有する化合物がイネのSL生合成変異体である*d10*の枝分かれを抑制することを見出した。そこで本化合物をリード化合物として合成展開を行った。活性の評価は、枝分かれが促進されるという*d10*の形質を抑制する活性を指標に行った。また、本化合物による枝分かれ抑制効果が、SLの情報伝達経路を経由していることを確かめるため、SL非感受性変異体を用いた解析や、Real-time PCRを用いた遺伝子発現の解析を行った。更に、根寄生植物の一種である*Striga*の発芽試験による活性評価も行った。

【結果】合成展開の結果、約40種の類縁化合物を合成することに成功した。これら合成した化合物の*d10*変異体に対する枝分かれ抑制活性を調べたところ、現在最も広く用いられているSLアナログであるGR24の約10倍ー100倍程度活性が強い化合物を見いだすことができた。次に、代表化合物１種をイネのSL生合成変異体と非感受性変異体に投与したところ、GR24を与えた時と同様に生合成変異体では枝分かれの多い形態から少ない野生型の形態へと回復するのに対し、非感受性変異体では形態の回復は観察されなかった。また、生合成遺伝子の一つであるD10遺伝子の発現量の解析の結果、本化合物投与時には通常のSLシグナル伝達時と同様にD10遺伝子の発現がフィードバックにより抑えられることを確かめた。一方、本化合物群を根寄生植物に処理した場合には、GR24が発芽を誘導し始める濃度では発芽を誘導せず、より高濃度でのみ発芽を誘導した。以上より、今回合成した化合物群（Debranone）は植物の枝分かれ抑制活性に特化した新たなSLミミックであると言える。

Strigolactone, branching, mimic

講演番号：3A30a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ A校舎30会場

アブシジン酸により誘導されるゼニゴケの二次代謝産物

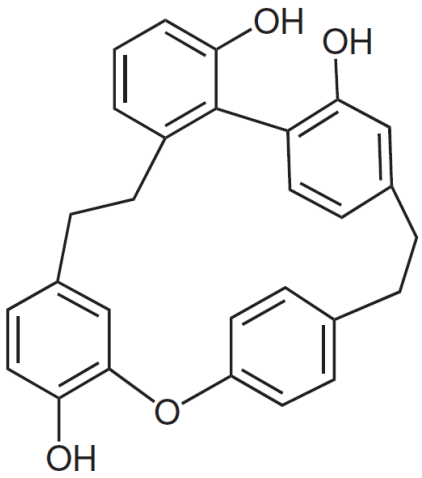
Secondary metabolites induced by abscisic acid in *Marchantia polymorpha*

○蔭山 暁人、高橋 公咲[1]、鍋田 憲助[1]（北大・農、[1]北大院・農）

○Akito Kageyama, Kosaku Takahashi[1], Kensuke Nabeta[1] (Hokkaido Univ. Agr., Hokkaido Univ. Res. Agr.)

【目的】アブシジン酸は植物ホルモンの一種であり、高等植物においては乾燥への適用や種子の発芽抑制等、様々な生理作用を有することが知られている。苔類の一種であるゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*）においてもアブシジン酸の存在は報告されているが、ゼニゴケ中のアブシジン酸の生理作用およびシグナル伝達機構に関する報告は少ない。本研究は、ゼニゴケにおけるアブシジン酸の生理作用の解明を目的とし、アブシジン酸により誘導されるゼニゴケの二次代謝産物の分析を行った。

【方法・結果】ゼニゴケは、10 μMのアブシジン酸を添加したOM51C寒天培地で、22℃、連続光照射下で30日間生育させた。植物体は、液体窒素で凍結させ破砕した後メタノールで抽出した。コントロールとしてアブシジン酸無添加のOM51C寒天培地上で生育させたゼニゴケも同様に生育させ、メタノールで抽出した。得られたメタノール抽出液は、濾過した後、逆相HPLCによる分析に供した。その結果、コントロールのゼニゴケの抽出液と比較してアブシジン酸処理をしたゼニゴケの抽出液で数種のピークの面積の増大が認められた。これらの化合物を同定するために、新たにアブシジン酸添加OM51C寒天培地上で生育させたゼニゴケ（400g）をメタノールで抽出した。本抽出液は、減圧濃縮した後、90%メタノールと*n*-ヘキサンによる液-液分配を行った。得られた90%メタノール層を減圧濃縮しメタノールを流去させた後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出液は、減圧濃縮後、分取逆相HPLCおよび分取TLCにより精製し、アブシジン酸処理により誘導される4種の化合物が単離された。最も生産量が多かった化合物（5.5 mg）は、各種スペクトルデータの解析より、苔類に特徴的な二次代謝産物であるビスビベンジル類のisoriccardin Cと同定された。その他の３種の化合物も、紫外線スペクトルおよびマススペクトルの結果より、ビスビベンジル類であると予想された。これらの化合物の構造解析は現在検討中である。



isoriccardin C

Marchantia polymorpha, abscisic acid

講演番号：3A30p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ A校舎30会場

アブシジン酸受容体アンタゴニストAS*n*

AS*n*, antagonists of abscisic acid receptors

○武藤　拓也、岡本　昌憲[1]、Sean Cutler[1]、平井　伸博[2]、轟　泰司[3]（静大院・農、[1]University of California, Riverside、[2]京大院・農、[3]静大・農）

○Takuya Muto, Masanori Okamoto[1], Sean Cutler[1], Nobuhiro Hirai[2], Yasushi Todoroki[3] (Grad. Shizuoka Univ., [1]California Univ., [2]Grad. Kyoto Univ., [3]Shizuoka Univ.)

【目的】アブシジン酸（ABA）は種子の休眠や環境ストレス応答に必須の植物ホルモンである。ABA 受容体（PYR/PYL/RCAR, 以下 PYLs）は，ABA と結合後，タンパク質脱リン酸化酵素（PP2C）の阻害剤として機能することで，リン酸化カスケードを活性化して遺伝子発現・生物活性を誘導する。シロイヌナズナの PYLs は ABA 依存性の違いから 2 つのクラスに分類される。PYR1 と PYL1-3（Class II 受容体）は ABA 依存的に活性型となり PP2C を阻害する。一方，PYL4-12（Class I 受容体）は ABA 非存在下でも活性型になることができるが，その生理的意義はよくわかっていない。本研究では，ABA と同様に PYLs に高い親和性を持ちながら PYLs-PP2C 間相互作用を阻害する分子，すなわち ABA 受容体アンタゴニストを PYLs-ABA 複合体結晶構造に基づいて設計した。PYLs-ABA 複合体には ABA の C3'→H 方向に小さな疎水性トンネルが存在し，PP2C との結合表面まで通じている。そこで，PYLs に結合してこれを活性化しつつもアルキル鎖のようなものを疎水性トンネルから外に向かって突出させる分子は，PYLs-PP2C 間相互作用を妨害して ABA 受容体アンタゴニストとして有効に機能すると考え，ABA の 3'位に硫黄を介して直鎖アルキルを導入した AS*n*（*n* はアルキル鎖の炭素数）を設計した。PYLs-AS*n* 複合体モデルから，AS*n* は，*n*<4 のときにアゴニスト，*n*>4 の場合はアンタゴニストとして機能すると予想した。

【方法と結果】*S*-ABA の環部二重結合をエポキシ化後，アルキルチオレートによるエポキシ開環と続く in situ 脱水反応の計 2 段階で *S*-AS*n*（*n*=2-10）を合成した。次に，（1）異種発現タンパクを用いた in vitro PP2C 活性，（2）トランスジェニックシロイヌナズナ（pMAPKKK18::GUS）を用いた ABA 応答性遺伝子発現，（3）ABA 応答性遺伝子発現の qRT-PCR，（4）ダイコン実生の乾燥ストレス耐性，（5）シロイヌナズナおよびレタス種子の発芽について，ABA 非存在下，ABA 存在下，あるいは浸透圧ストレス下で AS*n* の活性を調べた。（1）～（4）では AS2，AS4，および AS6 の 3 化合物を，（5）では合成したすべての AS*n* を用いた。まず（1）では受容体 Class によって活性が異なっていた。Class II 受容体に対しては，AS2 は強いアゴニスト，AS4 は弱いアゴニスト且つ弱いアンタゴニスト，AS6 は強いアンタゴニスト効果を示した。一方，Class I 受容体に対しては，何れもアンタゴニスト効果を示した。（2）～（5）については，（1）の Class II 受容体に対する効果と同様の結果が得られたため，ABA シグナル伝達においては Class II 受容体を介した PP2C 阻害がより重要であり，AS*n* はこれに対して *n*<4 でアゴニスト，*n*>4 でアンタゴニストとして機能することをほぼ確証した。

以上，AS*n* は ABA 受容体に直接的に作用して ABA シグナル伝達を調節する分子であり，ABA シグナル伝達機構に関する化学生物学的研究において優れたツールとして機能することを明らかにした。

abscisic acid, ABA, antagonist

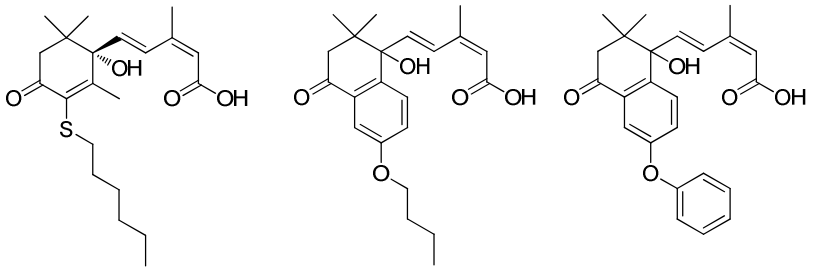
講演番号：3A30p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ A校舎30会場

配座エントロピー縮小型アブシジン酸受容体アンタゴニストの創出

Development of abscisic acid receptor antagonists with reduced conformational entropy

○野武　晃、武藤　拓也[1]、竹内　純[2]、轟　泰司（静大・農、[1]静大院・農、[2]静大院・創造）
○Akira Notake, Takuya Muto[1], Jun Takeuchi[2], Yasushi Todoroki (Shizuoka Univ., [1]Grad. Shizuoka Univ., [2]Grad. School Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】アブシジン酸（ABA）受容体（PYR/PYL/RCAR，以下PYLs）はABAと結合して活性型となり，プロテインホスファターゼ2C（PP2C）の阻害剤として機能することで，種子休眠や気孔閉鎖などのストレス応答を誘導する。したがって，PYLsの機能を調節できる分子（アゴニストやアンタゴニスト）は，ABAシグナル伝達に関する化学生物学的研究のツールとして有用である。前演者が発表したように，我々は，PYLs-ABA複合体の結晶構造に基づいた設計により，PYLsのアゴニストもしくはアンタゴニストとして機能するAS*n*の開発に成功した。しかし，アンタゴニストとして機能する*n*>4のAS*n*のアルキル鎖は配座の自由度が高く，PYLs結合時のエントロピー損失が大きいと予想される。これを小さくする方向でAS*n*を構造展開すれば，PYLsに対する親和性がAS*n*よりも高い新規アンタゴニストを創出できるかもしれない。そこで本研究では，ABAの環部2重結合にベンゼン環を融合し，AS6のアルキル鎖を途中まで固定した新規ABAアンタゴニストPAO4とPAOϕを設計した。PAO4はAS6よりも短いアルキル鎖をもち，PAOϕはPAO4のブチル基の代わりにフェニル基をもつ。PAOϕのフェニル基は，PYLs-ABA複合体の疎水性トンネルを構成する芳香族側鎖とのπ-π相互作用を期待して導入した。



S-AS6　　PAO4　　PAOϕ

【方法と結果】6-Hydroxy-2,2-dimethyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2*H*)-oneのフェノール性水酸基をブチル化およびフェニル化後，側鎖ジエンカルボン酸のメチルエステルを既報通り4段階で導入した。続いて環部4'位を酸化した後，側鎖メチルエステルをアルカリ加水分解してPAO4およびPAOϕをそれぞれラセミ体として得た。シロイヌナズナ種子発芽に対して，PAO4は*S*-AS6とほぼ同等のABAアンタゴニスト効果を示した。一方，レタス種子発芽に対しては，PAO4は*S*-AS6よりも約3倍強いABAアンタゴニスト効果を示した。今回使用したPAO4がラセミ体であることも考慮すると，*S*-PAO4は*S*-AS6より強いPYLsアンタゴニストである可能性がある。現在，PAO4の光学分割とともに，PAO4よりもアルキル鎖が長いまたは短いPAO*n*の合成も検討している。PAOϕはシロイヌナズナとレタス何れの種子発芽に対してもABAアンタゴニスト効果を示さなかったが，単独処理で弱いABA活性を誘導した。PAOϕのPYLsアゴニストとしての弱さはフェニル基の立体障害によるのかもしれないが，アゴニストまたはアンタゴニストとして明確に機能するには，長さが中途半端だった可能性も考えられる。

abscisic acid, ABA, antagonist

講演番号：3A30p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ A校舎30会場

タイトル　エチレン様活性化合物の選抜と作用機構の解析

Title　Screening and characterization of novel chemicals with ethylene mimic activity

○北畑 信隆[1,2]、早瀬 大貴[1,2]、湯本 弘子[3]、中野 雄司[2]、中山 真義[3]、浅見 忠男[1,2]（[1]東大院・農生科、[2]理研、[3]花き研究所）

○ Nobutaka Kitahata[1,2], Hiroki Hayase[1,2], Hiroko Yomoto[3], Takeshi Nakano[2], Masayoshi Nakayama[3], Tadao Asami[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]RIKEN, [3]National Institute of Floricultural Science)

【目的】エチレンは高等植物の様々な生理現象に関わっている。エチレンは植物の生長制御に有用であるが、気体であるためその取り扱いが難しく、エチレン生合成前駆体であるACCや、その分解によりエチレンを生じる化合物であるエテホンがエチレン投与の代替化合物として使われている。しかしながら、エチレン活性の厳密な制御のためには、より直接的にエチレンシグナルを制御できる物質の創製が必要であることから、エチレンと同様の活性を示す新規化合物の探索を行った。

【方法】エチレン処理によりシロイヌナズナの暗所芽生えはフックの過度な屈曲、伸長生長阻害、横方向への肥大成長という、いわゆるトリプルレスポンスと呼ばれる形態変化を示す。そこで、暗所3日目の芽生えの形態を指標として、ケミカルライブラリー中よりエチレン形態を誘導する化合物の探索を行った。さらにこの形態を指標として化合物の作用部位について解析を行った。

【結果】化合物選抜の結果、エチレン様活性を示す化合物HJ2を選抜した。しかしながら、選抜した化合物はエチレン様活性がそれほど強くなかったことから、HJ2の構造を基にして誘導体の設計と合成を行い、その構造活性相関について調べた。その結果、HJ2がエチレン様活性を示すために重要な構造を明らかにするとともに、HJ2より活性の向上した2種の誘導体(A11, A12)を選抜することに成功した。次にこれらの化合物の標的部位を明らかにするために、エチレン生合成経路への化合物の影響を調べた。まず、エチレン生合成阻害剤と化合物を共処理したが、化合物の誘導するエチレン様形態は抑制されなかった。また、化合物処理した植物のエチレン生成量は無処理のものとほぼ変わらなかった。これらの結果より、化合物はエチレン生合成に影響しないことが明らかとなった。次にエチレンシグナル経路との関係を明らかにするため、エチレン受容体アンタゴニストであるSTSとの共処理を行った。その結果、A11ではSTS濃度依存的にエチレン様形態が抑制されたが、A12では抑制されなかった。一方、A12をエチレン非感受性の受容体変異体である*etr1-1*に処理した場合には、エチレン様活性は誘導されなかった。これらの結果より、A11とA12がエチレン受容体の異なる部位へ作用するエチレン受容体アゴニストである可能性が示唆された。

ethylene, agonist, chemical biology

講演番号：3A30p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ A校舎30会場

ジベレリン代謝に関わるCYP714ファミリーの阻害剤

An inhibitor of CYP714 family involved in gibberellins metabolism

○新間優子[1]，酒井杏奈[2]，内記久美[2]，水谷正治[3]，平井伸博[4]，大西利幸[5]，轟　泰司[1]　([1]静大農，[2]静大院農，[3]神戸大院農，[4]京大院農，[5]静大・若手グローバル研究リーダー育成拠点)

○Yuko Shinma[1], Anna Sakai[2], Kumi Naiki[2], Masaharu Mizutani[3], Nobuhiro Hirai[4], Toshiyuki Ohnishi[5], Yasushi Todoroki[1] ([1]Facul. Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. School Agric., Shizuoka Univ., [3]Grad. School Agric., Kobe Univ., [4]Grad. School Agric., Kyoto Univ., [5]Division of Young Research Leaders, Shizuoka Univ.)

【目的】植物の活性型ジベレリン（GA_1とGA_4）は，A環2位の水酸化，B環7位カルボン酸のメチルエステル化，さらには13位に隣接するD環エキソメチレンのエポキシ化によって不活性化される。エポキシ化反応を触媒する酵素は，イネ*eui*変異の原因遺伝子がコードするCYP714D1であることが明らかになっているため，CYP714ファミリーはGA不活性化に関わるP450酵素と考えることができる。ところが最近，同じCYP714ファミリーに属するシロイヌナズナCYP714A2が，GA生合成中間体である*ent*-カウレン酸（KA）の13位を水酸化してステビオールを生成することが明らかになった。さらに，イネCYP714B1は，GA_4の生合成中間体であるGA_{12}の13位を水酸化して，GA_1の生合成中間体であるGA_{53}に変換する機能を有することが明らかにされた。つまり，CYP714ファミリーは，GA_4に至る早期非水酸化経路からGA_1に至る早期13位水酸化経路への分岐反応を触媒する重要な酵素も含んでいることになる。ここで，GAの核内受容体GID1は，イネでもシロイヌナズナでも，13位に水酸基をもつGA_1よりもそれをもたないGA_4に対して高い親和性を有する。実際，CYP714A2やCYP714B1を過剰発現したシロイヌナズナは内生主要活性型GAがGA_4からGA_1に変化するために半矮性を示す。したがって，CYP714ファミリーは，活性型GAやその生合成中間体の13位近傍を酸化して，GA活性を下げる役割を担っている一群の酵素と考えることもできる。ただし，GA_4よりもはるかに活性の低いGA_1を内生主要活性型GAとして積極的に利用するイネのような植物が存在する理由はよくわかっていない。以上のようなCYP714ファミリーに纏わる謎を解明するために役立つ分子プローブとして，演者らはCYP714ファミリーを特異的に阻害する分子に着目した。本発表では，シロイヌナズナCYP714A2に対する阻害剤探索を行った結果について報告する。

【方法と結果】バキュロウィルス-昆虫細胞発現系によって異種発現したシロイヌナズナCYP714A2を用いて酵素試験系を構築した。本酵素がKAをステビオールに変換することを確認したのち，この反応を強く阻害する物質を市販アゾール系化合物からスクリーニングしたところ，抗菌剤として開発されたimazalil（IMZ）が強力なCYP714A2阻害活性を示すことがわかった。ところが，IMZは真菌のCYP51阻害剤であるだけでなく，イネを矮化させ，さらにはABA代謝酵素CYP707Aも強く阻害することが明らかになった。そこで現在，これら酵素のin vitro試験系を構築するとともに，酵素選択性の向上を目指してimazalilの構造展開を検討している。

gibberellin, GA, P450

講演番号：3A30p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ A校舎30会場

標的因子DELLAとの結合におけるジベレリン受容体の親和性決定領域の研究

Fluctuation of Arabidopsis gibberellin receptors' preference to DELLA proteins by swapping of their lids and bodies

○Seung-Hyun Park、中嶋 正敏、尹 禎敏、大谷 征史、浅見 忠男（東大院農生科･応生化）
○Seung-Hyun Park, Masatoshi Nakajima, Jung-Min Yoon, Masato Otani, Tadao Asami (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

【目的】植物ホルモン・ジベレリン（GA）は、植物の生活環における発芽、茎の伸長、花芽形成など様々なプロセスを調節する。その受容体Gibberellin Insensitive Dwarf1（GID1）は、当初イネのGA非感受性変異体より同定され、続いてシロイヌナズナからもそのホモログ分子3種の存在が明らかになった。GAの信号伝達過程は、受容体GID1が信号伝達抑制因子DELLAをGA依存的に捕捉することを端緒として始まる。演者らはこの過程の制御機構に興味を持ち、シロイヌナズナに存在する3種のGID1と5種のDELLA因子との間で生じる15通りの結合性に差異があるか、言い換えれば、特定のGID1に各DELLA因子に対する親和性の差が認められるかを検討し、2009年度の本大会においてこの親和性に種々のバリエーションが存在することを報告した[1]。2008年に受容体分子の結晶構造が解明され、DELLA因子との結合にGID1分子のN末端側、いわゆるlidと呼ばれる領域が主に関与することが明らかとなった。そこで本発表では、DELLA結合に関わるGID1分子内の主要領域が、DELLAに対する親和性の決定に関わる領域と重複する可能性について検討するため、lidとそれ以外の領域とをスワップさせたキメラGID1を作製した。これらを用いた酵母three-hybrid系を構築し、親和性に関する変化の傾向を調べた。

【方法・結果】シロイヌナズナに存在する3種のGA受容体（AtGID1a、b、c）を対象として、それぞれのlid領域とそれ以外の残りの領域とに分け、Overlap Extension PCRにより計6種のキメラ受容体遺伝子を作製した。このいずれかを組み合わせて、酵母three-hybrid系構築用ベクターに挿入した。他方、5種のDELLA因子、GAI（GA Insensitive)、RGA（Repressor of *ga1-3*)、RGL1（RGA-like 1)、RGL2、RGL3の各プラスミドについては前報で構築済みであり転用した。常法に従い、各試験用酵母を入手して検討した結果、概ねlid領域のみに由来して親和性が決まる傾向が認められたが、特定の組み合わせにおいてはその予想に反する結果が現在までに3例得られている。これは、lid以外の領域も親和性決定に関与することを強く示唆する。発表にてその詳細を報告したい。

[1] Parkら、日本農芸化学会2009年度大会（福岡)、大会講演要旨集　308頁。

Gibberellin, Receptor, Yeast three-hybrid system

講演番号:3A30p07
講演日時、会場:3月24日15:05～ A校舎30会場

ジベレリン様活性を示す合成化合物；探索と活性発現機構

Title Identification and characterization of a new compound mimicking GA action

○下高原宏明、大谷征史、羅明、中野雄司[1]、浅見忠男（東大院・農生科・応生化,[1]理研基幹研究所）

○Hiroaki Shimotakahara, Masato Otani, Ming Luo, Takeshi Nakano[1], Tadao Asami(Dept. Appl.Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [1]Advanced Research Institute, RIKEN)

【目的】ジベレリン(GA)は種子発芽や茎の伸長促進、花芽形成といった植物の生理現象に深く関わっている。農業においてはこの利点を活かした成長制御剤として用いられているが、コストが高いために利用法が限られるという問題点を抱えている。一方で、GA生合成阻害剤は成長制御剤として広く応用されている。近年、研究面におけるケミカルバイオロジー分野の進展に伴い、生体物質の機能発現機構を明らかにするために機能制御剤が重要視されるようになってきた。そこで私達は、成長制御剤としての実用化や植物の成長メカニズム解明に応用できるようなGA類似機能を有する化合物の探索を行い、見出した化合物の活性発現機構についての追究を行った。

【方法】スクリーニングではGAの生合成阻害剤であるパクロブトラゾールとライブラリー中の化合物とを共処理したアッセイ系を用いた。植物体はシロイヌナズナを用い、2日間低温処理した後、暗所で6日間成育させた。成育6日後のシロイヌナズナの発芽率と胚軸長を測定することで化合物の影響を調べた。

【結果】スクリーニングの結果、パクロブトラゾールによる発芽や胚軸伸長の抑制から植物を回復させる化合物、67Dを見出した。パクロブトラゾールとは阻害部位が異なるジベレリン生合成阻害剤であるプロヘキサジオンを処理した植物も67D処理により発芽や伸長が回復した。一方で、67Dを植物の発芽を阻害するアブシジン酸と共処理したが、67Dを加えなかった培地と比べ有意な差は認められなかった。現在、67Dの作用に関して詳細に検討しているところである。また、67Dの構造改変により、より活性の強い化合物を取得することにも成功した。現在67Dのさらなる構造展開による活性の最適化を図っている。67Dは合成が容易であるために、今後の活性上昇や作用様式の特定により、植物成長メカニズムの解析や農業上への応用が期待できると考えている。

Keyword1 plant, Keyword2 gibberellic acid, Keyword3 chemical

講演番号:3A30p08
講演日時、会場:3月24日15:16～ A校舎30会場

ジベレリン受容体機能阻害剤を用いた信号伝達過程を標的とする変異体選抜
Screening of gibberellin signal mutants by using an inhibitor for its perception

○尹 禎敏、中嶋正敏、大谷征史、増口 潔、Park Seung-Hyun、浅見忠男（東大院農生科・応生化）
○Jung-Min Yoon, Masatoshi Nakajima, Masato Otani, Kiyoshi Mashiguchi, Seung-Hyun Park, Tadao Asami (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

【目的】ジベレリン(GA)は種子の発芽や茎の伸長など、植物の様々な分化・成長を制御する植物ホルモンとして知られる。演者らは、GA信号伝達過程の端緒となる受容体機能の化学的制御を目的として、その機能制御剤探索の状況について一昨年度の本大会で報告した[1]。そこで本研究では、それらGA受容体の機能制御剤として最終的に選抜された化合物の中から1種を選び、当該化合物処理に対する応答変異体の選抜を展開した。以下その実施状況について報告する。
【方法・結果】既に、酵母two-hybrid系に基づく阻害剤探索系を用いることにより、市販の化合物ライブラリー約1万種の中から10種程度の化合物を受容体機能阻害剤として選抜している。これらはいずれも、シロイヌナズナの成長に対して阻害的作用を示すことを確認した。そこで、これらを対象として、選抜用酵母に認められる生育阻害と系に添加されるGA濃度との関連性や、植物への投与試験における阻害活性、あるいは、結果の安定性などを考慮して、化合物を応用した研究展開に用いる1種を決めた。続いて、種子ストックセンターよりシロイヌナズナ完全長cDNAを高発現させたFOXライン、あるいは、アクティベーションタギングラインを取り寄せ、受容体機能制御剤を含む培地上に蒔き、周囲の植物体と比較して有意に化合物に抵抗性を示して成長する個体を選抜した。これら、受容体機能制御剤に対する低感受性変異体の中には、何らかの事情によりGA信号伝達過程が通常より活性化されているものが含まれる可能性が期待できることから、現在その性状を示す原因について追究を行っている。
[1]尹ら、日本農芸化学会2010年度大会(東京)、講演要旨集 235頁.

gibberellin, inhibitor, FOX hunting system

講演番号：3A30p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ A校舎30会場

ハバチによるシバヤナギのゴール（ハウラタマフシ）形成における植物ホルモンの役割

The roles of plant hormones in the willow gall formation by sawflies.

○山口大貴，田中弘毅[1]，徳田誠[2]，浅見忠男[1]，鈴木義人（茨城大・農・資源生物，[1]東大院農生科・応生化，[2]佐賀大農・応生科）

○Hiroki Yamaguchi, Hiroki Tanaka[1], Makoto Tokuda[2] Tadao Asami[1], Yoshihito Suzuki (Ibaraki Univ., [1]The Univ. of Tokyo, [2]Saga Univ.)

【目的】昆虫によるゴール形成は，昆虫が分泌する刺激物質により誘導されると考えられている。我々はこれまでにハバチがシバヤナギに形成するゴール（シバヤナギハウラタマフシ）を材料に，ゴール形成と植物ホルモンとの関連性について追究し，ゴール内部の幼虫には高濃度のオーキシンが含まれ，また，ハバチ幼虫にTrpをIAAに変換する活性があること明らかにした。今回，サイトカイニン（CK）の分析を行うと共に，ゴール形成におけるこれらの植物ホルモンの作用を検討するため，関連する遺伝子の発現解析を計画した。

【方法・結果】ゴール組織，ハバチ幼虫，正常葉の内生CKをLC/MS/MSにより分析した結果，何れの組織からもトランスゼアチン（*t*-Z）が主要なサイトカイニンとして検出された。ゴール組織には*t*-Zが正常葉の数倍から数十倍の濃度で含まれており，ハバチ幼虫からは更に高い濃度（正常葉の1000倍以上）の*t*-Zが検出された。また，幼虫が成長する時期のゴール組織は分裂が盛んで，幼虫が摂食した部位が補われる様に分裂するが，その時期の幼虫，ゴール組織ともに*t*-Z濃度が高いのに対し，幼虫が脱出する直前，ゴールの成長が止まった時期には，幼虫の内生*t*-Z濃度が明瞭に低下した。これらの結果から，CKのゴール形成への関与が強く示唆された。現在までに，オーキシンおよびCKの生合成／代謝／情報伝達に関わる遺伝子として，シバヤナギからそれぞれYUC／GH3／IAA/AUX，IPT･LOG／CKX／RRをクローニングし，現在，ゴール組織と正常葉における発現量の比較解析を行っている。

gall, auxin, cytokinin

講演番号：3A30p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ A校舎30会場

タマバエによるゴール形成における植物ホルモン類の関与

Involvement of plant hormones in the formation of galls by gall midges.

○田中祐一朗，岡田浩一[2]，徳田誠[3]，浅見忠男[2]，鈴木義人（茨城大・農・資源生物，[2]東大院農生科・応生化，[3]佐賀大農・応生科）

○Yuichiro Tanaka, Koichi Okada[2], Makoto Tokuda[3], Tadao Asami[2], Yoshihito Suzuki (Ibaraki Univ., [2]The Univ. of Tokyo, [3]Saga Univ.)

【目的】ゴールとは，昆虫類等のゴール形成者からの刺激によって植物組織が肥大・奇形化したものである。ゴールの形成には昆虫類から分泌される刺激物質が関与していると考えられるが，刺激物質の本体は明らかとなっていない。我々はタマバエがヨモギに形成するゴール（ヨモギハエボシフシ）に関して，内部の幼虫に植物組織以上の濃度でIAAが含まれ，また，幼虫にはTrpからIAAへの変換活性があることを昨年度大会で報告した。今回，サイトカイニンを含めて更に詳細に植物ホルモン内生量の分析を行うと共に，新たにエノキにタマバエが形成するゴール（エノキハトガリフシ）の解析を行い，比較，検討した。

【方法・結果】各ゴールを発達ステージ毎に大まかに分け，幼虫，正常葉と共にIAA及びサイトカイニン（CK）類をLC/MS/MSを用いて定量した。その結果，ヨモギハエボシフシではゴールや正常葉に比べて幼虫に高濃度のCK，特にトランスゼアチン（*t*-Z）とその前駆体であるトランスゼアチンリボシド（*t*-ZR）が含まれていた。正常葉とゴール組織間では，主要なサイトカイニンの種類が異なったものの，全体として濃度に大きな差は認められなかった。オーキシンに関しては，前回の分析結果と同様，幼虫には植物組織に比べて顕著に高濃度のIAAが含まれており，また，ゴール組織からは正常葉より僅かに高い濃度のIAAが検出された。一方，エノキハトガリフシのCKに関しては，全体として幼虫に高濃度のCK類が含まれていたが，ゴール組織は初期のゴールにのみ*t*-ZRやイソペンテニルアデノシン（iPR）などのリボシド型サイトカイニンの濃度が高く，その後急速な低下が認められた。IAAについては，このゴールに関しても幼虫の濃度がゴールや正常葉に比較して顕著に高濃度であった。しかし，幼虫によるTrpからIAAへの変換活性は今のところ確認出来ていない。現在，ゴール形成におけるこれらの植物ホルモンの作用を検討するため，IAA及びCK応答性遺伝子の発現解析を進めている。

Gall, Auxin, Cytokinin

講演番号：3A30p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ A校舎30会場

アブラムシによるハルニレのゴール形成機構に関する研究

Studies on the induction mechanism of the elm gall by an aphid.

○吉田彩夏，鈴木義人（茨城大・農・資源生物）
○Sayaka Yoshida, Yoshihito Suzuki (Ibaraki Univ.)

【目的】ゴールとは，昆虫などからの何らかの刺激に対して植物が組織分化の途上で反応し，その結果，植物の一部の細胞が異常に増殖したり，肥大したり，組織分化の過程が狂ったりすることによって引き起こされる，組織や器官の病理学的に異常な形状のことをいう。ハルニレハフクロフシはオカボノクロアブラムシ(*Tetraneura nigriabdominalis*)がハルニレに形成する袋状のゴールである。このゴールはオカボノクロアブラムシが葉の師管液を吸汁する際に，唾液として分泌される成分により誘導されると考えられるが，その形成機構の詳細は不明である。今回ゴールの構造を観察するとともに，植物ホルモンの関与を検討すべく，オーキシンおよびサイトカイニン（CK）の分析を行った。

【方法・結果】本ゴールは，オカボノクロアブラムシ幼虫が取り付いた葉の反対側（表側）に袋状の組織がふくらむことにより形成されるが，ゴール組織は葉とほぼ同じ厚みを持っているものの，構成する細胞種は異なり，単に葉の細胞が伸長・拡大して形成されるのではないことが示唆された。また，ゴール組織の横断面を観察したところ，表皮の細胞のサイズは葉と大きく異ならないことから，急速なゴールの発達は細胞分裂による新たな組織の形成によることが判明した。ゴールを発達段階ごとに分けて，植物組織および虫を採集し，インドール-３-酢酸(IAA)と CK 類を LC/MS/MS によって定量したところ，IAA，CK ともに，植物組織に比べて幼虫に高濃度に含まれていた。IAA はゴール発達初期に特に濃度が高く，初期成長への関与が示唆された。また，主要な CK の種類が幼虫と植物組織で異なるなど，両ホルモンの関与が示唆された。現在，ゴール形成におけるこれらの植物ホルモンの作用を検討するため，IAA 及び CK 応答性遺伝子の発現解析を進めている。

gall, auxin, cytokinin

講演番号：3A30p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ A校舎30会場

タイトル：アミノ基転移酵素を標的とするオーキシン生合成阻害剤

Title：Structure-activity relationship of L-aminooxyphenylpropionic Acid derivatives as auxin biosynthesis inhibitors

成川　恵[1]、喜久里　貢[1,2]、佐藤　明子[1]、田代　早苗[2]、三谷　由佳[1,2]、三井　麻利江[1]、中村　郁子[1]、小倉　岳彦[2]、軸丸　裕介[2]、神谷　勇治[2]、林　謙一郎[3]、浅見　忠男[4]、添野　和雄[5]、藤岡　昭三[6]、吉田　茂男[1]、○嶋田　幸久[1,2]（[1]横浜市大・木原生研、[2]理研・PSC、[3]岡山理大・理、[4]東大院・農生科、[5]農研機構・近中四農研、[6]理研・基幹研）

Megumi Narukawa[1], Ko Kikuzato[1,2], Akiko Sato[1], Sanae Tashiro[2], Yuka Mitani[1,2], Marie Mitsui[1], Ayako Nakamura[1], Takehiko Ogura[2], Yusuke Jikumaru[2], Yuji Kamiya[2], Ken-ichiro Hayashi[3], Tadao Asami[3], Kazuo Soeno[5], Shozo Fujioka[6], Shigeo Yoshida[1], ○Yukihisa Shimada[1,2] ([1] Kihara Inst. Biol. Res., Yokohama City Univ., [2]RIKEN PSC, [3] Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., [4] Grad. Sch. Agr. Life Sci., Tokyo Univ., [5] NARO, WeNARC, [6]RIKEN ASI)

【目的】

植物ホルモンの一種であるオーキシンは、成長や分化に関与する重要な成長調節物質である。我々は最も主要なオーキシン Indole-3-acetic acid (IAA) の生合成阻害剤として L-aminooxyphenylpropionic Acid (AOPP)を同定した。しかし AOPP は MS 培地中で分解されやすく、phenylalanine ammonia-lyase (PAL)にも作用するなど特異性が低い。そこで、本研究では AOPP をリード化合物として構造展開を行ない、より優れたオーキシン生合成阻害剤の開発を試みた。

【結果】

AOPP のフェニル基を様々な官能基で置換したところ、ナフチル基やジフェニル基などのフェニル基よりやや大きめな構造を導入すると、AOPPよりもIAA生合成に特異的に作用することがわかった。次に、カルボキシル基をエステルの形で保護すると、IAA生合成阻害活性が高くなる傾向が見られた。また、アミノオキシ基をフタロイル基やベンゾイル基などで保護すると、同じく活性が高くなる傾向が見られた。ただし、AOPPのカルボキシル基やアミノオキシ基を保護すると、オーキシン生合成酵素Tryptophan aminotransferase of Arabidopsis 1 (TAA1)やAtPAL2のリコンビナントタンパク質に対する阻害活性が消失した。このことから、これら保護基を導入した化合物は生体内ではプロドラッグとして作用し、構造の安定性が増したことや脂溶性が高くなり吸収されやすくなったことで、IAA生合成阻害活性が高くなったと考えられた。

本研究は、生研センターイノベーション創出事業の一環として行われた。

auxin biosynthesis inhibitor, AOPP, structure-activity relationship

講演番号：3A30p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ A校舎30会場

新奇トリアゾール系発根促進剤の探索と機能解析

Screening for novel chemicals that promote root formation

○ 白井　郁也、福井　康祐、伊藤　晋作、北畑　信隆、根岸　直希[1]、河岡　明義[1]、浅見　忠男（東大院・農生科・応用化、[1]日本製紙・アグリ・バイオ研）

○ Ikuya Shirai, Kosuke Fukui, Shinsaku Ito, Nobutaka Kitahata, Naoki Negishi[1], Akiyoshi Kawaoka[1], Tadao Asami (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, Agri-Bio. Res. Lab. Nippon Paper Industries CO., LTD)

【目的】

パルプ生産に適した植林木である *Eucalyptus globulus* は難発根樹種であり、挿し木による増殖が非常に困難である。*E.globulus* は高濃度 CO_2 条件下において発根率が上昇するが、なお発根率が低い難発根系統のものが存在し、それらは易発根系統と比較して内生のインドール酢酸（IAA）量が 1/3 程度と低下していることが判明した。以上より、内生の IAA 量を増加させる能力を有する化合物は難発根系統の発根率を上昇させる可能性があると考えられた。

植物ホルモンの代謝経路にはシトクロム P450 が関わっているものが多く報告されており、これを阻害することによって植物ホルモンの内生量を高く維持できる可能性がある。そこで研究室内化合物ライブラリー中より、シトクロム P450 を阻害すると考えられるトリアゾール基を分子内に有する化合物を対象として、発根率を上昇させる化合物のスクリーニングを実施した。これによって難発根系統の発根率を上昇させる化合物を複数選抜し、その中のひとつである MA65 の作用をシロイヌナズナを用いて調べた。MA65 をシロイヌナズナに処理すると、オーキシン過剰様形態である根の増加傾向が見られ、さらに内生 IAA 量が無処理のものと比べて 2 倍程度に上昇していることが確認された。しかし MA65 は矮化作用を示したことから、発根促進活性特異的化合物の創製を目指して、MA65 をリード化合物とした合成展開を行い、合成化合物の活性を評価するためシロイヌナズナを用いた生物検定を行った。

【方法と結果】

MA65 の構造展開を行い、新たに 16 種類のトリアゾール化合物を合成した。続いてこれら化合物を一定の濃度で含む寒天培地上でシロイヌナズナを生育させ形態観察を行った。また IAA 生合成阻害剤である L-2-aminooxy-3- phenylpropionic acid（L-AOPP）との共処理による重力屈性異常からの回復試験を実施して活性評価を行った。

16種類の化合物の中から最も評価の高かった化合物について*E.globulus*を用いた発根試験を行った結果、MA65を超える発根率の上昇活性が確認された。

root formation, screening, auxin

講演番号：3A30p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ A校舎30会場

ブラシノステロイド生合成阻害剤Brz耐性突然変異体群bil原因遺伝子による情報伝達制御の分子機構とイネbil形質転換体の解析

Molecular mechanism for cellular development of brassinosteroid signaling mutants *bil*

○中野雄司[1,6]、山上あゆみ[1]、嶋田勢津子[1]、森昌樹[5]、中野明彦[1,4]、Joanne Chory[2]，浅見忠男[1,3]
([1]理研・基幹研、[2]Salk Inst.，[3]東大院・農生科、[4]東大院・理、[5]農業生物資源研、[6]JST －さきがけ)

○Takeshi Nakano[1,6]、Ayumi Yamagami[1]、Setsuko Shimada[1]、Masaki Mori[5]、Akihiko Nakano[1,4]、Joanne Chory[2], Tadao Asami[1,3]
([1]RIKEN ASI, [2]Salk Inst.，[3]Univ.Tokyo,Agri，[4]Univ.Tokyo,Sci，[5]NIAS, [6]JST-PRESTO)

【目的】ブラシノステロイドは発生・成長・生殖などの植物生長の様々な過程で重要な生理機能を発現している。特に、初期成長期と栄養成長期における、ブラシノステロイド欠損状況によって促進される光形態形成や葉緑体発達の制御機構は、ブラシノステロイド生理活性の大きな特徴の一つである。本研究は、ブラシノステロイド生合成阻害剤Brzによる形態変化を指標として変異体を単離する化学遺伝学（ケミカルジェネティクス）を用いることにより、未解明な部分が多く残るブラシノステロイド細胞内情報伝達機構の解明を試み、その総体として植物の栄養成長期制御の分子機構を解明することを目的としている。

【方法と結果】暗所 Brz 存在下において発芽した野生型 *Arabidopsis* は暗所下ながら胚軸が矮化し子葉が開く、暗所光形態形成を示す。この条件下において光形態形成を示さない胚軸徒長形質bil（ *Brz-insensitive-long hypocotyl*）変異体は、ブラシノステロイド情報伝達の活性型突然変異体であると考え、第一に単離した EMS 変異bil1に続いて、Fast Neutron 変異種子から半優性形質のbil5を単離した。このbil5は、細矮性 slender dwarf様の特徴的な形質を示し、細胞生物学解析により、維管束数が増加しながら、維管束形成細胞数は減少する細胞分化への関与が明らかとなった。さらに、fine mappingにより、新規遺伝子 ORF 内の脱メチル化変異とそれに伴う当該遺伝子の高発現化が変異原因であることが明らかになった。

続いて、bil5変異体と受容体bri1の２重変異体形態の遺伝学解析、bil5変異体における bHLH 型転写因子 BES1 タンパク質の脱リン酸化解析およびブラシノステロイド応答性遺伝子群の発現解析等により、BIL5 は、ブラシノステロイド情報伝達の主要経路とされる受容体 BRI1 と転写因子 BES1, BIL1/BZR1 の間に位置づけ得ると考察している。さらに、類似の Brz 耐性変異体bil4や Brz 高感受性変異体bss1の解析も行っている。

また、ブラシノステロイドは器官伸長の活性化や病害抵抗性の向上など、総じて成長に促進的に作用することが生理学的研究により明らかになっている。アラビドプシスbil変異体で得られている遺伝子群は多くが機能獲得型の変異体であるため、アラビドプシス由来bil変異体を直接に導入することによっても、それらの有用形質をイネなどの実用化植物に付与することが出来ると考え、試行を行っている。それらのbil遺伝子についてイネに導入したbil形質転換イネにおける一株当たりの増収効果、バイオマス増大効果等についても紹介したい。

phytohomone, brassinosteroid, signaling

講演番号：3A30p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ A校舎30会場

新規ブラシノステロイド生合成阻害剤の生物活性

Biological activity of novel brassinosteroid biosynthesis inhibitor

○王　敬銘[1]，山田　和弘[1]，山上　あゆみ[2]，小川　敦史[1]，浅見　忠男[3]，中野　雄司[2]，吉澤　結子[1]（[1]秋田県立大・生物資源，[2]理研・基幹研，[3]東大・応生化）

○Keimei OH[1], Kazuhiro Yamada[1], Ayumi Yamagami[2], Atushi Ogawa[1], Tadao Asami[3], Takeshi Nakano[2], Yuko Yoshizawa[1]（[1]Dept. of Biol., Akita Pref. Univ., [2]ASI., RIKEN, [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo）

【目的】ブラシノステロイド（BRs）は，植物の発生・成長・生殖など様々な過程で中心的な役割を果たす植物ホルモンである。我々は，植物の成長調節機構を解析する目的で，BRs生合成阻害剤の開発研究を行った。ケトコナゾールをスカフォードとして構造展開を試みたところ，強い活性を示す新規BRs生合成阻害剤を見出した。本研究では，これら新規BRs生合成阻害剤の生物活性を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】様々な条件下で生育させたシロイヌナズナを対象に，阻害剤処理に由来する植物の変化を細胞レベルならびに遺伝子発現レベルで検討を行った。具体的には，BRs生合成中間体と阻害剤同時処理により阻害剤の作用部位を検討した。また，阻害剤で処理した植物の細胞の大きさを顕微鏡観察により解析した。さらに，阻害剤処理した植物の光合成遺伝子，ならびに*SAUR*や*TCH4*の遺伝子発現を定量PCRにより解析した。BRs生合成中間体の回復実験では，阻害剤の作用部位が*DWF4*である可能性が示された。本大会では、顕微鏡観察や遺伝子発現の変化について報告する。

Brassinosteroid; Biosynthesis inhibitor; Plant growth regulator

講演番号：3A30p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ A校舎30会場

新規ブラシノステロイド生合成阻害剤の構造活性相関研究

Structure-activity relationship of novel brassinosteroid biosynthesis inhibitors

○山田　和弘、矢島　脩、吉澤　結子、王　敬銘（秋田県立大・応用生物）
○Kazuhiro Yamada, Osamu Yajima, Yuko Yoshizawa, Keimei Oh (Dept.of Biol., Akita Pref Univ.)

【目的】ブラシノステロイド（BRs）は、植物の生育・成長に中心的な役割を果たす植物ホルモンである。その生合成を制御することは、植物の成長機構解明に役立ち、新規植物成長調節剤の開発に繋がる。我々は、新規BRs生合成阻害剤を開発するために、ケトコナゾールの構造を阻害剤のスカフォードとしてトリアゾール系新規BRs生合成阻害剤を見出した（図1. A参照）。本研究では、この系統の化合物が活性発現するための構造の特徴を明らかにすることを目的とし、阻害剤の構造活性相関解析を行なった。

【方法・結果】目的化合物（一般式は図1. B参照）の合成は、ケトコナゾールの合成法に準じて行なった。様々な置換基を導入し、合計17個の新規化合物を合成した。化合物のBRs生合成阻害活性を検討するために、1/2 MS、0.5%ゲランガム培地で、22℃、5日間暗所で生育させたシロイヌナズナを用いて、胚軸の伸長阻害を指標に検討を行った。また、ジベレリンとブラシノステロイドの生合成阻害活性の選択性を評価するために、両ホルモンを培地に添加し、胚軸阻害の回復を検討した。それらの結果について報告する。

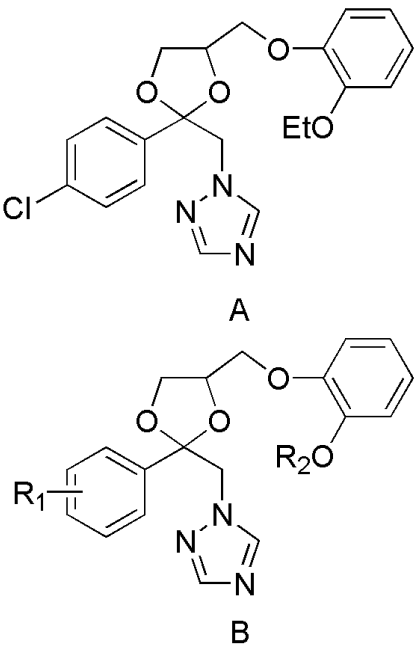


図1

Brassinosteroid; Biosynthesis inhibitor; Plant growth regulator

講演番号:3A30p17
講演日時、会場:3月24日17:15～ A校舎30会場

ショ糖生合成能強化植物におけるホルモン代謝を介した側枝形成機構の解明

Mechanisms of shoot branching via plant hormone metabolism in transgenic plants with enhanced sucrose biosynthesis

○大鳥久美、Daniel Padilla-Chacon、作山治美、田茂井政宏、重岡　成（近畿大・農・バイオ）
○ Kumi Otori, Daniel Padilla-Chacon, Harumi Sakuyama, Masahiro Tamoi, Shigeru Shigeoka(Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

【目的】我々はこれまでに、細胞質ショ糖生合成系のFBPaseの強化は通常CO_2環境下では植物の生育に大きな影響を及ぼさないが、高CO_2環境下では側枝が増加し、光合成機能および形態形成に大きく影響を及ぼすことを明らかにしてきた(Tamoi *et al.*, *Photosynth. Res.* 2011)。この事実は、光合成産物である糖の分配が、植物の形態形成を制御していることを示唆している。これまで、植物ホルモンによる形態形成の研究は多く成されているが、それら植物ホルモンが生体内でどのように制御され、形態形成に至るのか、その分子機構は不明な点が多い。そこで、糖分配の変化が側枝形成に及ぼす影響を分子レベルで明らかにするために、ラン藻由来FBPase-Ⅱを細胞質で発現させたシロイヌナズナ(AcF)を作出し、形態形成に関わる植物ホルモン関連遺伝子群の発現解析を行った。

【結果】形質転換タバコと同様に、通常CO_2(360 ppm)環境下ではAcF株は野生株と同様の生育を示したが、高CO_2(1000 ppm)環境下では、AcF株の側枝数は野生株より有意に増加し、8週齢における生重量は1.2～1.5倍に増大していた。そこで、形態変化が見られる直前の5週齢ロゼッタ葉を用いて、伸長成長、腋芽形成に関わる植物ホルモンの生合成に関わる遺伝子群および植物ホルモン応答遺伝子群の発現量を比較した。その結果、植物ホルモンのオーキシン、ジベレリンの合成や応答に関与する遺伝子の発現量については、AcF株では野生株と比較して有意な変化は認められなかったが、ストリゴラクトンの合成遺伝子である*MAX4*や応答遺伝子*BRC1*は、ストリゴラクトン量の減少を示唆する変化が見られた。一方、サイトカイニン応答遺伝子*ARR7, AtMYB2*については、サイトカイニン量の増加を示唆する変化が認められた。

以上の結果より、ショ糖合成能が強化されたAcF株では、高CO_2環境下において糖分配が顕著に変化し、それがシグナルとなってストリゴラクトンやサイトカイニン代謝に影響を及ぼし、その結果として側枝数が増加したと考えられる。現在、糖分配の変化によるこれら植物ホルモン関連遺伝子群の発現制御機構を明らかにするため、ロゼッタ葉、根、頂芽を含む基部など部位別に、糖応答とサイトカイニン応答の両方に関与するインベルターゼやイソペンテニルトランスフェラーゼの遺伝子の発現を、Real-time PCRにより解析している。

sucrose biosynthesis, branching, hormone

講演番号:3A30p18
講演日時、会場:3月24日17:26～ A校舎30会場

シロイヌナズナ由来シトクロム P450 CYP94C1 の機能解析

Functional Analysis of Cytochrome P450 CYP94C1 from *Arabidopsis thaliana*

○谷口 沙希、和久田 真司、北岡 直樹、佐分利 亘、川出 洋[1]、松浦 英幸、鍋田 憲助、今井 亮三[2]、松井 博和（北大院農・応生科、[1]東農工大農・応生科、[2]農研機構・北海道農研）
○Saki Taniguchi, Shinji Wakuta, Naoki Kitaoka, Wataru Saburi, Hiroshi Kawaide[1], Hideyuki Matsuura, Kensuke Nabeta, Ryozo Imai[2], Hirokazu Matsui (Hokkaido University, [1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Hokkaido Agricultural Research Center)

【目的】ジャスモン酸(JA)は生長、生殖、および病傷害ストレス応答に関与する植物ホルモンである。イソロイシンとの接合体(JA-Ile)が、JA 応答遺伝子群の発現を促進する。JA や JA-Ile は水酸化を受け不活化される。JA の水酸化物であるツベロン酸は、さらにスルホン化およびグルコシル化される。JA 類が受ける代謝の中で、水酸化機構は未知であったが、近年、シロイヌナズナにおいてシトクロム P450 CYP94B3 が JA-Ile をツベロン酸イソロイシン(TA-Ile)に水酸化することが報告された。シロイヌナズナの遺伝子共発現データベースによれば、シトクロム P450 様遺伝子 CYP94C1 は CYP94B3 と共発現し、傷害により誘導される。そこで、CYP94C1 が JA 類の水酸化酵素の一つであると予想し機能解析を行った。

【方法】CYP94C1 の cDNA をメタノール誘導性 AOX1 プロモーター下にクローン化し、シロイヌナズナ NADPH:P450 レダクターゼが導入されたメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* (X-33 株)に導入した。メタノール誘導条件下で JA、JA-Ile および TA-Ile を含む培地で培養し、培養上清中の添加基質代謝物の有無を UPLC-MSMS を用いて解析した。また、シロイヌナズナの CYP94C1 欠損株および野生株に傷害を与え、JA 類の内生量の変化を比較した。

【結果と考察】CYP94C1 を導入した *P. pastoris* を JA-Ile 添加培地で培養したところ、培養上清から TA-Ile が検出された。一方、JA および TA-Ile 添加培地では、これらに変化は見られなかった。また、非形質転換株の培養上清では、全ての基質に変化はなかった。これらの結果から、CYP94C1 は JA-Ile を TA-Ile に水酸化する活性を持つことが明らかになった。次に、シロイヌナズナの CYP94C1 欠損株に傷害を与え、JA 類の内生量の変化を野生株と比較した。CYP94C1 欠損株と野生株で JA 類の内生量に大きな差は見られなかった。これは、CYP94C1 の欠損下でも、CYP94B3 との機能重複により JA 類の代謝が正常に維持されることを示している。

jasmonic acid, cytochrome P450, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：3A30p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ A校舎30会場

ヒメツリガネゴケの12-オキソファイトジエン酸還元酵素の機能解析

Functional analysis of OPDA reductases in *Physcomitrella patens*.

○高橋 知寛、高橋 公咲[1]、阿部 達也[1]、P.K.G.S.S. Bandara[1]、松浦 英幸[1]、鍋田 憲助[1] （北大・農、[1]北大院・農）

○Tomohiro Takahashi, Kosaku Takahashi[1], Tatsuya Abe[1], Bandara P.K.G.S.S.[1], Hideyuki Matsuura[1], Kensuke Nabeta[1] (Hokkaido Univ. Agr., [1]Hokkaido Univ. Res. Agr.)

【目的】オクタデカノイド経路はジャスモン酸の生合成経路であり、12-オキソファイトジエン酸（OPDA）などのオキシリピンの生産に関与している。高等植物において、オクタデカノイド経路の主要な酵素であるアレンオキシドシンターゼ（AOS）、アレンオキシドシクラーゼ（AOC）および12-オキソファイトジエン酸還元酵素（OPR）がすでに明らかにされている。また、OPRは、非天然型のOPDAを還元するグループIと天然型のOPDAも還元できるグループIIに分類される。一方、蘚類のモデル植物であるヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）においては、すでに*AOS*遺伝子および*AOC*遺伝子がクローニングされ、それらの組換えタンパク質の酵素活性は高等植物と同様であることが示されている。しかし、OPRに関する研究報告はこれまでなされていない。そこで、我々はヒメツリガネゴケの*OPR*遺伝子をクローニングし、その機能を解析することを目的として研究を行った。

【方法・結果】ヒメツリガネゴケのゲノムデータベースから、ヒメツリガネゴケには７種類の*OPR*遺伝子（*PpOPR1*～*PpOPR7*）の存在が示唆された。系統解析をしたところ、*PpOPR3*、*PpOPR6*および*PpOPR7*がグループIIに、その他の*PpOPR*はグループIに分類されることが推測された。この結果から、*PpOPR1*、*PpOPR3*および*PpOPR6*をクローニングし、組換えタンパク質の作製を試みた。*PpOPR1*は定法により大腸菌で発現させ、組換えタンパク質を得ることができた。*PpOPR3*および*PpOPR6*もクローニングし無細胞タンパク質発現系を用いて、それぞれの組換えタンパク質を得た。これらの組換えタンパク質は、ラセミ体のOPDAを基質としてOPR反応に供した。得られた酵素反応生成物はメチル化した後、キラルGC-MSにより分析した。その結果、*PpOPR1*は、非天然型OPDAを選択的に基質とし反応することが明らかとなった。*PpOPR6*は天然型および非天然型OPDAのいずれも基質として利用していることが示された。*PpOPR3*については解析中である。現在、グループIIのOPRとしての酵素活性が確認された*PpOPR6*の過剰発現株と欠損株を作製し、その表現型の変化を解析中である。

Physcomitrella patens, 12-oxo-phytodienoic acid, octadecanoid pathway

講演番号:3A30p20
講演日時、会場:3月24日17:48～ A校舎30会場

イチョウウキゴケのリポキシゲナーゼの解析

Analysis of lipoxygenases from a floating liverwort

○地阪　光生、Vernoica S. Chedea、西村　浩二[1]、長屋　敦、横田　一成
(島根大・生資科、[1]島根大・総科研支セ)
○Mitsuo Jisaka, Veronica S. Chedea, Kohji Nishimura, Tsutomu Nagaya, Kazushige Yokota
(Shimanedai, [1]Shimanedai)

【目的】リポキシゲナーゼ（LOX）は、多価飽和脂肪酸に分子状酸素を位置および立体特異的に付加し、脂肪酸ヒドロペルオキシドを生成する酵素である。植物のLOXは、主にリノール酸およびα-リノレン酸を基質とし、その反応生成物は、さらにオキシリピンと総称される種々の生理活性物質へと変換されて植物体の多用な生理調節に関わる。コケ植物のLOXに関する情報は未だ少ないが、唯一の例であるヒメツリガネゴケのLOXでは、酸素付加反応に加えてリアーゼ反応をも触媒するなど多機能性を有するものがあること、また、植物LOXがあまり基質としないアラキドン酸に対する基質選択性が高いものがあることなど、これまでの植物LOXにない特性を備えたものがあることが報告されている。そこで、本研究では、水上および地上の両方で生育できるなどのユニークな生態を持つイチョウウキゴケ（*Ricciocarpos natans*）に着目し、そのオキシリピンによる生理調節機能を解析する基盤として、本植物のLOXを解析した。
【方法】*R. natans*の全RNAから調製したcDNAを鋳型としてPCRを行い、LOXをコードすると予想されるcDNAをクローニングし、塩基配列を決定した。得られたcDNAを大腸菌発現ベクターpET28aに組み込み、大腸菌BL21(DE3)株で発現させた後、発現した組換えタンパク質を、そのN末端に付加したHis-タグを利用して精製した。精製した組換えタンパク質の酵素活性を検討し、LOX活性の確認と、反応の位置および立体特異性等の反応特性の解析を行った。
【結果】*R. natans*のcDNAから、これまでに２種類のLOX候補cDNA（*RnLOX1*および*RnLOX2*）をクローニングすることができた。*RnLOX1*および*RnLOX2*は、各々933および938アミノ酸からなるタンパク質をコードすることが推定され、それらの一次構造は78%が相同であった。いずれにおいても、LOXの活性中心に存在する鉄原子を保持する５種類のアミノ酸（His３残基、AsnおよびIle各１残基）が保存されていた。両cDNAの大腸菌発現を試みたところ、いずれも非常によく発現し、分子量が約100 kDaの組換えタンパク質を精製することができた。両組換えタンパク質をリノール酸およびα-リノレン酸と反応させたところ、反応液のUVスペクトルにおいて、共役二重結合の存在を示す234 nmの極大吸収が経時的に増大した。さらに、反応生成物を順相およびキラル相HPLCで分析したところ、13*S*-ヒドロペルオキシドのみが検出されたことから、いずれの酵素も13*S*特異的LOXであることが判明した。RnLOX1のリノール酸およびα-リノレン酸に対するk_{cat}/Km値は、各々8.4 x 10^6 s^{-1}および9.0 x 10^6 s^{-1}となり、顕著な基質選択性の違いは認められなかった。また、いずれのRnLOXにおいても、リノール酸およびα-リノレン酸の13*S*-ヒドロペルオキシドが9*S*-体より活性化に有効であった。

liverwort, lipoxygenase, oxylipin

講演番号：3A31a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ A校舎31会場

カキ果実に含まれるポリガラクツロン酸分解酵素阻害タンパク質の精製と阻害活性測定

Purification and inhibition assay of polygalacturonase inhibitor protein from Kaki persimmon (*Diospyros kaki*)

○國井沙織，片桐実菜[1]，山西妃早子[1]，尾崎嘉彦[2]，森本康一
（近畿大・生物理工，[1]和歌山県・工技センター，[2]農研機構・果樹研）
○Saori Kunii, Mina Katagiri[1], Hisako Yamanishi[1], Yoshihiko Ozaki[2], Koichi Morimoto
(BOST,Kinki Univ., [1]WINTEC, [2]NIFTS,NARO)

【背景と目的】植物に本来備わっている糸状菌や病原性微生物に対する防御機構は興味深く，感染時に誘導される抵抗性の感染特異的蛋白質として，Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP)やChitinaseが知られる．PGIP は，糸状菌の Polygalacturonase (PGase)が高等植物の細胞間隙に含まれているペクチン質を分解する活性を阻害することで菌の内部侵入を防ぐ．これまでに報告されている植物由来のPGIPは，シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*, 36.7 kDa)，イチゴ（*Fragaria ananassa*, 37.1 kDa)，インゲンマメ（*Phaseolus vulgaris*, 37.1 kDa)， コメ(*Oryza sativa subsp japonica*, 35.5 kDa)などで，カキ果実にその報告はない．一方，和歌山県では特産の干柿を安定に生産するため，カキ果実を加熱処理後にPGaseを作用させる容易な剥皮技術を開発した．この結果はカキにPGIPが存在することを示唆する．よって本研究では，PGaseの作用を阻害するカキ果実のPGIPを精製する方法を確立し，その阻害活性を調べることを目的とした．また，PGIPの阻害活性を定量的に比較評価するため，Milner-Avigad法を参考に簡便で再現性が高く，少量でガラクツロン酸が測定可能なマイクロアッセイ法を構築した．

【結果】 Milner-Avigad法を改良することで，より簡便で迅速にかつ少量のサンプル量でガラクツロン酸を定量できるマイクロアッセイ法を確立した．その検出感度は 55 µg/mL（ガラクツロン酸濃度相当）で，PGaseの反応生成物を測定することができた．

平核無柿を1.5 M NaClと0.1 M $MgCl_2$を含む酢酸緩衝液(pH 5.5)で粉砕し，飽和硫酸アンモニウムによる塩析でPGIPを含む粗精製タンパク質画分を得た．その画分を疎水性相互作用HPLCで分画したところ，4つの画分に分けられた．マイクロアッセイ法により，0.8 Mの硫酸アンモニウム濃度で溶出したFr. 1がPGIP活性を示した． さらにFr. 1を陽イオン交換HPLCで分画した結果，PGIP活性を示す画分を得た．SDS-PAGEの結果から，カキ果実のPGIPは36.3 kDaと算出された．精製PGIPは，1 µgあたりのPGase活性の阻害率が18%であり，非常に強い阻害活性をもつことが示された．

本研究で， Milner-Avigad改変マイクロアッセイ法を用いることにより，カキ果実にPGaseの活性を強力に阻害するタンパク質成分であるPGIPが含まれることを明らかにした．

PGIP, Kaki persimmon, PGase

講演番号:3A31a02
講演日時、会場:3月24日09:11～ A校舎31会場

シロイナズナ*CYP73A5*遺伝子を機能発現した大腸菌を用いたcinnnamic acidへの水酸基導入反応

Introduction reaction of hydroxyl group into cinnamic acid using *Escherichia coli* that functionally expressed the *Arabidopsis thaliana CYP73A5* gene

○北村瑛美、青木葉子、太田千裕、藤田 尚也[1]、音松 俊彦[1]、三沢 典彦[2]、新藤 一敏(日女大家政・食物、[1]神戸天然物化学、[2]石川県大・生資研)

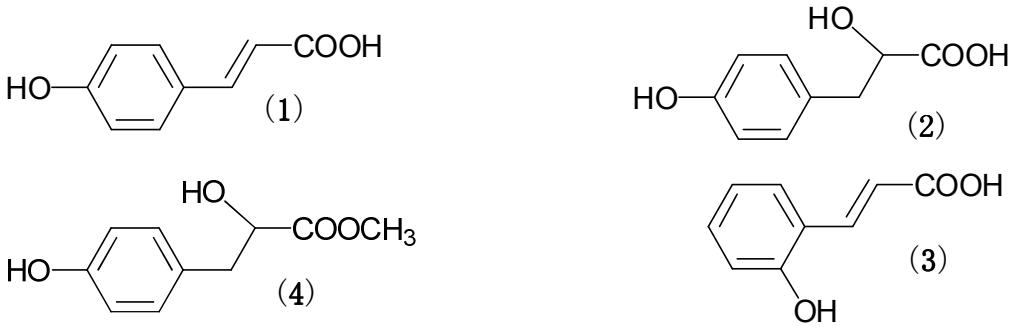
○Emi Kitamura, Yoko Aoki, Ohta Chihiro, Naoya Fujita[1], Toshihiko Otomatu[1], Norihiko Misawa[2], Kazutoshi Shindo (Nichijodai, [1]Kobetennenbutsukagaku, [2]Ishikawakendai)

【目的】植物または細菌由来の種々のシトクロムP450遺伝子を発現した大腸菌を用いて、様々な芳香族化合物への水酸化導入による新規または希少化合物の効率的な創製を目指している。また、得られた化合物については抗酸化活性を検討して、その有用性も検討する。今回、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）からcinnamate 4-hydroxylase遺伝子として見出された*CYP73A5*について検討した。

【方法】CYP73A5から小胞体膜アンカー配列と思われるN末の25アミノ酸を除いた*CYP73A5*(76)遺伝子を大腸菌ベクターpET21aに挿入したプラスミド、及びシロイヌナズナのNADPH-P450 reductase 2 (ATR2) からN末の72アミノ酸を除いた遺伝子をpSTV28に挿入したプラスミドを作製し、大腸菌BL21(DE3)に導入した。この大腸菌と、市販のcinnamic acidを共培養してバイオコンバージョンを行った。変換物は溶媒分画、シリカゲルカラム、分取ODS HPLCによって精製後、NMR及びMS解析により構造決定を行った。さらにラット脳脂質過酸化抑制評価系により抗酸化活性の検討を実施した。

【結果】変換反応は期待通り進行し、水酸基が導入された変換物として *p*-coumaric acid (**1**)、3-(4-hydroxyphenyl)lactic acid (**2**)、*o*-coumaric acid (**3**) 、methyl 4-hydroxyphenyllactate (**4**)の4つが得られた。主に得られた変換物は(**1**)であった。

ラット脳脂質過酸化抑制評価系により抗酸化活性を検討した結果、(**3**)以外は、いずれの化合物も抗酸化活性を示した（基質cinnamic acidは活性無)。また化合物を抗酸化活性の強かった順に示すと (**4**)＞(**2**)＞(**1**)であった。Phenolic OH基がbenzene環の*para*位に導入されると抗酸化作用を示すようになり、また*trans*二重結合の消失で作用が強くなる、という傾向が認められた。(**4**)が最も強い活性を示すのは、脂溶性が強まったためではないかと推察している。



P450 CYP73A5(76), cinnamic acid, antioxidative activity

講演番号：3A31a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ A校舎31会場

タバコ細胞における１型プロリン水酸化酵素を含む複合体の解析

Analysis of protein complex containing type 1 prolyl hydroxylase in tobacco cell

○長山　江理子[1]，陶山　明子[2]，松岡　健[1,2,3]（[1]九大院・生資環，[2]九大院・農，[3]九大・生環セ）
○Eriko Nagayama, Akiko Suyama, Ken Mastuoka (Kyushu Univ.)

【目的】多くのタンパク質は、翻訳後、機能する場所への輸送の過程で特異的な修飾を受け、機能場所において活性を発現する。この翻訳後修飾のうち、よく知られているのがタンパク質への糖鎖付加であり，そのうちO-結合型糖鎖付加は、水酸基をもつアミノ酸に糖鎖が付加するものである。O-結合型糖鎖付加の場合、糖鎖の付加部位と付加機構は生物種で大きく異なっている。植物特異的なタンパク質へのO-結合型糖鎖付加の最初のステップは、プロリン水酸化酵素（P4H）によってタンパク質中のプロリン残基がヒドロキシプロリン残基へ変換されることである。動物では、P4Hはプロテイン・ジスルフィド・イソメラーゼと複合体を形成して機能することが知られている。しかし、植物ではP4Hと相互作用するようなタンパク質に関する報告は乏しい。そのため、我々は植物のP4Hが動物のP4Hと同じように複合体を形成するか、複合体を形成している場合はそれがどのようなタンパク質かを明らかにすることを目的とし、研究を進めている。
【方法】タバコ由来のII型膜タンパク質である１型P4Hの一分子種、NtP4H1.2とGFP、Hisタグの融合タンパク質（P4H-GFP-His）をタバコ培養細胞BY-2株で発現させ、NtP4H1.2が形成する複合体の精製を試みた。P4H-GFP-Hisを発現させたBY-2細胞からマイクロソーム画分を回収した。次いで可溶化物を用いて、Hisタグ精製と抗GFP抗体を用いた免疫沈降を行った。その後、電気泳動で分離したタンパク質をゲルから回収し、ペプチドマスフィンガープリンテイング法によってNtP4H1.2複合体のコンポーネントの同定を進めた。また同時に、ショ糖密度勾配沈降速度法により、NtP4H1.2が複合体を形成するか検討した。
【結果】P4H-GFP-Hisを発現させたタンパク質のミクロソーム膜からの可溶化条件を検討し、1.0%のn-Octyl-β-D-glucosideを含む緩衝液が可溶化に最適であることを見出した。P4H-GFP-Hisタンパク質の分子量は60.3kDaであるが、ショ糖密度勾配沈降速度法で可溶化物の大きさを検討したところ、60.3kDaより大きな158kDa等の大きさの複合体が検出された。また、免疫沈降後SDS-PAGEで分離したポリペプチドのバンドパターンを、同様な処理を非形質転換細胞を用いて行った場合と比較すると、数本のP4H-GFP-His発現細胞に特異的なバンドが検出された。このことから、NtP4H1.2は複合体を形成していると考えられた。現在は、MALDI-TOF/MSを用いて複合体構成蛋白質の同定を進めており、その結果についても議論したい。

O-glycosylation, , prolyl hydroxylase

講演番号：3A31a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ A校舎31会場

ピレトリン生合成に関わる除虫菊リパーゼのアシルトランスフェラーゼ活性の基質認識

Substrate recognition in the acyltransferase reaction by a lipase involved in pyrethrin biosynthesis

○山田現、光森智紀、植田浩一[1]、菊田幸雄[2]、中山幸治[2]、勝田純郎[2]、畑中顯和[3]、松田一彦（近畿大院・農・応生化、[1]近畿大・農・応生化、[2]大日本除虫菊、[3]山口大）

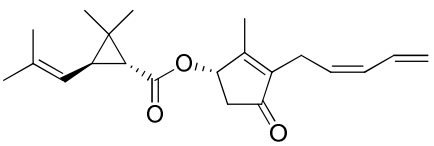
○Gen Yamada, Tomonori Mitsumori, Hirokazu Ueda[1], Yukio Kikuta[1], Koji Nakayama[2], Yoshio Katsuda[2], Akikazu Hatanaka[3], Kazuhiko Matsuda (Grad Sch. Agric., Kinki Univ., [1]Dep. Appl. Biol. Chem., Kinki Univ., [2]Dainihon Jochugiku, [3]Yamaguchi Univ.)

【目的】ピレトリン類は除虫菊(*Tanacetum cinerariifolium*) によって生合成される6種の類縁体からなる天然殺虫剤である。われわれはアシルトランスフェラーゼ活性によるピレトリンIの生成を指標に除虫菊の“蕾”から酵素活性の本体を精製し、さらに遺伝子をクローニングした。その結果、意外にも酵素はリパーゼの一種であることがわかった。本研究では、その組換え酵素を用いて酵素のアシルトランスフェラーゼ活性の基質特異性について解析したので報告する。

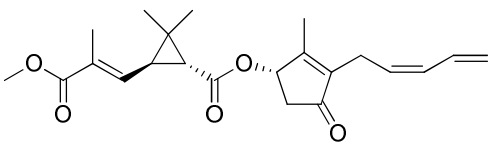
【方法】酵素は大腸菌で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーを使用して精製した。酵素反応は、ピレトリン類酸部から合成によって得られるアシルCoAとアルコールとの反応によって生じるピレトリン類をHPLCで定量することで評価した。

【結果】大腸菌で発現させ精製した酵素について、アシルトランスフェラーゼ活性のpHおよび温度依存性について調べた結果、至適pHは7.5、至適温度は25℃であった。この至適条件において、タンパク質量および反応時間との間に直線関係が成り立つことを確認した上で、酵素反応の基質特異性について調べた。その結果、酵素はアシルCoAおよびアルコールとも天然の基質の構造を厳密に認識することがわかった。すなわち、acetyl CoAやbenzoyl CoAをアシルCoAとして使用した場合のみならず、アルコールとしてbenzyl alcoholを使用したときにはエステル結合の生成は認められなかった。さらに菊酸CoAの4種の全立体異性体および天然の(*S*)-pyrethroloneのエナンチオマーである(*R*)-pyrethroloneを用いて基質特異性を調べた結果、酵素は天然の絶対配置を持つ基質を選択的に認識し、pyrethrin Iを合成した。

次にそれぞれの天然基質の中での酵素の基質選択性について調査した。酵素はアシルCoAの中ではpyrethroyl CoAよりもchrysanthemoyl CoAの方を選好し、アルコール部の中ではわずかな差であるもののjasmololoneを最も選好した。また速度論的解析から、アシルCoAよりもアルコールの方が酵素に対する親和性が高いことが明らかになった。



Pyrethrin I



Pyrethrin II

Pyrethrins, *Tanacetum cinerariifolium*, Acyltransferase

講演番号：3A31a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ A校舎31会場

除虫菊におけるピレトリンの局在

Localization of pyrethrins in *Tanacetum cinerariifolium*

○武田 健吾、植田 浩一[1]、財満信宏、森山達哉、河村幸雄、畑中顯和[2]、松田 一彦（近畿大院・農・応生化，[1]近畿大・農・応生化，[2]山口大・農）

○Kengo Takeda, Hirokazu Ueda[1], Nobuhiro Zaima, Tatsuya Moriyama, Yukio Kawamura, Akikazu Hatanaka[2], Kazuhiko Matsuda (Grad. Sch. Agric. Kinki Univ., [1]Dep. Appl. Biol. Chem., Kinki Univ., [2]Yamaguchi Univ.)

【目的】天然ピレトリン類は除虫菊に含まれる速効性に優れ，環境中での残留性の少ない有機農薬である。これまで我々はピレトリン類の増産を目標として、ピレトリン生合成に寄与する新規遺伝子を獲得するとともに，生合成遺伝子群の発現調節に関して研究し、知見を蓄積してきた。しかし、除虫菊組織におけるピレトリンの生合成と蓄積の場に関する報告例が少なく、不明な点が数多く残されている。そこで本研究では、HPLCによって除虫菊の特定の部位に存在するピレトリン類を定量し、realtimeRT-PCRによってピレトリン類の定量に用いた部位での生合成遺伝子の発現量を定量した。さらに、MALDI-MSによって葉部の特定の部位に存在するピレトリン類をイメージングすることによって、ピレトリン類の局在箇所を明らかにすることを目的とした。

【方法】除虫菊各組織におけるピレトリン類の平均量はHPLCによって求め、生合成遺伝子の発現量はrealtime PCRによって定量した。一方，除虫菊幼苗の葉部でのピレトリン類の局在については，イメージングMS技術を駆使して検討した。すなわち、幼苗の葉から調製した切片を用いて、組織中に存在するピレトリン特異的イオンをMALDI-MSで検出し、本イオンの強度に応じてピレトリン類の存在量をカラーで表示した。

【結果】TcGLIPはピレトリン生合成の最終ステップを触媒する酵素であり、本酵素をコードする遺伝子の発現量はピレトリン類の局在に影響する予測された。そこで、花、蕾、葉、茎および根部におけるピレトリン類と*TcGLIP*遺伝子の発現を定量した。その結果、ピレトリン含量と*TcGLIP*遺伝子の発現量は良く対応し、花と蕾で最も多く、次いで葉で中程度検出され、茎と根ではほとんど検出されなかった。

次に、イメージングMS技術によって除虫菊幼苗の葉におけるピレトリン類の局在について調べた。その結果、特定のピレトリン類については維管束周辺部で検出された。現在、各種の処理を除虫菊幼苗に加えたときに、このようなピレトリンの量と局在に変化が生じるのかどうか検討している最中である。

Pyrethrins, Imaging Mass Technology, *Tanacetum cinerariifolium*

講演番号：3A31a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ A校舎31会場

バラ開花時における香気前駆配糖体 2PEG と 2PEG 生合成酵素の変動解析

Variability analysis of an aroma precursor 2PEG and 2PEG biosynthetic enzyme in rose flowers

大場 幸江、平田 拓[1]、○大西 利幸[2]、渡辺 修治[1]（静大院・農、[1]静大院・創造、[2]静大・GRL）
Yukie Ohba, Hiroshi Hirata[1], ○Toshiyuki Ohnishi[2], Naoharu Watanabe[1] (Grad. School Agric., Shizuoka, [1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Division of Young Research Leaders, Shizuoka Univ.)

【目的】2-pheylethaol (2PE) はバラの香りを特徴づける重要な香気成分である。当研究室では、重水素ラベル化合物L-phenylalanine ([$^2H_8$] L-Phe) をバラ花弁に投与した結果、重水素ラベル体である [$^2H_8$] 2PEおよび2-pheylethyl β-D-glucopyranoside ([$^2H_8$] 2PEG) を検出し、さらに [$^2H_8$] 2PEGをバラ花弁へ投与した結果、[$^2H_8$] 2PEを検出することに成功した[1)]。このことは、バラ花弁における2PE生合成は①L-Pheから生合成される経路、②生合成された2PEが一旦2PEGへと配糖体化され貯蔵され、その後糖加水分解され生成される経路の2つが存在することを見出した (Figure)。バラの2PE発散量は2PE生合成 (経路①) だけでなく2PE配糖体化および2PEG糖加水分解 (経路②) のバランスにより制御されており、バラの2PE発散メカニズムの解明には2PE配糖体化およびPEG糖加水分解を担う酵素遺伝子の同定、発現時期や局在を明らかにすることが必須である。これまでL-Pheから2PEへの生合成経路に関する研究が精力的に行われてきたが、2PEから2PEGへの配糖体化および2PEGから2PEへの糖加水分解に関する知見は少ない。そこで我々は2PE生合成に対する2PEGの寄与を解明するために、バラ開花段階における2PEGと2PEの変動解析と2PEG生合成酵素の活性変動を解析した。

【方法・結果】バラ (*Rosa* 'Yves Piaget') 花弁の開花段階を、蕾、花弁展開初期、中期、後期の四段階に分類した。各開花段階の凍結花弁から 2PE および 2PEG を抽出後、GC-MS 解析に供した。また凍結花弁から抽出した粗酵素溶液を用いて開花段階における 2PE 配糖体化活性を測定した。その結果、内生 2PE 量は花弁の展開に伴い増加するのに対して、内生 2PEG 量は花弁展開初期に最も蓄積し、その後は蓄積量が減少した。また、2PE 配糖体化酵素活性は、花弁展開初期に最も高く、花弁の展開とともに活性が低下した。以上のことから、2PE 配糖体化酵素は花弁展開初期に香気前駆体 2PEG を生合成し貯蔵することで、花弁展開後半の 2PE 発散に寄与していることが示唆された。

1) Hayashi S, *et al.*, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 7005–7013

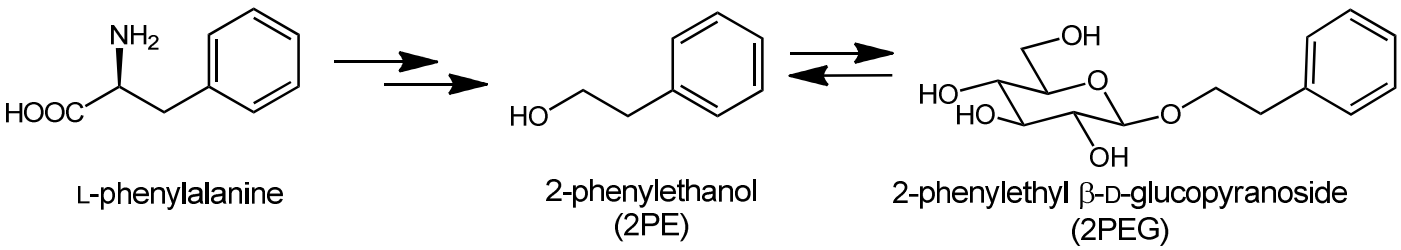


Figure. 2PE biosynthesis from L-Phe and 2PEG

Rose, 2-Phenylethanol, Glucosyltransferase

講演番号：3A31a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ A校舎31会場

天然変性タンパク質CP12によるGAPDH活性調節の分子メカニズムの解明

Structure Basis for the Regulation of GAPDH Activity via the Intrinsically Disordered Protein CP12

○松村浩由、甲斐章寛、田茂井政宏[1]、和田野晃[2]、井上豪、重岡成[1]（阪大院・工、[1]近大・農、[2]羽衣国際大・人間生活学部）

○Hiroyoshi Matsumura, Akihiro Kai, Masahiro Tamoi[1], Akira Wadano[2], Tsuyoshi Inoue, Shigeoka Shigeru[1] (Handai, [1]Kindai, [2]Hagoromokokusaidai)

【目的】最近、単独では特定の立体構造を有さない天然変性タンパク質(Intrinsically disordered protein; IDP)がほぼ全ての生物に普遍的に存在し、様々な生体機能や疾患に関与していることが明らかになっている。本研究で扱うCP12は光合成生物に存在するアミノ酸残基数約80のIDPであり、光合成炭酸固定経路（カルビンサイクル）を構成している二種の酵素(NADP$^+$-glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase; GAPDH, Phosphoribulokinase; PRK)に光強度依存的（レドックス、NADP(H)/NAD(H)濃度依存的）に結合し、これらの酵素活性を同時に調節することによって、カルビンサイクル全体の調節に関連することが知られている。CP12の両酵素への結合は逐次的であり、まずGAPDHに結合しその後GAPDH-CP12複合体がPRKに結合する。本研究では、GAPDH-CP12形成メカニズム、CP12によるGAPDH活性の阻害メカニズム、CP12の逐次的結合メカニズムを解明するため、GAPDH-CP12複合体の構造研究に取り組んだ。

【方法】藍藻*Synechococcus elongates*由来GAPDHとCP12をそれぞれ発現・精製し、これらのタンパク質を混合して結晶化を行い、GAPDH-CP12-NAD複合体の立体構造をＸ線構造解析によって解明した。さらに構造情報を元に部位特異的変異体を作成し、CP12の分子メカニズムを解明した(Structure, in press)。

【結果】GAPDH-CP12-NADの三者複合体の立体構造を2.2Å分解能で解析することに成功した。CP12のC末端部分（Thr53-Asp75）のみがGAPDHと結合して立体構造を形成し、その他の部分は特定の立体構造を持たないことが判明した。また、CP12は、ジスルフィド結合を有し、同時にNADと結合していたことから、CP12の結合に酸化条件とNADの存在が必須である理由が解明できた。そして、GAPDHの基質結合部位はCP12によってふさがれ、GAPDHは基質に結合できない状態にあった。これにより、CP12によるGAPDH活性の阻害メカニズムが示された。また、GAPDH-CP12複合体の分子表面には非常に大きな酸性アミノ酸が集中した領域(Acidic patch)が形成されていることが分かった。これらの酸性アミノ酸を変異してPRKとの結合を測定したところその結合が阻害されたことから、これらの酸性アミノ酸がPRKとの結合に関わっていることが明らかとなった。よって、CP12の逐次的結合には、GAPDHへの結合によって誘起されたAcidic patchが関わっていることが新たに示唆された。

Intrinsically disordered protein, Calvin cycle regulation, Sequential assembly

講演番号：3A31a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ A校舎31会場

DUF26タンパク質Gnk2の構造とマンノース認識

Structure and mannose recognition of Gnk2, a member of DUF26 protein family

○宮川拓也[1]、澤野頼子[1]、宮園健一[1]、秦野賢一[2]、田之倉 優[1]（[1]東大院・農生科、[2]群馬大・工）
○Takuya Miyakawa[1], Yoriko Sawano[1], Ken-ichi Miyazono[1], Ken-ichi Hatano[2], Masaru Tanokura[1]
([1]University of Tokyo,[2]Gunma University)

植物は病原菌の感染に応答した様々な生体防御機構を備えており、その 1 つの強力な機構として抗菌性の低分子化合物やタンパク質を合成する。イチョウの種子に含まれる分泌タンパク質 Gnk2 は酵母や *Fusarium oxysporum* 等の植物病原性糸状菌の増殖を阻害する抗真菌性のタンパク質であり、その C 末端領域（56−108 残基、全長 108 残基）は DUF26 という機能未知ドメインとして特徴づけられている。DUF26 を有するタンパク質（DUF26 タンパク質）は Gnk2 に限らず、植物において広く保存されている。例えば、シロイヌナズナの受容体型キナーゼ CRK はその細胞外領域に 1−4 コピーの DUF26 をもち、植物病原菌の感染による過敏感反応の誘導に関わることが知られている。このように DUF26 タンパク質は植物の生体防御応答に関与することが指摘されているが、その分子機能は十分に解明されていない。

本研究では、DUF26タンパク質の1つであるGnk2に着目し、X線結晶解析による構造決定と分子機能の解析をおこなった。Gnk2は、DUF26領域の構造を核にしてN末端領域（1−55残基）がそれを取り囲んで配置し、1つのドメイン構造を形成していた。その構造は、5つのβストランドからなる逆平行βシートと2つのαヘリックスにより構成されたα+βフォールドであり、他の抗真菌タンパク質のフォールドとは異なっていた。一方、Gnk2の分子機能を解析する手掛かりとしてその抗真菌活性に着目し、酵母の細胞表層成分との相互作用を検討した。NMRを利用した相互作用スクリーニングにより、Gnk2が酵母の細胞表層成分の中でマンナンを認識することが示唆された。この結果に基づき、種々の単糖について相互作用解析をおこない、Gnk2がグループIIIレクチンと同様の認識パターンでマンノース等の単糖と相互作用することを明らかにした。また、マンノースの添加によるGnk2のNMRシグナルの摂動情報からマンノース認識の構造基盤も同定した。これらの結果は、DUF26タンパク質の構造と分子機能に関する初めての知見である。さらに我々は、Gnk2変異体や酵母の細胞表層マンナン合成酵素欠損体を用いた増殖阻害実験、およびマンナンの添加によるGnk2の抗真菌活性の阻害実験をおこない、Gnk2のマンノース認識と抗真菌活性の相関を確認した。

antifungal protein, X-ray crystallography, NMR

講演番号:3A31a09
講演日時、会場:3月24日10:38～ A校舎31会場

植物細胞におけるアラビノガラクタンタンパク質（AGP）の翻訳後修飾の解析

Analysis of post-translational modifications of arabinogalactan protein in plant cell

○津野 雄平[1]、松岡 健[1,2,3]（[1]九大・農、[2]九大院農、[3]九大・生環セ）
○Yuhei Tsuno, Ken Matsuoka (Kyushu Univ.)

【目的】アラビノガラクタンタンパク質（AGP）は主に植物の細胞表面に存在し、発生や生長などに重要な役割を果たすことが知られている。AGPのプロリン残基の多くはプロリン水酸化酵素（P4H）によって水酸化され、生じたヒドロキシプロリン残基にはさらにアラビノガラクタン糖鎖が付加される。P4Hの一分子種であるNtP4H2.2と相互作用するタンパク質をタバコにおいて探索したところ、出芽酵母においてGPIアンカーの脂質リモデリングに関わるPer1のホモログ（NtPer1）が見出された（森口亮、松岡健、第52回日本植物生理学会講演要旨、2011）。NtPer1は酵母の*per1*変異体を相補したことから、植物においてGPIアンカーの脂質リモデリングに関わることが示唆された。この知見を踏まえ、本研究ではタバコ培養細胞由来のAGPを用いて、糖鎖修飾とGPIアンカーの脂質リモデリングの関連性を解析することを目的としている。
【方法】タバコ培養細胞BY-2のcDNAライブラリからAGP遺伝子1種のcDNAをクローニングした。このcDNAにコードされるタンパク質は、小胞体膜透過に関わるシグナルペプチド、アラビノガラクタン糖鎖付加配列とそれに引き続くGPIアンカー付加シグナルから構成されていた。これのシグナルペプチドと糖鎖付加配列の間に、蛍光変換タンパク質である単量体Kikume Green-Red（mKikGR）遺伝子を融合したコンストラクトを作製し、*Agrobacterium*法によりタバコBY-2細胞に導入した。蛍光顕微鏡での観察と細胞分画およびSDS-PAGEにより、形質転換細胞におけるmKikGR-AGPの細胞内局在やその大きさの解析を行った。
【結果】蛍光顕微鏡下での形質転換体の観察ではmKikGR-AGPの明瞭な局在部位の決定には至らなかった。細胞分画後の各画分を泳動し蛍光イメージアナライザで解析したところ、細胞壁画分および可溶性画分に、37-50 kDaの大きさの蛍光性ポリペプチドが確認された。また、マイクロソーム画分などからも同じ程度の分子量のポリペプチドが検出された。このシグナルは、紫光により赤色蛍光を示すものに変換されたため、mKikGR-AGPに由来すると考えられた。現在、anti-KikGR抗体を用いたWesternブロッティングにより更なる確認を進めると共に、蛍光変換を利用して輸送過程にある分子の同定を開始しており、その結果についても議論したい。

arabinogalactan protein (AGP), O-glycosylation, GPI anchor

講演番号：3A31a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ A校舎31会場

イネ由来の抗菌性蛋白質でイネの病気を防ぐ：イネディフェンシン蛋白質の利用可能性の検討

The availability of a defensin protein of rice as an antifungal agent

○提箸祥幸、高久洋暁[1]、矢頭治（農研機構・中央農研、[1]新潟薬大・応生科）
○Yoshiyuki Sagehashi, Hiroaki Takaku[1], Osamu Yatou (NARC, [1]NUPALS)

【目的】ディフェンシンは抗菌性蛋白質として多くの生物種に存在することが報告されている。植物においてディフェンシンは主に病原菌に対する防御機構の重要な役割を担っており、様々な植物から多くのディフェンシン蛋白質及びその遺伝子が取得されている。我々はイネのディフェンシン蛋白質に注目し、蛋白質レベルでの解析を行うことで、植物由来の抗菌性成分としての特性と利用可能性を調査することを目的として研究を行ってきた。これまでに、イネのディフェンシン蛋白質のひとつであるOsAFP1 (*Oryza sativa* antifungal peptide-1)が、イネいもち病菌をはじめとする複数のイネの病原糸状菌に対して強い抗菌活性を有し、加えてヒト病原菌の*Candida albicans*にも抗菌活性を示すことを明らかにしている。

本大会では、OsAFP1の将来的な実用化を目指し、実際にOsAFP1の使用によりイネを病原菌の感染から防ぐことができるのか、イネいもち病菌を用いて実証を行った。加えて、より汎用性の高い抗菌性物質とすることを目的に、OsAFP1の縮小化を試みた。

【方法・結果】解析に用いたイネのディフェンシンOsAFP1蛋白質は、大腸菌を宿主として発現させ、精製した。イネ葉身にOsAFP1を塗布した後、イネいもち病菌を噴霧接種したところ、5日後に無塗布の葉ではイネいもち病菌の感染による病斑が形成されたが、OsAFP1処理区では形成されなかった。次に、OsAFP1がイネいもち病菌のイネへの感染を抑える機構を調べるため、葉鞘裏面を用いてOsAFP1がイネいもち病菌にどのように作用するのか調査を行った。イネ葉鞘にOsAFP1処理をし、イネいもち病菌接種24時間後の葉鞘裏面を顕微鏡観察した。その結果、OsAFP1の処理濃度依存的に、イネいもち病菌の付着器の形成が抑制されていた。このことから、OsAFP1の処理により、葉身でいもち病菌の感染力が低下し、病斑の出現が抑えられたことが推測された。イネのディフェンシンOsAFP1蛋白質を利用することで、イネいもち病菌などのイネ病原菌からイネを守ることができる可能性がある。

このような特徴を持つOsAFP1の更なる利用可能性を探索することを目的として、OsAFP1の分子内の抗菌活性領域の特定を行ったところ、分子内の2か所に活性領域が存在することを発見した。さらに、これらの領域を10アミノ酸残基まで縮小化した結果、OsAFP1自体よりも高い抗菌活性強度を持つペプチドの創出に成功した。このペプチドはイネいもち病菌のみでなく、他のイネ病原菌やヒト病原菌に対しても抗菌活性を有していた。OsAFP1由来のこのペプチドは、OsAFP1と比較して安定性が高く、市販を目的とした経済的な化学合成も可能であると考えられることから、今後様々な分野において汎用性の高い抗菌性ペプチドとしての利用が期待できる。

defensin, *Oryza sativa*, *Magnaporthe grisea*

講演番号:3A31a11
講演日時、会場:3月24日11:10～ A校舎31会場

酵母*Candida albicans*における植物ディフェンシンの作用メカニズム解析

The mechanism of action of the defensin in *Candida albicans*

○小黒　芳史、大越　映澄、山崎　晴丈、梨本　正之、高木　正道、高久　洋暁（新潟薬大・応生科）

○Yoshifumi Oguro, Hasumi Ookoshi, Harutake Yamazaki, Masayuki Nashimoto, Masamichi Takagi, Hiroaki Takaku

(Applied Life Science,Niigata Univ.of Pharmacy and Applied Life Science)

植物には抗菌性蛋白質による生体防御機構が存在する。我々は以前の大会で植物抗菌性蛋白質の1つであるカラシナ由来ディフェンシンBJ-AFP1が日和見感染菌*Candida albicans*に対し高い抗菌作用を示し、その際、細胞膜脱分極化、活性酸素種(ROS)の蓄積が起こり、細胞表層上に存在するグルコシルセラミドが重要な因子あることを報告した。本大会では、酵母を用いて発現・精製したBJ-AFP1を*C. albicans*に作用させた後の経時的な細胞の応答について報告する。また、*C. albicans*のBJ-AFP1感受性とグルコシルセラミドの構造の関係についても報告する。

酵母*C. albicans*の細胞にBJ-AFP1を添加し、15分後には、細胞膜脱分極およびROSの蓄積が起こっていることが観察され、さらに時間経過と共にその脱分極化の程度及びROS蓄積量は増加した。また、脱分極化を抑制するカルボニルシアニド3-クロロフェニルヒドラゾン(CCCP)、ROSを還元作用により除去するアスコルビン酸を利用して、検討を行ったところ、BJ-AFP1添加後に細胞膜の脱分極化が起こり、その脱分極がROS産生を誘導し、生育阻害を引き起こしていることが示唆された。

次に、BJ-AFP1感受性の重要な因子であるグルコシルセラミドの構造に注目した。ヒト細胞および一部の真菌はグルコシルセラミドを有し、真菌はBJ-AFP1感受性であるが、ヒト細胞は非感受性を示す。そこで、それぞれのグルコシルセラミドの構造を比較したところ、真菌のグルコシルセラミドは、ヒト細胞のグルコシルセラミドと異なり、長鎖塩基側鎖の9番目の炭素にメチル基が付加されていた。そこで、長鎖塩基側鎖の9番目の炭素にメチル基が付加されていないグルコシルセラミドを持つ*C. albicans*変異株を作製し、BJ-AFP1感受性を検討したところ、BJ-AFP1低感受性を示した。このことから、BJ-AFP1はグルコシルセラミドの長鎖塩基側鎖の9番目の炭素に付加されたメチル基を認識していると考えられる。

antifungal activity, Defensin, *Candida albicans*

講演番号：3A31a12
講演日時、会場：3月24日11:21～ A校舎31会場

ダイズ子葉細胞におけるジスルフィド結合を介したβ - コングリシニン複合体の形成

Formation of disulfide-linked complexes of soybean β-conglycinin in cotyledon cell

○和田濵 裕之、岩崎健佑、石本政男[1,2]、西澤けいと[2]、裏出 令子
（京大院・農、[1]農生資研、[2]北農研）
○Hiroyuki Wadahama, Kensuke Iwasaki, Masao Ishimoto[1], Keito Nishizawa[2], Reiko Urade (Kyoto Univ., [1]NIAS, [2] NARCH)

【目的】還元剤含有緩衝液を用いた研究から、ダイズ種子貯蔵タンパク質β-コングリシニン(7S)は非共有的に会合した3量体として貯蔵液胞に蓄積するとされてきた。しかし、我々はジスルフィド結合の還元が起こらない条件で解析することにより、ダイズ種子中の7Sのαサブユニットおよびα'サブユニットの約50%が分子間ジスルフィド結合によりサブユニット同士で、あるいは他の貯蔵タンパク質であるP34と結合すること、7Sの一部が6量体以上の複合体として存在することを明らかにした。本研究では、子葉細胞におけるこれらの複合体の形成機構を明らかにすることを目的として、複合体のサイズと分子間ジスルフィド結合形成との関係を検討した。
【方法】野生型ダイズ、11S欠損およびP34欠損ダイズ、プロテインジスルフィドイソメラーゼファミリーGmPDIL-1ノックダウンダイズのダイズ子葉から、還元あるいは非還元条件下でタンパク質を抽出し、SDS-PAGEおよび二次元電気泳動（Blue Native-PAGE/SDS-PAGE）で分離した。プロ型αとプロ型α'、 全α'および11Sは、ウエスタンブロット法により検出した。GmPDIL-1ノックダウンダイズは、GmPDIL-1-siRNAを発現させる遺伝子組換えにより作出した。
【結果】αおよびα'はプロ配列を有するプロ型タンパク質として生合成され、立体構造形成後プロ配列が切断され成熟型タンパク質になる。プロ型の段階でα/α'-α/α'とα/α'-P34の分子間S-S結合が形成されること、およびプロ配列内の４個のシステイン残基は分子内ジスルフィド結合を形成していることを明らかにした。タンパク質のジスルフィド結合形成を触媒するGmPDIL-1をノックダウンした種子においても、分子間ジスルフィド結合は形成された。7Sの3量体が会合して6量体となる低塩濃度下での超遠心分析により、非還元条件下で調製した7Sの一部は6量体より大きなサイズの複合体として存在することが明らかとなった。そこで、複合体サイズとα、α'、P34間のジスルフィド結合との関係を二次元電気泳動法により解析した。ジスルフィド結合したα/α'を含まない複合体およびP34とジスルフィド結合したα/α'を含む複合体の大部分は480 kDの6量体として存在した。一方、α/α'間でジスルフィド結合したα/α'を含む7Sは720 kD以上の複合体として存在することが明らかとなり、7Sの6量体間でα/α'間ジスルフィド結合が形成されていることが示唆された。P34および11S欠損ダイズにおいても、720 kD 以上の複合体は形成された。また、11Sは6量体(～400 kD)として存在するとされてきたが、非還元条件下では一部が720kD以上の複合体として存在することを見いだした。さらに、11Sの720kD以上の複合体は7S欠損ダイズでは形成されないことから、7Sは11Sとも複合体を形成することが示唆された。

β-conglycinin, disulfide bond, soybean

講演番号：3A31a13
講演日時、会場：3月24日11:32～ A校舎31会場

米糠由来 GDSL モチーフカルボキシエステラーゼの同定および酵素特性

Identification of a GDSL-motif carboxylester hydrolase from rice bran (*Oryza sativa* L.)

○濱田 茂樹、長谷川 陽一、鈴木 保宏（(独）農研機構・作物研）
○Shigeki Hamada, Yoichi Hasegawa, Yasuhiro Suzuki (NARO, Natl. Inst. Crop Sci.)

【目的】米糠中には米油をはじめ、フェルラ酸と植物性ステロールがエステル結合した γ-オリザノールなど、食品や機能性成分として重要なエステル化合物が多く存在する。また、イネ科植物ではジフェルラ酸を介した架橋による細胞壁多糖ネットワーク形成のように、エステル結合は細胞レベルでも重要な役割を果たしている。イネゲノム中には、数多くのリパーゼやエステラーゼ遺伝子が存在することが知られているが、米糠中に存在するリパーゼやエステラーゼで同定されたものはほとんど無く、未知な部分が多い。そこで、米糠中のエステラーゼを同定し、その酵素化学的諸性質を検討することを目的とした。
【方法】品種は、コシヒカリを用いた。家庭用精米機によって調製した米糠 200 g に対して 1 リットルの抽出用緩衝液で摩砕し、その上清を粗酵素液としてイオン交換や疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過等を用いて精製を行った。なお、Native- PAGE や酵素活性の測定には、酢酸 1-ナフチルを基質として用いた。精製酵素を SDS-PAGE に供し、CBB染色によって検出したタンパク質バンドをトリプシン消化し、MALDI-TOF-MS によるペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 解析よってタンパク質を特定した。さらに、精製酵素を用いて、至適 pH 、至適温度等の酵素学的諸性質を解析すると共に、基質特異性を検討した。
【結果】米糠からの粗酵素液を Native-PAGE に供した結果、エステラーゼ活性を有する複数のタンパク質が検出された。その中から、最もエステラーゼ活性の強かった活性バンドを指標に、酵素精製を進めた。5 段階のカラムクロマトグラフィーによって、200 g の米糠から、約 0.2 mg の精製酵素が得られ、最終比活性は、45.4 U/mg、精製度は約 240 倍だった。精製酵素を SDS-PAGE に供したところ、ほぼ単一にまで精製され、分子量は約 25 kDaであった (OsEST1)。PMF 解析の結果、OsEST1 遺伝子は、238 アミノ酸残基をコードしており、保存される活性残基から、GDSL モチーフエステラーゼに属した。また、イネや他の植物由来の GDSL エステラーゼとの一次構造の比較から、乾燥応答やクチクラ形成に関与するエステラーゼ群に分類された。精製酵素は、至適 pH、至適温度がそれぞれ pH 8.0-8.5、45℃を示した。また、酢酸 1-ナフチルに対する *K*m および *V*max は、172 μM、63.7 μmol/min/mg protein であった。さらに基質特異性の解析から、メチルエステルには作用するが、側鎖が長くなると極端に活性が低下し、トリグリセロールには作用しないことが分かった。

Oryza sativa, Esterase, Enzyme purification

講演番号：3A31a14
講演日時、会場：3月24日11:43～ A校舎31会場

高温登熟障害におけるイネ胚乳の品質低下は登熟中の未熟種子のATP量に依存する

Shortage of ATP in the developing rice endosperm is correlated with reduced grain quality under high-temperature stress

八重島充弘[1]　シャク高志[2]　草野博彰[1]　河本健正[1]　大沼万里子[1]　廣政智子[1]　平井望央[1]　松永拓也[1]　田代涼夏[1]　佐々木忠将[1]　○島田浩章[1,2]（東京理科大・生物工[1]、東京理科大・RNA研究センター[2]）

Mitsuhiro Yaeshima, Kao-Chih She, Hiroaki Kusano, Takemasa Koumoto, Mariko Ohnuma, Tomoko Hiromasa, Mio Hirai, Takuya Matsunaga, Ryouka Tashiro, Tadamasa Sasaki, ○Hiroaki Shimada (Dept. Biol. Sci. & Technol, Tokyo Univ. of Science)

【目的】イネ種子は登熟期に高温環境にさらされたとき、貯蔵デンプンの生合成が不十分となり、芯白粒で粉質化した胚乳が生じる。このような高温登熟障害が起こる原因を探るために、高温ストレスで未熟種子中の発現量の変化する遺伝子を調べたところ、ATP合成酵素遺伝子群の発現量の低下が認められた。そこで、未熟種子におけるATP量が高温ストレスにより、どのように変化するかを調べた。また、ATP合成酵素に関わる遺伝子の発現を変化させた形質転換体を作製し、その表現型を調べた。

【方法】開花後５日目から昼温33℃、夜温28℃の高温条件で登熟させたイネ未熟種子を経時的に採取してこれに含まれるATP量を定量し、常温条件（昼温28℃、夜温25℃）で登熟させた場合と比較した。また、F1-ATPase β サブユニット遺伝子に対するRNAi遺伝子を導入した形質転換体、およびこの遺伝子を未熟種子特異的なプロモーターで過剰発現させた形質転換体を作製し、これらに生じた種子の形態を調べた。

【結果】様々な品種のイネについて、登熟期の未熟種子のATP量を調べたところ、いずれも高温ストレスにより登熟期を通じてATP量が顕著に減少することがわかった。ATP量の減少が少ない品種は高温障害の度合いが低かった。このことから、高温登熟障害とATPの生合成量の減少の間に相関があることが明らかとなった。高温条件で登熟した未熟種子では、ATPase遺伝子の中でもミトコンドリアのF1-ATPase β サブユニットをコードする遺伝子の発現が特に大きく低下することが分かった。そこで、F1-ATPase β 遺伝子に対する RNAi 遺伝子を作成し、イネに導入して形質転換体を得た。この形質転換イネは、栄養生長の段階では野生型のイネに比べ大きな違いは観察されなかったが、常温環境で登熟させた種子でも、高温登熟障害と類似の表現型が現れ、芯白粒の胚乳が生じた。一方、F1-ATPase β 遺伝子を過剰発現させた形質転換体では、高温登熟障害の緩和が観察された。これらの結果から、F1-ATPase は胚乳の品質に関わる重要な役割を担っていることが強く示唆された。

rice endosperm, high-temperature stress, ATPase gene

講演番号：3A31a15
講演日時、会場：3月24日11:54～ A校舎31会場

蛋白質酸化還元制御はイネ種子貯蔵蛋白質プロラミンの分子進化に影響した

Protein redox regulation influenced the molecular evolution of rice seed storage protein prolamin

○川越　靖、恩田　弥生[1]（生資研・植、[1]山形大・農）
○Yasushi Kawagoe, Yayoi Onda[1] (NIAS, [1]Yamagata Univ.)

【目的】イネ種子貯蔵蛋白質プロラミンは、システイン残基の多いCys-rich プロラミンとシステイン残基を含まないCys-poor プロラミンに分けられる。Cys-rich プロラミンは２Sアルブミンファミリーで保存されたシステイン残基を含み、これらのシステイン残基は胚乳組織の蛋白質顆粒でプロラミン分子間のジスルフィド架橋形成に関与する。他方、Cys-poor プロラミンはシステイン残基を含まないため、遺伝子の起源や蛋白質顆粒に輸送・集積される分子機構は不明な点が多い。そこで、ゲノム解読で同定されたプロラミン遺伝子ファミリーの系統関係を明らかにし、Cys-poor プロラミンの起源と遺伝子進化を促進した要因について考察することを目的とした。
【方法】イネ（日本晴）のゲノム解読で同定されたCys-rich プロラミン(Os03g0766100, Os03g0766250, Os06g0507200, Os07g0206400, Os07g0206500, Os11g0535100, Os12g0269101, Os12g0269200)、 Cys-poor プロラミン(Os05g0328800, Os05g0329100, Os05g0329300, Os05g0329400, Os05g0329700, Os05g0330600, Os05g0331800, Os05g0331550, Os05g0332000, Os07g0219300, Os07g0219400, Os07g0220050)のアミノ酸配列をCLUSTALWで比較し、MEGA (version 4)を用いて系統樹を作製した。
【結果】システイン残基を含まないCys-poorプロラミンは第５染色体に９遺伝子、第７染色体に３遺伝子が確認された。これらの１２個のCys-poor プロラミンは、4 個のシステイン残基を含むCys-rich プロラミン（Os07g0206400, Os07g0206500）と最も近い系統関係が認められた。系統樹からCys-poor プロラミン遺伝子群は、Os07g0206400, Os07g0206500のようなシステイン残基を４個含んだCys-rich プロラミンを起源とし、４つのシステイン残基で変異が蓄積したと推察される。興味深いことに、これら４つのシステイン残基はCys-rich プロラミンで保存された部位に含まれ、その周辺のアミノ酸配列は比較的良く保存されている。それでは、Cys-poor プロラミンの遺伝子進化の過程で、Cys-rich プロラミンのシステイン残基を選択的に減少させた選択圧は何であったのか。そのような選択圧の有力な候補として、胚乳組織での貯蔵蛋白質の酸化還元制御が考えられる。小胞体内腔でのジスルフィド架橋形成で、一連の酸化還元反応の電子受容体は酸素であり、副産物として過酸化水素が発生する。Cys-poor プロラミンの遺伝子進化の結果、過酸化水素の発生を伴わずに大量のプロラミンの貯蔵が可能になったと推察される。このような形質を獲得したイネ（変異体）は、自然界での生存競争で有利なため自然選抜された可能性と、米が優良な形質を示すため人為的に選抜された可能性が考えられる。栽培イネの近縁種のプロラミン遺伝子の進化を解析することによって、蛋白質の酸化還元制御とプロラミンの分子進化の関係がさらに明らかになると期待される。

Redox regulation, rice prolamin, molecular evolution

講演番号：3A31p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ A校舎31会場

タイトル　赤色光は苔類ゼニゴケの細胞分裂を制御する

Title　Red light signaling regulates the cell division in *Marchantia polymorpha* L.

〇井上　佳祐、中村　衣里、保坂　将志、石崎　公庸、西浜　竜一、河内　孝之（京大生命・統合生命）

〇Keisuke Inoue, Eri Nakamura, Masashi Hosaka, Kimitsune Ishizaki, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi (Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ.)

フィトクロムは植物の主要な光受容体の1つである。本研究では基部陸上植物である苔類ゼニゴケを用いて、フィトクロムを介する光応答の制御メカニズムの原形と進化を解明することを目的に、これまでにゼニゴケフィトクロム遺伝子 (*MpPHY*) を単離し、*Mp*phyが1分子種しか存在しないこと、光可逆性を備えたフィトクロム分子であることを報告した。さらに、*Mp*phyの光可逆性に重要なTyr残基をHis残基に置換し、生体内で恒常的に活性型となると予想される点変異を導入した*Mp*phyY241H発現株およびRNA干渉法による*Mp*PHYノックダウン株を用いた解析により、胞子発芽後の細胞分裂や葉状体切断面の再生が活性型*Mp*phyによって促進されることを見出した。また、ヒストンH2Bサブユニットに蛍光タンパク質を融合させることで染色体動態を可視化した株を作出し、分裂組織の形成や細胞分裂頻度の増加が赤色光依存的であることを確認した。今回、ゼニゴケにおける細胞周期関連遺伝子を探索し、それらの発現量の赤色光依存的な変動について解析した。暗所で3日間順応させた植物体を赤色光下に移行し、細胞周期関連遺伝子の発現量を経時的に解析したところ、G1/S期サイクリンである*CYCD*の発現量が赤色光照射後2時間以内に増加し、G2/M期サイクリンである*CYCB*の発現量が照射後6時間以降に増加することが明らかとなった。さらに、赤色光照射後4時間後に植物体を遠赤色光下に移して培養すると、*CYCB*の発現量は赤色光下と同様に増加するのに対し、*CYCD*の発現量は遠赤色光依存的に減少することが示された。これらの結果から、*CYCD*の発現量が赤色光によって直接制御されており、ゼニゴケは赤色光に応答して*CYCD*の発現量を増加させることで細胞分裂を制御していることが示唆された。

phytochrome, cell division, liverwort

講演番号：3A31p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ A校舎31会場

青色光受容体フォトトロピンは苔類ゼニゴケの葉状体背腹性決定を制御する

Blue light photoreceptor, phototropin, controls the dorsoventral patterning in *Marchantia Polymorpha* L.

○芦原 悠紀子[1]、小松 愛乃[2]、石崎 公庸[2]、西浜 竜一[2]、河内 孝之[1, 2]（[1]京大・農・応用生命、[2]京大生命・統合生命）

○Yukiko Ashihara[1], Aino Komatsu[2], Kimitsune Ishizaki[2], Ryuichi Nishihama[2], Takayuki Kohchi[1, 2] ([1]Fac. of Agric., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Biostudies, Kyoto Univ.)

青色光受容体フォトトロピンは、種子植物において葉緑体光定位運動、光屈性、気孔の開口などに関わっており、植物光合成の効率化に寄与している。我々は、陸上植物の青色光シグナル伝達における基本的な分子機構の解明を目的とし、現生陸上植物の基部に位置する苔類ゼニゴケをモデルとして、青色光応答の解析を行った。ゼニゴケにおける青色光応答として原糸体の光屈性や偏光屈性、葉緑体光定位運動が観察されている。本研究ではゼニゴケ無性芽からの葉状体発生における背腹性決定について、光の影響を解析した。ゼニゴケの無性芽は杯状体内では背腹性を持たないが、成長を開始した後に、気室孔を持つ背側と仮根及び鱗片葉を持つ腹側を形成し、背腹性を持つ葉状体へと成長する。背腹性形成への光の影響を明らかにするため、無性芽に対して上方または下方から赤色光や青色光を照射して成長を観察した。赤色光照射条件では、葉状体は扁平かつ平坦に成長しつつ、光照射方向に関わらず重力優勢的に上側に背側、下側に腹側が形成された。一方、青色光照射条件では葉状体が細長く光源方向に伸長し（正の光屈性）、光照射側に背側が形成された。さらに、赤色光を上方から照射、青色光を下方から照射したところ、葉状体は扁平かつ平坦に育ちつつ、青色光照射側に背側を形成した。これらの結果より、ゼニゴケの葉状体発生において、背腹性決定には重力と青色光が関与していること、両者の方向が異なる時には重力よりも青色光優勢的に背腹性が決定されることが示された。これまでに、ゼニゴケでは葉緑体光定位運動や原糸体の光屈性に関与する光受容体がフォトトロピン（*Mp*phot）であることが示されている。葉状体の背腹性決定におけるフォトトロピンの関与を解析するため、*MpPHOT* 変異体に対して下方から青色光を照射し、背腹性を観察した。*MpPHOT* 変異体は青色光光源方向に関わらず、重力優勢的に背腹性が決定された。よって、ゼニゴケの青色光依存的な背腹性決定を制御する光受容体は *Mp*phot であることが示された。

Blue light response, Phototropin, Marchantia polymorpha

講演番号：3A31p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ A校舎31会場

イネのJA応答性bHLH型転写因子RERJ1と相互作用するJA情報伝達因子の探索

Exploring interactors of the JA-inductive bHLH transcription factor RERJ1 with JA signaling components in rice

○Ioana Valea[1,2]、岡田憲典[1]、宮本皓司[1,3]、清水崇史[1]、Michael Riemann[2]、Peter Nick[2]、野尻秀昭[1]、山根久和[1]（[1]東大生物工学セ、[2]カールスルーエ工科大学、[3]日本学術振興会特別研究員DC）

○Ioana Valea[1,2], Kazunori Okada[1], Koji Miyamoto[1,3], Takafumi Shimizu[1], Michael Riemann[2], Peter Nick[2], Hideaki Nojiri[1], Hisakazu Yamane[1]([1]BRC, The University of Tokyo, [2]Karlsruhe Institute of Technology, [3]Research Fellow of the JSPS)

ジャスモン酸（JA）は、病原体の感染、傷害、乾燥など様々なストレスにより誘導的に合成される植物ホルモンであり、植物の防御機構において重要な役割を担っている。我々はこれまでにJA応答性のbHLH型転写因子をコードする*RERJ1*遺伝子の解析を進めてきた。これまでに、*RERJ1* promoter-GUS 形質転換体を用いた発現様式の解析およびトランスクリプトーム解析などから、RERJ1が虫害を含む傷害部位におけるJA蓄積に応じて一過的に発現し、病虫害抵抗性遺伝子の発現誘導に関与することを報告した。更なる解析の結果、興味深いことにJA情報伝達において転写活性化因子の抑制に働くJAZファミリータンパク質の遺伝子発現が、傷害処理後の*rerj1-tos17*変異体において顕著に低下していることを新たに見いだした。シロイヌナズナでは、JA情報伝達系で中心的な役割を果たすbHLH型転写因子MYC２によりJA依存的に*JAZ*遺伝子群の発現誘導が起るが、通常MYC2とJAZが相互作用することでJA応答遺伝子の発現が抑制されている。これらのことから、RERJ1がシロイヌナズナのMYC2を介したJA情報伝達と同様な機構により JA応答性遺伝子の発現制御を行っている可能性が示唆された。そこで本研究では、酵母two-hybrid（Y2H）法を用いることで、RERJ1とJA情報伝達系で働く既知のタンパク質因子群との相互作用を調べると共に、新たな相互作用因子のスクリーニングを行い、イネのJA情報伝達におけるRERJ1の役割を明らかにすることを目的とした。

RERJ1は非常に強い転写活性化能を保持している。そのため、Y2H法においてbaitタンパク質として発現させた場合それだけでレポーターの発現を誘導し、preyタンパク質との相互作用を検討するに至らなかった。そこで、転写活性化能を付与するpreyベクター側にRERJ1を組み込み、baitベクター側にJAZを導入した後にそれらの相互作用を調べたところ、イネJAZタンパク質とRERJ1との相互作用が認められた。次に、イネMYC2オルソログとRERJ1との相互作用を調べるため、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)法を用いてイネ細胞内でのこれらの相互作用を検討することにした。現在、イネ培養細胞より調製したプロトプラストを用いる系とイネ植物体を用いる系を用いて、RERJ1とMYC２の相互作用を調べている。さらに、baitタンパク質の転写活性化能に依存しないCytoTrap Y2Hスクリーニングシステムを用い、RERJ1と相互作用する新たな因子の単離に向けて、JA処理後のイネ葉身を用いたcDNAライブラリーの作製を進めている。

jasmonic acid, yeast two-hybrid, bHLH transcription factor

講演番号：3A31p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ A校舎31会場

イネのジャスモン酸早期応答性bHLH型転写因子RERJ1のX線結晶構造解析に向けた精製

Purification of RERJ1, an early responsive transcription factor to jasmonic acid in *Oryza Sativa*

○河村　奈央子、岡田　憲典、野尻　秀昭、山根　久和（東大生物工学セ）
○Naoko Kawamura, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri, Hisakazu Yamane (Biotechnology Research Center, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo)

ジャスモン酸（JA）は、ストレス応答や成長調節、老化、形態形成などに関わる植物ホルモンである。我々は、イネにおいて傷害や乾燥ストレスによって発現誘導される JA 早期応答性遺伝子として *RERJ1* を同定した。RERJ1 は basic helix-loop-helix モチーフを持つ bHLH 型転写因子である。RERJ1 の転写が他のタンパク質の新規合成を介さずに JA 処理により誘導されることから、JA シグナル伝達上流で下流遺伝子の発現を制御していると考えられている。

シロイヌナズナでは、bHLH 型転写因子である MYC2 が JA シグナル伝達上流で下流遺伝子の発現制御を行うことが知られている。MYC2 はリプレッサータンパク質である JAZ との相互作用により定常時ではその転写活性化能が抑制されているが、JA 存在下ではユビキチン-プロテアソーム系による JAZ の分解によりその抑制が解除され、下流遺伝子の発現を誘導する。

一方、我々の最近の研究で、RERJ1 とイネ JAZ ホモログタンパク質の相互作用が yeast two-hybrid 法により見いだされた。このことは、RERJ1 がイネにおいてシロイヌナズナの MYC2 と同様な分子機構で JA シグナル伝達を制御する可能性を示唆している。しかし、RERJ1 と MYC2 の分子量やアミノ酸配列の相同性は大きく異なり、JA シグナル伝達の制御に重要な JAZ との結合様式も異なると考えられた。そこで本研究では、RERJ1 が JAZ を含む他の因子とどのように相互作用して下流遺伝子の発現調節を行うかを構造生物学的に解明することを目的として、まず RERJ1 の X 線結晶構造解析を行うこととした。本発表では結晶化に向けた精製について報告する。

過去の研究において、His タグおよび GST タグを付加した RERJ1 融合タンパク質の発現が大腸菌を用いて試みられたが、どちらの場合でもタンパク質が不溶化した。そこで、次に maltose binding protein (MBP)タグを用いた発現系を試すことにした。発現用ベクターには pMAL-c2x (Mew England BioLabs)を、発現ホストには *E. coli* BL21 (DE3)を用い、MBP-RERJ1 融合タンパク質を発現させたところ、これを可溶性画分に得ることに成功した。そこで、得られた可溶性画分をアミロースレジンによるアフィニティクロマトグラフィに供し MBP-RERJ1 を簡易精製したのち、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの精製手法でさらなる精製を試みた。その結果、アフィニティクロマトグラフィの溶出条件を検討することで一段階の精製で MBP-RERJ1 を高純度に精製することができた。しかし、動的光散乱の計測により分子の会合状態を調べたところ、MBP-RERJ1 が溶液中で凝集している可能性が示唆されたため、現在脱凝集する方法を検討している。また、MBP-RERJ1 をプロテアーゼ Factor Xa で処理することで MBP タグを切除し、精製 RERJ1 を単体として得るための条件検討も進めており、それについても報告する。

jasmonic acid, bHLH transcription factor, purification

講演番号：3A31p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ A校舎31会場

プラスチドシグナルに応答する新規転写因子の同定と解析

Identification and Characterization of transcription factors that respond to plastid signals

矢津　芙美子、安達　ふみ、稲葉　靖子、柿崎　智博[1]、○稲葉　丈人（宮崎大・IR推進機構、[1]農研機構・野茶研）

Fumiko Yazu, Fumi Adachi, Yasuko Ito-Inaba, Tomohiro Kakizaki[1], ○Takehito Inaba (Univ. of Miyazaki, [1]NIVTS)

【目的】葉緑体に代表される「プラスチド」は光合成細菌の共生により誕生したオルガネラである。3000種類以上と言われるプラスチドタンパク質はもともとプラスチドゲノムにコードされていたが、進化の過程で大部分が宿主の核ゲノムに移行してしまった。従って、正常なプラスチド形成には核及びプラスチドゲノムにコードされた遺伝子の協調的な発現や、プラスチド自身による核遺伝子発現のファインチューニングが必要である。プラスチドが核遺伝子発現を調節するために発するシグナル「プラスチドシグナル」は、プラスチドの状態と核遺伝子の発現を協調させる鍵因子である。現在までの知見では、抗生物質リンコマイシンや除草剤ノルフラゾン、あるいはプラスチドタンパク質輸送の阻害など、プラスチド機能を特異的に阻害する薬剤・変異により、人為的にプラスチドシグナルが誘発できると考えられている。こうした薬剤や変異体を用いた研究により、これまでにGLK1やABI4などの転写因子がこのシグナル伝達経路に関与していることが明らかになっているが、シグナル伝達経路の全容はほとんど分かっていない。そこで本研究は、プラスチドシグナル伝達に関わる新たな転写因子の探索と同定を目的として研究を行った。

【結果】まず、プラスチドタンパク質輸送が阻害された変異体*ppi2*を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、*ppi2*変異体で発現が抑制されている転写因子を同定した。さらに、プラスチドシグナルを誘発する薬剤処理に対するそれらの転写因子の発現応答をリアルタイムPCR法で調べた。その結果、B-BOXモチーフを持つ二つの転写因子が三種類の異なるプラスチドシグナル誘発処理に共通して応答することが明らかになった。これらの遺伝子とGFPとの融合遺伝子を作製してシロイヌナズナのプロトプラストで発現させたところ、GFPの蛍光が核で観察された。このことから、これらのタンパク質は核に局在することが明らかになった。また、プラスチドシグナル伝達に関わる因子を欠損した*gun1*変異体を用いた解析により、これらの転写因子の一つはGUN1による負の制御を受けることを明らかにした。さらに組織特異的発現を調べたところ、それらの遺伝子は主に地上部で発現していた。現在、突然変異体のスクリーニングとその表現型の解析も行っており、それらも併せて報告する。

plastid signal, transcription factor, plastid biogenesis

講演番号：3A31p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ A校舎31会場

シロイヌナズナ由来シグナルペプチドペプチダーゼ（AtSPP）の過剰発現株を用いた網羅的遺伝子発現解析

Global gene expression analysis of *Arabidopsis* signal peptide peptidase overexpressing plants.

○養田 直倫[1]、星 雅子[1]、田村 倫子[1,2]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]東農大応生科・栄養 [3]KAST）

○Naomichi Youda[1], Masako Hoshi, Tomoko Tamura[1,2], Yoshiro Ishimaru[1], Keiko Abe[1,3], Tomiko Asakura[1]（[1]Univ. of Tokyo, [2]Nutri. Sci., Tounodai [3]KAST）

【目的】シグナルペプチドペプチダーゼ（SPP）は複数回膜貫通型のアスパラギン酸プロテアーゼである。我々は植物においてSPPを初めて見出した。AtSPPは細胞オルガネラにおいては小胞体に局在し、組織においては多くの器官で発現が見られるが、特に花において強い発現が見られた。さらに茎頂における発現も確認されている。また、*AtSPP*ノックアウト株は致死となり、AtSPPが生存に必須であると言える。本研究では*AtSPP*過剰発現株と野生型Col-0株の花序におけるDNAマイクロアレイ解析によって、AtSPPの機能解明を目指した。

【方法】pZH2B/35SNosプラスミドにAtSPPcDNAを挿入したコンストラクトを作製し、Col-0株をアグロバクテリウムを用いて形質転換し、*AtSPP*過剰発現株を作製した。*AtSPP*過剰発現株と野生型Col-0株の成熟した花序からRNeasy Plant mini Kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。GeneChip® 3’ IVT Express Kit(AFFYMETRIX)を用いてArabidopsis Genome ATH1 Arrayでマイクロアレイ解析を行った。その後、DAVID Bioinformatics Resources 6.7を用いて、抽出した遺伝子がどのGO termに良く濃縮されているかを調べ、さらに抽出されたGO term間の繋がりをQuick GOで視覚化した。

【結果】まず、葉における*AtSPP*過剰発現株と野生型Col-0株の*AtSPP*の発現を半定量的RT-PCR法で比較したところ、*AtSPP*過剰発現株で強く発現していることが確認された。次に、成熟した花序における*AtSPP*過剰発現株と野生型Col-0株の遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイ法により解析した結果をDFW法で正規化すると、*AtSPP*過剰発現株群とCol-0株群は異なるクラスターを形成していた。両株の遺伝子発現プロファイル間に顕著な差異があると考えられた。Rank Product法で過剰発現株とCol-0株の二群間比較を行ったところ、False Discovery Rateが0.01未満の条件で、過剰発現株で発現が上昇した196遺伝子と減少した112遺伝子が抽出された。これらの遺伝子が良く濃縮されていたGO termを調べると、countが2以上、EASEが0.1以下の条件で、過剰発現株で発現が上昇した群では65個、発現が減少した群では30個であった。これらの結果からAtSPPの機能を推測した。

signal peptide peptidase, aspartic protease, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：3A31p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ A校舎31会場

アブラナ科植物の自家不和合反応を誘導するSRK/MLPK受容体複合体の活性化機構

Activation mechanism of SRK/MLPK receptor complex in *Brassica* self-incompatibility

○垣田満、村瀬浩司、浅野（下里）裕子、岩野恵、柴博史、磯貝彰、高山誠司（奈良先端大・バイオ）

○Mitsuru Kakita, Kohji Murase, HirokoAsano-Shimosato, Megumi Iwano, Hiroshi Shiba, Akira Isogai, Seiji Takayama (NAIST)

【背景と目的】アブラナ科植物（*Brassicacea*）の自家不和合性における花粉-柱頭間の自他識別は、柱頭の細胞膜上に存在する受容体型キナーゼSRK（*S* receptor kinase）と花粉表層タンパク質SP11（*S*-locus protein 11）のハプロタイプ特異的な相互作用によって制御されている。自家受粉の際、SRKは自己由来のSP11を特異的に認識することで、細胞内に情報を伝達し、自己花粉の吸水・発芽の抑制、花粉管の伸長阻害といった自家不和合反応を誘起する。また、当研究室では、自家和合変異株の解析から、膜結合型キナーゼMLPK（*M*-locus protein kinase）を同定している。MLPKは細胞膜上でSRKと受容体複合体を形成し、SRKにより直接リン酸化さることが既に示されており、自家不和合反応において重要な役割を果たしていると考えられるが、SP11によって活性化されたSRKがMLPKを介してどのように下流に情報を伝達するのかに関しては、明らかとされていない。そこで本研究では、SRK/MLPK受容体複合体の活性化機構を解明するために、まず、SRKによるMLPKのリン酸化標的部位の同定を試みることにした。

【方法と結果】大腸菌発現タンパク質を用いた*in vitro*リン酸化解析を行った結果、MLPKのN末端領域がSRKによってリン酸化されることが明らかになった。そこで、この領域がMLPKの活性化に関わっている可能性を考え、MLPKのN末端領域を欠損させた大腸菌発現タンパク質を作製し、自己リン酸化活性を調べた。その結果、N末端領域を欠損させた変異型MLPKは自己リン酸化活性が低下していることが明らかになった。その一方で、変異型MLPKの基質に対するキナーゼ活性は、全長鎖のものに比べむしろ増加していることも同時に明らかになった。これらの結果は、MLPKのN末端領域がリン酸化修飾を受ける領域であることを示すとともに、自己キナーゼ活性の抑制領域として機能する可能性を示している。また、同様の*in vitro*リン酸化解析から、MLPKはSRKのキナーゼ領域を直接リン酸化していることも明らかになった。N末端の自己抑制領域を欠損させた変異型MLPKは、恒常的活性型として機能する可能性がある。そこで、パーティクルガン法により*Brassica rapa*の乳頭細胞でこの変異型MLPKを一過的に発現させた。受粉試験を行った結果、変異型MLPKを発現させた乳頭細胞は、本来和合となる組み合わせの花粉においても不和合性を示した。また、SRKを欠損した植物体において同様の実験を行った際には、変異型MLPK発現の効果は見られなかった。

以上の結果は、自家受粉時の際、SRK/MLPK受容体複合体は相互にリン酸化することで活性化し、自己花粉の情報を細胞内へと伝達することを示している。

fertilization, self-incompatibility, receptor kinase

講演番号：3A31p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ A校舎31会場

タイトル　植物ゲノムの突然変異検出法の開発

Title　Development of a mutation-detection system for plant genomes.

塩谷　詩織、牧野　耕三、布柴 達男[1]、○平津 圭一郎（防衛大・応化、[1]国基大・教養）

Shiori Shiotani, Kozo Makino, Tatsuo Nunoshiba[1], ○Keiichiro Hiratsu (NDA, [1]ICU)

【目的】植物における突然変異は、種の多様化や栽培植物の育種に寄与する重要な生命現象だが、その変異誘発機構やDNA修復機構の知見は微生物や哺乳類のそれと比して少ない。シロイヌナズナのゲノム配列情報からは、DNAの複製･修復にかかわる遺伝子産物には他の真核生物との高い共通性が示されたが、例えば転写因子に多くみられる植物特異的な遺伝子の変異誘発機構への関与は未解明の部分が多い。

本研究では植物の突然変異に関与する因子を同定するための初期段階として、ゲノムに生じる変異を幅広いスペクトルで検出できる実験系の開発を行った。

【方法】変異の標的遺伝子として、大腸菌の*supF*遺伝子を用いた。*supF*はアンバー変異に対してチロシンを挿入するtRNAをコードしている。*supF*を含み大腸菌で自律複製可能なプラスミドを植物ゲノムに挿入して変異固定を行い、植物ゲノムからプラスミドを回収して大腸菌で変異導入された*supF*を選択する突然変異検出系の構築を試みた。具体的には、*supF*を含む大腸菌プラスミド、Gatewayシステム及び*bar*遺伝子をT-DNA領域内にクローニングしてバイナリーベクターを作製し、このベクターに35S-Nosまたは*apetala3*キメラリプレッサーをもつ35S-AP3SRDX-NosをLR反応によりそれぞれクローニング後、アグロバクテリウム法でシロイヌナズナに導入した。ビアラホス耐性のT1植物を選抜し、35S-AP3SRDX-Nos導入植物体では導入遺伝子の本ベクターにおける効果を検証した。35S-Nos導入植物体ではゲノムDNAを精製し、大腸菌KS40/pOF105株による変異*supF*の選択を行った。

【結果】35S-AP3SRDX-Nos導入植物体ではビアラホス耐性で得られた20株のT1植物すべてが雄性不稔となり、既存のバイナリベクターと比して本ベクターの遺伝子導入率および形質転換率は遜色なかった。現在、35S-Nos導入植物体を用いて自然突然変異の検出データを蓄積中であり、得られたデータを解析して本検出法の有効性を検討して報告する。

mutation, supF, chimeric repressor

講演番号：3A31p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ A校舎31会場

ウコギ科およびショウガ科植物由来の新規テルペン合成酵素遺伝子の構造と機能解析

Structural and functional analysis of novel terpene synthase genes from *Araliaceae* and *Zingiberaceae* plants

○八反　順一郎、平良　友希、柄谷　英里奈、常田　実由紀、新藤　一敏[1]、三沢　典彦（石川県大・生資研、[1]日女大家政・食物）

○Jun-ichiro Hattan, Yuki Taira, Erina Karaya, Miyuki Tsuneda , Kazutoshi Shindo[1], Norihiko Misawa (Ishikawakendai, [1]Nichijodai)

【目的】ウコギ科およびショウガ科植物からテルペン合成酵素遺伝子配列を単離し、大腸菌機能解析系によりこれらの機能の同定を行う。

【方法】メバロン酸経路等の一連の酵素遺伝子群を導入した大腸菌に、基質としてメバロノラクトンあるいはリチウムアセト酢酸を加えることで、セスキテルペンの前駆物質となるファルネシル二リン酸（FPP）を多量合成させることができる[1)]。芳香成分の豊富な山菜や薬用植物から、既知のテルペン合成酵素とホモロジーのある遺伝子配列を単離し、上記大腸菌に導入し発現させることで、FPPを基質としてセスキテルペンの合成を試み、GC-MS等により産物の解析を行う。

【結果】これまでに、ショウガ科植物のハナショウガまたは金時ショウガからα-フムレン、β-ユーデスモールおよびβ-ビサボレンの合成を担う新規酵素遺伝子を単離し、これらの構造と機能を明らかにした[2-4)]。今回我々は、同じショウガ科植物の紫ウコンやウコギ科植物のコシアブラ等から、テルペン合成酵素遺伝子配列を単離し、構造と機能解析を行った。その結果、紫ウコンからはβ-ユーデスモールの、またコシアブラからはβ-カリオフィレンやゲルマクレンD等の合成活性を持つ新規酵素遺伝子が得られた。過去に報告のある種々のテルペン合成酵素のアミノ酸配列に、今回得られた配列を加え系統解析したところ、セスキテルペン合成酵素に関しては同じ活性をもつ酵素が同じクレードに含まれるのではなく、同じ科、または属に分類される植物から得られた酵素が同じクレードに含まれることが分かった。

1) H. Harada et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol* 81:915-925 (2009).　2) F. Yu et al., *Planta* 227:1291-1299 (2008).　3) F. Yu et al., *FEBS Lett.* 582:565-572 (2008).　4) M. Fujisawa et al., *Planta* 232:121-130; Erratum, 232:131 (2010).

terpene synthase, sesquiterpene, pathway engineering

講演番号:3A31p11
講演日時、会場:3月24日15:49～ A校舎31会場

モリンガにおけるアスコルビン酸生合成酵素遺伝子の発現解析

Gene expression of ascorbic acid biosynthesis enzymes in Moringa

○近藤　隆之、藤川　愉吉[1]、上田　晃弘[1]、長岡　俊徳[1]、実岡　寛文[1]、Manuel Calcano[2]、Milton Martinez[2]、Jose Martich[2]、江坂　宗春[1]（広島大・生生、[1]広島大院・生物圏、[2]UASD大・農）

○Takayuki Kondo, Yukichi Fujikawa[1], Akihiro Ueda[1], Toshinori Nagaoka[1], Hirofumi Saneoka[1], Manuel Calcano[2], Milton Martinez[2], Jose Martich[2], Muneharu Esaka[1] (Hiroshima Univ., [1]Grad. Sch. of Biosph. Sci.,Hiroshima Univ., [2]UASD)

【目的】熱帯・亜熱帯地域で生育するモリンガ（*Moringa oleifera*）はインド原産のワサビノキ科植物で、優れた環境適応力により貧困土壌でも栽培可能である。葉には栄養素が豊富に含まれており、発展途上国において食糧として利用されている。アスコルビン酸（AsA）はその強い還元力により活性酸素種を除去し無毒化するなど、抗酸化物質として重要な役割を果たしている。これまでに、モリンガにおいて高濃度のAsAが蓄積することが示されているが、その集積機構は不明である。

本研究では、主要なAsA合成経路（マンノース経路）のAsA生合成酵素について、モリンガからそのcDNAをクローニングするとともに、遺伝子発現解析を試みた。

【方法・結果】モリンガの葉におけるAsA含量をシロイヌナズナやトマトの葉のAsA含量と比較した。その結果、モリンガ葉のAsA量はシロイヌナズナやトマトのものと比較して2.5倍以上であった。次に、シロイヌナズナのAsA生合成酵素遺伝子の塩基配列を基に作成したプライマーを用いて、モリンガのAsA生合成酵素のcDNAをRT-PCRによってクローニングした。得られたモリンガのAsA生合成酵素cDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を他の植物のものと比較したところ、高い相同性が見られた。モリンガのAsA生合成酵素遺伝子発現を解析し、モリンガにおいて高濃度のAsAが蓄積する機構について考察した。

ascorbic acid biosynthesis enzyme, gene expression, Moringa oleifera

講演番号：3A31p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ A校舎31会場

エンドウマメ葉緑体インビトロ翻訳系の構築と翻訳阻害剤の影響評価

Assessment of translation inhibitors based on pea chloroplast *in vitro* translation system

○野村 勇太、高林 泰斗、戸澤 譲（愛媛大・無細胞セ）
○Yuhta Nomura, Taito Takabayashi, Yuzuru Tozawa (Ehime Univ)

【目的】植物の葉緑体は分化型のオルガネラであり、植物の物質生産やエネルギー生産に必要不可欠である。シアノバクテリア様の光合成細菌を起源とすると考えられ、現在に至るまで原核生物由来の生化学過程を数多く保持している。葉緑体の翻訳系もその一例で、原核生物型の70Sリボソームや翻訳制御因子により構成されることが知られている。とりわけ、葉緑体ゲノムにコードされる光合成関連タンパク質の合成制御に重要な機能を果たすことより、葉緑体70Sリボソーム翻訳系の機能解析は、植物の光合成、発達過程、生理機能、物質代謝を理解する上で意義が大きい。我々は、葉緑体の翻訳制御に関するより詳細な知見を得るため、エンドウマメ(*Pisum sativum*)を用いた葉緑体*in vitro*翻訳系を構築することにした。さらに、その系を活用し、これまで*in vitro*解析例の少なかった種々の抗生物質の影響評価に加えて、近年植物でも同定されたバクテリア型緊縮制御因子ppGppの影響評価についても行うことにした。
【方法】チャンバー内で栽培したエンドウマメから無傷葉緑体を単離し、超遠心分離処理などによって、70Sリボソームや各種翻訳因子群を含有する葉緑体S-30画分を調製した。この抽出液にGFP遺伝子をコードするmRNAやアミノ酸などを添加して*in vitro*翻訳反応を行い、オートラジオグラフィー解析や、液体シンチレーションカウンターを用いた放射標識アミノ酸の取込み測定による翻訳活性の解析を行った。さらに、我々は今回構築した葉緑体*in vitro*翻訳系に対して、種々の抗生物質やppGppを添加し、翻訳活性への影響を解析した。
【結果と考察】GFPをモデルタンパク質として、エンドウマメ葉緑体のS-30画分を用いた*in vitro*翻訳反応条件の至適化を図り、再現性よく安定的にタンパク質合成が進行する系を構築した。続いて、インビボで作用することが明らかとされていた薬剤を含む種々の抗生物質を対象として、葉緑体翻訳系に対する阻害効果について、確立した系により直接的に検証し、幾つかの薬剤が低濃度で葉緑体タンパク質合成活性を阻害することを確認した。さらに、植物にも存在することが知られる原核生物型制御因子であるppGppについても同様な検証を進めた結果、非加水分解性のGTPアナログGDPNPと同様に、葉緑体翻訳活性を著しく阻害することを突き止めた。そこで我々はppGppの標的分子を明らかにするため、poly(U)-directed polyphenylalanine synthesis assayを行い、ppGppが葉緑体のペプチド伸長阻害に関与することを示した。今回得られた結果は、植物葉緑体の翻訳系には原核生物と同様な制御機構が保存されていることを示唆する。
【参考文献】(1) Nomura Y, Takabayashi T, Kuroda H, Yukawa Y, Sattasuk K, Akita M, Nozawa A, Tozawa Y. ppGpp inhibits peptide elongation cycle of chloroplast translation system *in vitro*. *Plant Molecular Biology* in press. (2) Tozawa Y, Nomura Y. Signaling by the global regulatory molecule ppGpp in bacteria and chloroplasts of land plants. *Plant Biology* 13:609-709 (2011).

Chloroplast, Antibiotics, ppGpp

講演番号：3A31p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ A校舎31会場

タイトル Pokeweed Antiviral Proteinのコンフォメーション・ダイナミクスに及ぼすNAGの影響
Title NAG effects on the conformation and dynamics of PAP

○中嶋　寛倫[1]、福永　幸裕[2]、渡邉　啓一[3]、山下　昭二[2]、西本　悦子[2]（[1]九大院・生資環、[2]九大院・農、[3]佐大・農）

○Hiromichi Nakashima[1], Yukihiro Fukunaga[2], Keiichi Watanabe[3], Shoji Yamashita[2], Etsuko Nishimoto[2] ([1]Institute of Biophysics, Faculty of Agriculture, Graduate School of Kyushu University, [2]Faculty of Agriculture, Graduate School of Kyushu University, [3]Department of Applied Biological Sciences, Saga University)

【目的】Pokeweed Antiviral Protein (PAP)はリボゾームにおける蛋白質の合成を阻害する一連のRibosome Inactivating Proteins (RIPs)の一種であり、他のRIPsと同様にrRNAよりAdenineを遊離するN-glycosilaseである。PAPのX線構造は確立しており、その酵素作用は２残基のTyr、ArgおよびGluからなる活性中心で発揮されるが、その近傍のTrp残基が活性に深く関わると考えられてきた。我々は、PAPの酵素活性に及ぼすTrp残基の影響を調べてきた。その中で、Trp208のPheへの置換はPAPの酵素活性を著しく抑え、Trp237の置換は逆に酵素反応を促進することを明らかにした。Trp237の置換は活性部位近傍の構造と揺動運動を変えることによりPAPの酵素活性を促進する。本来、Trp237はRIPsの糖鎖との相互作用部位に相当しており、Trp237も糖と結合し、活性部位近傍の構造の変化を通してPAPの活性調節に関わることは十分予想される。本研究では、PAPと糖との結合を検証し、PAP活性部位近傍の局所構造やダイナミクス及び酵素活性に与える影響を明らかにする。
【方法】Trp残基の蛍光を分子内プローブとして用いるために、野性型に加えて、Trp208およびTrp237をそれぞれPheに置換したW208F-,W237F-PAPを発現分離精製した。糖の試料として、N-Acetylglucosamine (NAG)を用いた。NAG—PAP結合の解析は蛍光滴定により行った。PAPの活性は酵素作用により遊離したAdenineをChloroacetoaldehydeで処理し誘導体化した後、これを310 nm で励起したときに観測される蛍光を410 nmで観測することにより測定した。NAGとの相互作用により誘起されるPAP活性中心近傍の局所構造およびダイナミクスの変化はサブピコ秒レーザー励起TCSPC法を用いたTrp-Tyr間のFRETの解析および蛍光偏光の時間減衰の解析より明らかにした。
【結果】20℃, 緩衝液中においてPAPは342 nmに極大をもつ蛍光スペクトルを示す。この溶液にNAGを加えたときPAPの蛍光スペクトルはその形状を変えることなく蛍光強度のみがNAGの濃度の上昇と伴に低下した。この結果はNAGのPAPへの結合を示すと同時に、コンフォメーション変化等間接的効果によらずNAGがTrpの蛍光を直接消光することを示す。また、蛍光強度変化を指標とするNAG-PAP結合滴定曲線は分子比１：１でほぼ飽和し、NAGはPAPに対して非常に強く結合することを示した。NAGの結合により誘起されたTyr172-Trp208間距離、TrpのPAP内揺動運動の変化のもたらすPAPの酵素活性への影響について現在検討している。

PAP, Time-Resolved Fluorescence

講演番号：3A31p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ A校舎31会場

トマト植物体における２種のイソレクチン遺伝子の発現

Expression patterns of isolectin genes in tomato plant

○浅野 修好、原 梨紗、坂本 光、江面 浩[1]、小栗 秀（東農大生物産業・生物生産、[1]筑波大院・生命環境）

○Nobutaka Asano, Risa Hara, Hikaru Sakamoto, Ezura Hiroshi[1] Suguru Oguri (Tokyo Nodai, [1]Tsukubadai)

【目的】トマト果実に含まれるレクチンは65 kDaのキチン結合性糖タンパク質（＝果実レクチン：TL-Fと略す）であり、その遺伝子（*TL-F*）が単離されている。一方、トマトの葉は、抗TL-F抗体と交差し、分子量の異なるイソレクチンを含んでいる。我々は、葉のイソレクチンをコードする候補遺伝子として*TL-L*を同定した。*TL-F*と*TL-L*のコードするレクチンの推定アミノ酸配列は87％の一致を示した。トマト植物体におけるレクチンの役割解明を目的にイソレクチン遺伝子の発現を比較した。【方法と結果】１．健常トマト植物体において*TL-L* は小葉特に上位葉に、*TL-F* は茎と根に発現が見られた。果実においては*TL-L*の発現は受粉後５日までに限られ、一方*TL-F* の発現は受粉後５日から完熟に至る４０日まで認められた。２．小葉における*TL-L* の発現はメチルジャスモン酸の葉面散布と傷害処理により顕著に誘導された。また、*TL-L* の発現はレクチンのハプテン糖であるキトオリゴ糖処理では変化せず、エテホン処理は発現を抑制した。下位葉への傷害処理は上位健常葉での*TL-L* 発現を誘導した。傷害処理葉においては、*TL-L* 転写産物の経時的な蓄積と共にレクチン活性の上昇が観察された。３．両レクチン遺伝子に相同な480bpのDNA配列をトリガー領域としたRNAiベクターを用いてトマトを形質転換した。これらの形質転換体(T0)の葉では、*TL-L* mRNAが検出されず、抽出液にレクチン活性が認められなかった。果実においても*TL-F* mRNAとレクチン活性が検出されず、２つのイソレクチン遺伝子の発現を抑制したノックダウン変異体であることが確認された。

lectin, tomato, Solanum lycopersicum

講演番号：3A31p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ A校舎31会場

A single nucleotide change in cre1 affects carbon catabolite repression and enhances cellulase expression in a *Trichoderma reesei* mutant

○Juliano de Oliveira Porciuncula[1], Takanori Furukawa[1], Kazuki Mori[2], Hideki Hirakawa[2], Satoru Kuhara[2], Yasushi Morikawa[1], Wataru Ogasawara[1] ([1]Nagaoka Univ. of Tech. Bioeng. Dept, [2]Kyushu Univ. Grad. School of Gen. Res. Tech.)

The filamentous fungus *Trichoderma reesei* is one of the most important cellulase producers, and mutants have been developed by classical mutagenesis to improve the productivity of these enzymes. We have sequenced the genome of five high cellulase producer mutants to understand why they have enhanced cellulase producibility. Among the genes with single nucleotide polymorphism (SNP), we found that *cre1*, encoding a carbon catabolite repressor has a SNP in its DNA-binding domain. Gel Shift analysis revealed that this SNP decreased CRE1 DNA-binding affinity. qRT-PCR demonstrated that PC-3-7 mutant harboring the mutant *cre1* exhibited a relieved carbon catabolite repression pattern of cellulases and hemicellulases expression when compared with PCWcre1 having the wild-type *cre1* gene. These results suggest that the SNP in *cre1* is involved in high hyper-cellulase productivity in *T. reesei* strains.

講演番号：3A32a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ A校舎32会場

子嚢菌類 *Mariannaea elegans* 由来の新奇ガラ系列スフィンゴ糖脂質の構造解析

Structure analysis of novel gala-series glycosphingolipids from the ascomycetous fungus *Mariannaea elegans*

◯谷 泰史, 中村 香里, 沢 良太, 西尾 匡[1], 齋藤 茂樹, 伊藤 將弘[1], 糸乗 前[2], 三原 久明（立命館大・生命科学・生物工, [1] 立命館大・生命科学・生命情報, [2] 滋賀大・教育・化学）

◯Yasushi Tani, Kaori Nakamura, Ryota Sawa, [1]Masashi Nishio, Shigeki Saito, [1]Masahiro Ito, [2]Saki Itonori, Hisaaki Mihara. (Dept. Biotechnol., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [1]Dept. Bioinfo., Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2] Dep. Chem., Fac. Lib. Arts Edu., Shiga Univ.)

【目的】　スフィンゴ糖脂質は, 親水性の糖鎖部分と疎水性の脂質部分から構成されている。糸状菌に存在するスフィンゴ糖脂質としては, 一般に, 脂質部分がセラミド構造を有する中性スフィンゴ糖脂質（セレブロシド: グルコシルセラミドやガラクトシルセラミド）と脂質部分がフィトセラミド構造を有する酸性スフィンゴ糖脂質（イノシトールリン酸セラミドが基本骨格）が知られてきた。しかし, 近年, *Mucor* 属糸状菌を含む接合菌類や子嚢菌類 *Hirsutella rhossilliensis* には, 酸性スフィンゴ糖脂質は存在せず, その代わりにフィトセラミド構造を有する長鎖中性スフィンゴ糖脂質が存在することが示された。それら長鎖中性スフィンゴ糖脂質は特異なガラ系列構造を有し, 酸性スフィンゴ糖脂質の機能を代替する可能性が示唆されているが, 詳細な生理機能の解明には至っていない。本研究では, *H. rhossilliensis* を含むバッカクキン科に属する糸状菌の長鎖中性スフィンゴ糖脂質の構造解析を行うとともに, 長鎖中性スフィンゴ糖脂質の生理的役割の解明を目的とした。

【方法・結果】　冬虫夏草等の寄生菌として知られるバッカクキン科の糸状菌 *Simplicillum lamellicola*, *Pochonia suchlasporia*, *Nectria gracilipes*, *Mariannaea elegans* から抽出した糖脂質を TLC 分析した結果 *S. lamellicola*, *P. suchlasporia* の糸状菌では単糖を含む糖脂質が主成分であることが明らかになったが, 他２種の糸状菌には複数の糖脂質が存在することを見出した。これら複数の糖脂質を有する糸状菌の内, サンショウウオの卵に寄生する *M. elegans* の糖脂質を陰イオン交換樹脂と Iatro beads によるカラムクロマトグラフィーにより分別単離し, TOF/MS, GC, GC/MS, NMR 分析した。その結果, 本菌は, 新奇な 2 糖構造を有する中性スフィンゴ糖脂質（Glcβ1-6Galβ1-Cer）を持つことが明らかとなった。また, 本菌はイノシトールリン酸セラミド合成酵素の阻害剤である Aureobasidin A（AbA）により生育阻害を受けたことから, 本菌の生育にとってイノシトールリン酸セラミドを骨格とする酸性スフィンゴ糖脂質は必須であると考えられた。したがって, *M. elegans* は, 長鎖中性スフィンゴ糖脂質と酸性スフィンゴ糖脂質の両方を有する糸状菌として初めての例である。

Aureobasidin A, *Mariannaea elegans*, glycosphingolipids

講演番号：3A32a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ A校舎32会場

病原性担子菌酵母*Cryptococcus neoformans*、*Malassezia furfur*、 *Rhodotorula mucilaginosa*の糖鎖構造解析

Structural analysis of glycan structures produced in pathogenic basidiomycetous yeasts, *Cryptococcus neoformans, Malassezia furfur*, *Rhodotorula mucilaginosa*

○大橋 貴生、酒井 香奈江[1]、五ノ井 透[1]、藤山 和仁（阪大・生物工学国際交流セ、[1]千葉大・真菌医学研究セ）

○Takao Ohashi, Kanae Sakai[1], Tohru Gonoi[1], Kazuhito Fujiyama (ICBiotech, Osaka Univ., [1]MMRC, Chiba Univ.)

【目的】病原性酵母の細胞表層は糖鎖からなる細胞壁で覆われており、細胞の物理的強度、宿主細胞への接着・侵入、宿主の免疫応答などの感染メカニズムに深く関与していると考えられている。モデル酵母である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*および子嚢菌モデル病原性酵母 *Candida albicans*等では細胞表層糖鎖構造の解析が進んでおり、糖鎖構造およびその糖鎖生合成関連遺伝子が報告されている。しかし、それ以外の酵母、特に病原性担子菌酵母である *Cryptococcus neoformans*、*Malassezia furfur* および *Rhodotorula mucilaginosa* においては、*C. neoformans* の夾膜多糖の例を除いて、ほとんど糖鎖構造解析された例がない。そこで本研究では、将来的な糖鎖生合成酵素の同定、またこれらの酵素をターゲットとした抗真菌剤の開発を見据えて、これらの病原性担子菌酵母の糖タンパク質糖鎖の構造解析を行った。

【方法と結果】各病原性担子菌酵母を培養後、ヒドラジン分解-ピリジルアミノ化法を用いて、ピリジルアミノ化糖鎖を調製後、サイズ分画HPLCによるピリジルアミノ化糖鎖の分画、次いでLC-MS/MSによる質量分析を行い、構造決定を試みた。*O*-結合型糖鎖に関しては各酵母ともHex$_{1-4}$-PAの糖鎖が検出された。特に、モデル酵母には見られない珍しい糖鎖として、*C. neoformans*ではPent-Hex-Hex-PAの糖鎖が検出された。*N*-結合型糖鎖に関しては各酵母ともHex$_{5-11}$GlcNAc$_2$-PAの糖鎖が検出された。今後、グリコシダーゼ消化などの解析により、より詳細な構造を決定が可能となる。

pathogenic yeast, basidiomycetous yeast, pyridylamination

講演番号：3A32a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ A校舎32会場

タイトル　グルコマンナン由来オリゴ糖の構造解析と性能評価

Title　New evaluation study of enzymatic production of oligosaccharides from konjac glucomannan

○下村　周平、岡本　真由美、岩井　修一[1]、竹本　克宏[1]、小堀　深、清水　功雄　(早大理工・応化、[1]㈱スイスロワール)

○Syuhei Shimomura,Mayumi Okamoto,Syuichi Iwai,Katsuhiro Takemoto,Fukashi Kohori,Isao Shimizu(Wasedadai,Swissrowal)

コンニャクグルコマンナンは、蒟蒻芋（*Amorphophallus Konjak*）より精製される水に可溶な非イオン性の多糖類である。その構造は、マンノースとグルコースを1.6：1.0の比で有し、糖鎖間はランダムにβ-1,4マンノシド結合している。グルコマンナンは分子量は約１００万から２００万で天然の高分子糖類の中で最も大きく、2－6％の割合で、C-6位の水酸基がアセチル化されており、塩基を加えることにより脱アセチル化が起こり、ゲル化が起きることも知られている。われわれは、*Paenibacillus pabuli* SW10およびSW12を用いてグルコマンナンを分解し、低粘性のグルコマンナン分解液が得られることを見出している。ここでは、培養時間別のコンニャクグルコマンナン分解液の溶質の構造解析と分子量測定を行い、培養時間と分子量の関係の検討を行った。すなわち、試料にピリジルアミノ基を導入し、蛍光標識化した後にサイズ排除クロマトグラフィーを用いて分子量を測定した。また、試料にピリジルアミノ基を導入後、単糖まで酸分解し、アセチル化を行った後にガスクロマトグラフィーに導入して、分子量測定を行った。これらの結果について議論したい。

Keyword1, Konjac Glucomannan　Keyword2, Paenibacillus pabuli SW10
Keyword3 oligosaccharides

講演番号：3A32a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ A校舎32会場

魚介類由来グリコサミノグリカンの含有量と組成分析

Contents and compositional analyses of glycosaminoglycans derived from fishes

○田村 純一、中山 清[1]、増田 紳哉[2]、石原 幸雄[2]、吉岡 俊介[3]、吉岡 忍[3]、白出 征三[4]、有馬 和也（鳥取大地域・地域環境、[1]カンダ技工、[2]鳥取水試、[3]オーク、[4]白謙蒲鉾）

○Jun-ichi Tamura, Kiyoshi Nakayama[1], Shinya Masuda[2], Yukio Ishihara[2], Shunsuke Yoshioka[3], Shinobu Yoshioka[3], Seizou Shirade[4], Kazuya Arima (Tottori University, [1]Kandagiko, [2]Tottori Prefectural Fisheries, [3]OAK, [4]Shiraken Kamaboko)

【目的】コンドロイチン硫酸(CS)やヒアルロン酸(HA)は、医薬品、健康食品、サプリメントとして注目されており、たいへん需要が高い。現在利用されている資源生物は主にサメやブタである。これらは捕獲制限や感染症の危険が問題となっており、代替資源生物の探索が急務となっている。CS や HA は動物にほぼ普遍的に存在しているが、生物や部位により組成や含有量に違いがある。今回、代替資源生物の探索を目的として、いくつかの魚介類について CS、 HA およびデルマタン硫酸(DS)の含有量と組成分析を行ったので報告する。

【方法と結果】対象となるいくつかの魚介類を部位別に粉砕し、有機溶媒による脱脂・乾燥後、酵素による除タンパクを行い、イオン交換樹脂と透析、ゲル濾過によって精製した。これらの精製糖鎖を、コンドロイチナーゼ ABC などの、いくつかの種類の異なる特異的糖鎖分解酵素により消化し、得られる不飽和二糖を HPLC（PA-03 カラム）で分析した。その結果、今回用いた魚介類に CS、DS、HA の存在が確認でき、魚介類の種類と部位により、その組成と含有量が著しく異なることを明らかにした。

Chondroitin sulfate, Dermatan sulfate, Hyaluronic acid

講演番号：3A32a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ A校舎32会場

ナイセリア属細菌の産生するリポオリゴ糖の免疫化学分析

Immunochemical analysis of neisserial lipooligosaccharide

○田中　利弥、山崎良平（鳥大・農）
○Toshiya Tanaka and Ryohei Yamasaki(Tottori University)

【背景】

髄膜炎菌やインフルエンザ細菌は、その細胞外膜に、リポオリゴ糖(lipooligosaccharide, LOS) と呼ばれる糖脂質を産生する。この複合糖脂質は、オリゴ糖と lipid A からなり、ナイセリア属の髄膜炎菌の場合、3,4 分岐、2,3:3,4 二分岐構造の二種類の分岐構造を生合成する。我々はこれまでの研究により、ヒト IgG が上記の二種の分岐糖鎖構造を認識することを明らかにしている [1]。しかし、このような抗 LOS 抗体が認識する特定の糖鎖構造は未解明であり、また、これら抗体のヒト血清における普遍性も明らかにされていない。このような抗体の分析は、病原性ナイセリア属細菌に対するヒト免疫応答を理解する上で重要である。今回、我々は、数種のヒト血清を用いて PAGE/Western 分析を行い、二種の分岐 LOS を認識する IgG の検索を行った。

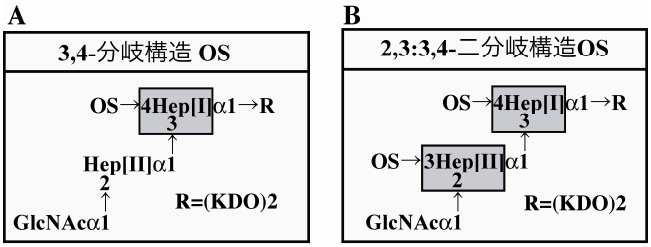


Fig.1 3,4-分岐構造と2,3:3,4-二分岐構造

【結果/考察】

ナイセリア属細菌の産生するLOSと、数種のヒト血清を用いて、血清中のIgGの二種の分岐糖鎖LOSへの結合能の検索を行った。その結果、いずれのヒト血清中にも、3,4分岐、2,3:3,4二分岐糖鎖構造を認識するIgGが存在し、以前に明らかにされたIgG[1]と同様に、今回用いた血清中のIgGは2,3:3,4二分岐糖鎖を有するLOSに強く結合した。今回の検索の結果、 LOSの特定の糖鎖構造を認識するIgGのヒト血清における存在は、普遍的である可能性が高いことが示された。この検索の結果と、今回新しく見いだされた、抗LOS抗体の認識する糖鎖構造を合わせて報告する。

[1] R. Yamasaki, U. Yabe, C. Kataoka, U. Takeda, and S. Asuka, Infect. Immun. **78**(2010)*3247-3257*.

Lipooligosaccharide, lipopolysaccharide, immunochemical analysis

講演番号：3A32a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ A校舎32会場

メタノール資化性酵母*Ogataea minuta*によるヒトサポシンBの生産と解析

Production and analysis of human saposin B from the methylotrophic yeast *Ogataea minuta*

○渡邉 徹[1]、高岡 友紀[1]、川島 育夫[2,3]、櫻庭 均[3]、千葉 靖典[1,3]（[1]産総研・糖鎖医工学、[2]都医学研、[3]明治薬大・臨床遺伝学）

○Toru Watanabe[1], Yuki Takaoka[1], Ikuo Kawashima[2,3], Hitoshi Sakuraba[2], Yasunori Chiba[1,3]
([1]AIST, [2]Tokyo Metropolitan Inst. Med. Sci, [3]Meiji Pharm. Univ.)

【目的】リソソーム病は、リソソーム酵素の活性低下により、本来分解される基質が蓄積することで引き起こされる先天性代謝異常症である。現在いくつかのリソソーム病に対して、酵素製剤をリソソーム内へ輸送させる事で基質の分解を行なう酵素補充療法による治療が行われている。リソソームへの輸送は、細胞表面に存在するマンノース-6-リン酸（M6P）レセプターが酵素に付加した糖鎖の非還元末端にある M6P を認識することで開始される。このことから効果的な酵素の取込みには糖鎖の M6P 量が重要だと考えられる。今回、リソソーム関連タンパク質であり、α-ガラクトシダーゼ（GLA）の活性化因子として知られているヒトサポシン B（SapB）について、メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* での生産と解析を試みた。

【方法・結果】*Saccharomyces cerevisiae* の M6P 転移酵素制御遺伝子（*MNN4*）の *O. minuta* ホモログ（*OmMNN4-1*）について、同遺伝子を高発現する株を作製した。さらに SapB 遺伝子のコドンの最適化を行い、メタノール誘導による発現を行った。その結果、4 L の培養上清より 4.7 mg の糖鎖付加した SapB が精製された。糖鎖構造解析より *OmMNN4-1* 高発現株由来の SapB の *N*-結合型糖鎖においては M6P 含有糖鎖の割合が 90%以上であり、*O*-結合型糖鎖由来の M6P 含有糖鎖は存在しなかった。また *OmMNN4-1* 高発現株由来の SapB は、培養細胞へ効果的に取り込まれる事を確認した。さらに SapB は、GLA の基質である globotriosylceramide の分解反応を *in vitro* で活性化する事が確認された。

Yeast, Glycoprotein, Lysosomal storage disease

講演番号：3A32a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ A校舎32会場

シアロ型多価糖鎖配位体とニホンニワトコレクチンとの凝集メカニズムの解析

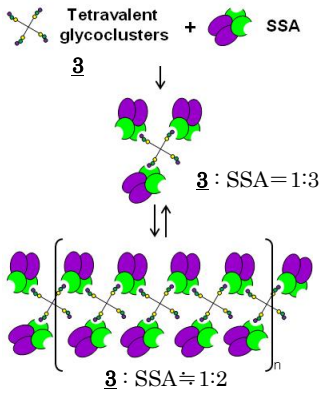
Analysis of aggregation mechanism between multivalent sialo-glycocluster and *Sambucus sieboldiana agglutinin*

○梅村征一郎[1]、尾形慎[2]、村田健臣[1]、朴龍洙[2]、中村直樹[3]、松尾一郎[3]、碓氷泰市[1,2]（[1]静岡大農・応生化、[2]静大院・創科技、[3]群馬大・工・応化生化）

○Seiichiro Umemura[1], Makoto Ogata[2], Takeomi Murata[1], Enoch Y. Park[2], Naoki Nakamura[3], Ichiro Matsuo[3], Taichi Usui[1,2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]Department of Chemistry and Chemical Biology, Gunma University)

【背景･目的】本研究室ではこれまでに、二価及び四価糖鎖配位体を合成し、それらが糖認識タンパク質（レクチン）と架橋複合体を形成する現象を見出してきた。そこで、本研究ではモデルタンパク質であるニホンニワトコレクチン（SSA）に対して、架橋複合体形成能を有するシアロ型多価糖鎖配位体の設計及び合成を行った。さらに、糖鎖リガンド-レクチン間における架橋複合体形成メカニズムを各種相互作用解析の統合的評価により検証した。

【方法･結果】はじめに、前駆体となるキレート分子（EGTA）の四価カルボキシ基に対してアグリコン部に2-アミノエトキシ基を有するスペーサー結合型SAα2,6LacNAc（SAα2,6Galβ1,4GlcNAc）及びSAα2,6LacNAcβ1,3LacNAc配糖体をそれぞれ導入した3糖及び5糖シアロ型四価糖鎖配位体（**1**, **2**）を合成した。また、これとは別に**2**のLacNAc1回繰り返し分に相当する長さをアルキルスペーサーで置換したスペーサー延長型SAα2,6LacNAc四価配位体（**3**）も合成した。続いて、これら一連の糖鎖配位体とSSAとの結合特性解析を等温滴定カロリメトリー（ITC）により評価した。その結果、**2**が最も強い結合解離定数（K_d = 34 nM）を示し、その値はSAα2,6LacNAcと比較して28倍強い結果となった。また興味深いことに、**1**と**2**及び**3**では糖鎖リガンド一分子に対するSSAの結合数に違いがみられ、**1**はリガンド：SSAが1：2で、**2**及び**3**は1：3で結合することが示された。さらに、本リガンドの架橋形成能を定量沈降試験及び動的光散乱法で評価したところ、ITCの結果を支持する濃度範囲において化学量論的な架橋複合体の形成が示された。結果として、**1**はリガンド：SSAが1：1で、**2**及び**3**は1：2で最大沈降量を示し、その粒径は600-800 nmと巨大なリガンド-SSA架橋複合体であることが明らかとなった。今回の結果から、糖鎖配位体のスペーサー及び糖鎖構造が架橋複合体形成に深く関与することを実証すると共に、そのリガンドとレクチン間における架橋複合体形成メカニズム（右図）を各種相互作用解析の統合的評価により提案した[1)]。



1）Ogata, M., *et al*, *Bioconjugate Chem.*, (2011) in press.

Lectin、Multivlent、Aggregation

講演番号：3A32a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ A校舎32会場

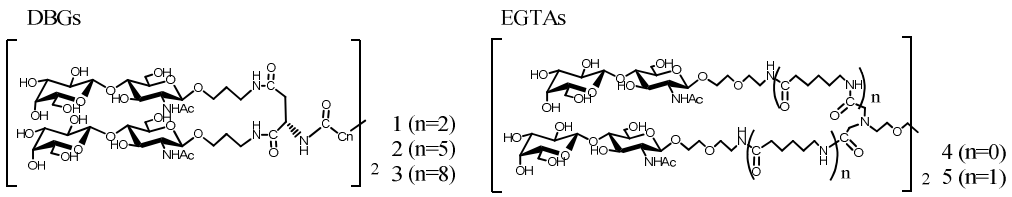
レクチン結合親和力に基づくアシアロ型多価配糖体の分子設計

Molecular design of asialo-multivalent glycosides based on their binding affinities with lectin

○田見 祐一、中馬 康志、尾形 慎[1]、村田健臣、碓氷 泰市[1]
（静岡大農・応生化、[1]静岡大・創科技院）
○Yuichi Tami, Yasushi Chuma, Makoto Ogata[1], Takeomi Murata, Taichi Usui[1] (Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [1]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology,Shizuoka University)

【目的】糖鎖-タンパク質間相互作用は一般的に弱いが、クラスター化することで結合親和性が飛躍的に上昇する事が知られている。本研究室ではこれまでに多価配糖体を合成し、それらがレクチンに対してクラスター効果に伴う結合親和性の上昇を示すだけではなく、レクチンとの架橋複合体を形成し沈殿物を生じる事を見出してきた。[1)]そこで本研究では、これら多価配糖体のスペーサー及び骨格部に着目し、結合親和性と架橋形成能の相補的評価に基づく設計及び合成を試みた。
【方法・結果】始めに、各種*N*-アセチルラクトサミン（LacNAc；Galβ14GlcNAc）含有四価配糖体（DBGs；**1**-**3**，EGTAs；**4**，**5**）の合成を行った。具体的には、DBGsはアルキル鎖長の異なる3種類のジカルボン酸（HOOC-C_x-COOH；X=4，10，16）を骨格部に用いることで骨格部改変型LacNAc四価配糖体（**1**-**3**）を合成した。一方、EGTAsは骨格部であるキレート分子「EGTA」とLacNAc糖鎖との間に長さの異なる2種類のスペーサー構造を導入することで、スペーサー部改変型LacNAc四価配糖体（**4**および**5**）を合成した。続いて、これら四価配糖体のレクチンに対する結合親和性及び架橋複合体形成能を各種相互作用解析により評価した。また、本研究ではモデルタンパク質として、LacNAcに結合特異性を有するデイゴマメレクチン（ECA）を用いた。最初に、ECAに対する結合親和性を赤血球凝集阻害試験により評価した。その結果、**4**＜**1**，**5**＜**2**＜**3**の順に阻害活性の増加が観察され、DBGsの中でアルキル鎖長が一番長い化合物**3**（X=16）が最も強い凝集阻害活性（IC_{50}=188 nM）を示した。またECAとの定量沈降試験においては、全ての四価配糖体が架橋複合体形成能を有することが示されたが、化合物**3**と他の四価配糖体は異なる架橋複合体形成様式である可能性が示唆された。現在、動的光散乱法等を用いて、より詳細なレクチン－糖鎖リガンド架橋複合体の形成メカニズムを解明中である。

1）R. Masaka, et al, *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 621-629 (2010).



multivalent glycoside, molecular design, lectin

講演番号：3A32a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ A校舎32会場

糖鎖関連遺伝子各種ノックアウトマウスの血清 *N*-グライコミクス

The effects of single genetic damage in carbohydrate recognizing proteins on mouse serum *N*-glycan profile

○天野麻穂[1,2], 橋本亮[1], 西村紳一郎[1,2]（[1]北大院・先端生命、[2]医化学創薬合同会社）
○Maho Amano[1], Ryo Hashimoto, Shin-Ichiro Nishimura[1] ([1]Faculty of Advanced Life Science, and Graduate School of Life Sciences, Hokkaido University, [2]Medicinal Chemistry Pharmaceuticals, LLC)

【目的】生体物質の糖鎖修飾は、さまざまな生命現象に重要な役割を担っている。適切な糖鎖修飾が行われるためには、目的に適った糖転移酵素や硫酸化酵素などの存在が不可欠であり、発現した糖鎖が複合糖質上でその機能を発揮するためには、リガンドタンパク質（レクチン）に認識されることが必要である。ノックアウト（KO）マウスでは、胎生致死や重篤な発達障害を示すこれらの糖鎖関連酵素も知られているが、顕著なフェノタイプを示さないものも存在する。このような場合、別の糖鎖関連酵素が代替として働いていると考えられているが、体組織のグライコームや代謝系にどのような影響が表れているかについては、これまでほとんど研究がなされてこなかった。本研究においては、Consortium for Functional Glycomics より提供された、8 種類の糖鎖関連酵素をそれぞれ KO した、マウスの血清 *N*-グライコームにどのような変化が起きているかを調べることを目的とした。

【方法】*galectin-9*、*B4galnt1&2*、*Mcl*、*Mincle*、*SignR1*、*SignR3*、*C6ST*、*Dcir*の各KOマウス、およびコントロールとして性別をマッチさせたC57BL/6マウスの血清から、*N*-結合型糖鎖をグライコブロッティング法(1)により網羅的かつ定量的に得た後、MALDI-TOF/MSにより分析を行った。得られた各ピークについて、構造の推定を行い、糖鎖タイプ解析(2)を実施することで、各KOマウスに特徴的な血清糖鎖タイプを見出した。

【結果】各KOマウスについて、性別をマッチングさせた野生型マウスと比較したところ、KOした糖鎖関連遺伝子が、直接のターゲットとする構造とは違うグライコタイプにおいても、影響を与え得ることが分かった。たとえば、エンドサイトーシスに関与するMincleやDcirなどのレクチンをKOした場合に、共通して観察される糖鎖タイプ変化など、興味深い知見が得られたので紹介したい。

(1) S.-I. Nishimura, *et al., Angew Chem Int Ed* **2005**, *44*, 91-96.
(2) M. Amano, *et al., Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 523-537.

glycomics, knockout mouse, lectin

講演番号：3A32p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ A校舎32会場

Photobacterium sp.由来α2, 3−シアル酸転移酵素反応への有機溶媒添加の効果

Study of additive effect of organic solvents for α2,3-Sialyltransferase, JT-ISH-224

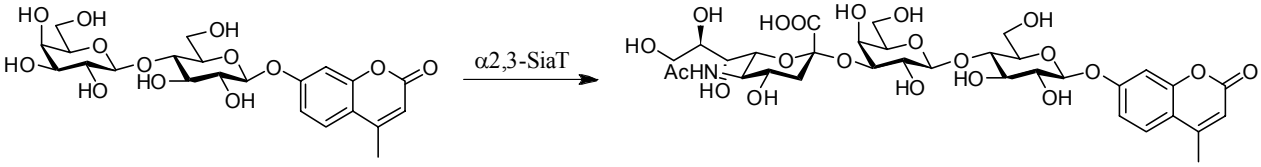
○長島 生、峯 利喜[1]、山本 岳[2]、清水 弘樹（産技総研生物プロセス、[1]JT糖鎖ビジネスユニット、[2]JTたばこ事業本部）

○Izuru Nagashima, Toshiki Mine[1], Takeshi Yamamoto[1], Hiroki Shimizu (AIST, [1]JT)

【目的】　近年、糖鎖が生体内で重要な役割を担っていることが明らかになるにつれ、その合成法の開発も盛んに行われている。糖鎖化学合成法は、天然型のみならずその非天然型誘導体などデザインした化合物を比較的自由に合成できるが、技術的な習練が必要で、工程数が多くなることから合成所用時間もかかる。糖鎖酵素合成法は、生体触媒である酵素が有する高い基質特異性を利用し、高収率かつ高選択的な物質変換が可能なため、短工程で目的物を得られるが、基本的に天然型のみ合成可能で、かつ大量合成には向かないとされていた。これまでに我々は、これらの欠点を補った糖鎖の大量合成技術研究を進め、シクロデキストリン添加による難水溶性基質の高濃度反応や新規シアル酸化合物合成研究などについて報告した。今回は、α2, 3−シアル酸転移酵素（JT−ISH−224）の活性制御研究について報告する。本酵素は、基質特異性を適度に保有し、非天然型糖鎖合成に有効な酵素であるが、糖転移活性と同時に、産物を基質とした糖加水分解活性も有することが知られている。つまり、ラクトース誘導体を基質としてα2, 3−シアリルラクトース誘導体を合成するが、そのまま反応を継続させると副反応である加水分解反応が進行し、その結果、みかけ上反応が全く進行していないかのごとくラクトース誘導体原料しか得られてこない。反応を随時追跡し適度なところで終了させればよいが、糖鎖生産という観点からは、より反応をシンプル化することが求められる。そこで、有機溶媒の添加による本酵素活性制御研究をおこなった。

【方法】　基質として4-Methylumbelliferyl β-lactoside（4-MU Lactose）を用い、海洋性微生物 *Photobacterium* sp.由来、α2,3-Sialyltransferase (JT-ISH-224)の転移反応における各種有機溶媒を添加したときの反応経過を逆相HPLCにより追跡した。添加する有機溶媒としてDMSO、MeOH、EtOH、CH_3CN、Acetoneなど、水と親和性のある有機溶媒を検討した。

【結果】　MeOH、EtOH、CH_3CN、Acetoneを共存有機溶媒として各々反応系に添加したところ、本α2,3-シアル酸転移酵素が同時に有するわずかながらのシアリダーゼ活性を抑えることに成功した。現在、この有機溶媒による抑制の詳細と機構の解明に努めている。



Carbohydrate, Enzyme, Sialyltransferase

講演番号：3A32p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ A校舎32会場

糖鎖を基質とした酵素反応におけるマイクロ波効果研究

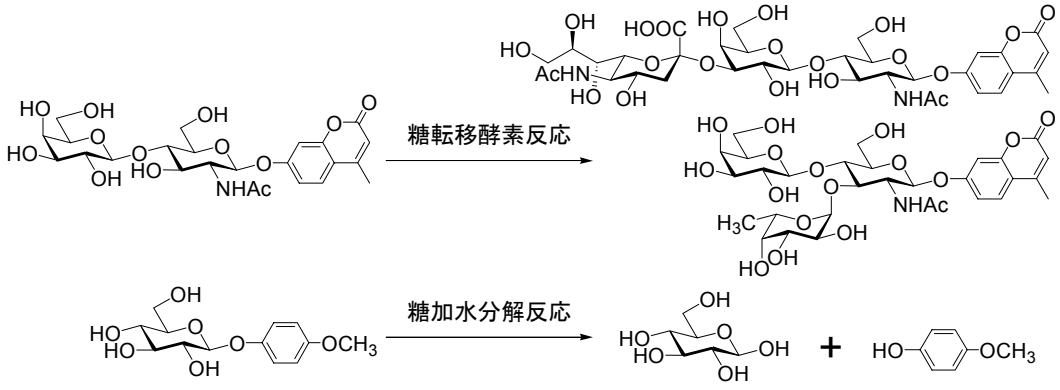
Study of microwave effect for glycosyltransferases and glycosidase

○清水 弘樹、長島　生、作田　智美、杉山　順一[1]、峯　利喜[2]、山本　岳[3]
（産技総研生物プロセス、[1]産技総研ナノシステム、[2]JT糖鎖ビジネスユニット、[3]JTたばこ事業本部）
○Hiroki Shimizu, Izuru Nagashima, Tomomi Sakuta, Jun-ichi Sugiyama (AIST)
Toshiki Mine, Takeshi Yamamoto (JT)

【目的】　我々は、糖転移酵素を利用した糖鎖産業レベル合成研究を進め、シクロデキストリン添加による基質の可溶性向上、有機溶剤添加による酵素活性の抑制、高活性糖転移酵素利用による非天然型糖鎖合成などの研究を進めてきた。一方、糖鎖化学合成におけるマイクロ波利用とその効果について研究を行っているが、今回はマイクロ波照射による糖関連酵素反応への効果、影響に着目し、研究をおこなった。

【方法】　糖転移酵素反応は、比較的活性が高い日本たばこ産業株式会社から市販されている各種シアル酸転移酵素の他、比較的安定性の良いフコース転移酵素やグルコサミン転移酵素について検討をおこなった。マイクロ波照射は、共振空洞応用型マイクロ波照射装置（SS-RC-MW-101、㈱サイダ・UMS）を用いた。出力は10Wと50Wの２段階から選択可能で、温度制御により出力のON/OFFは自動的に行われ、反応はウエルプレート上でおこない、スケールは200μL。必要に応じてプレート下部を冷却できる様改造した。　糖加水分解反応は、耐熱酵素研究所から市販されている、至適温度が60℃のGlycosidase HT1の反応について検討した。マイクロ波照射は、温度制御能力に長けているシングルモードマイクロ波照射装置（MWS-1000、東京理化器械）を用いて、精密に反応温度を制御しつつ、1.5mLスケールで遂行した。反応条件は、30～60分で反応が完結する程度の酵素量を使用することを基本とした。これは、酵素反応における初速度と反応到達収率の双方での考察を進めることを考慮したことによる。

【結果】糖転移酵素による反応では、多くの酵素では、顕著な失活はせずともマイクロ波加熱と通常加熱の差異が見られておらず、グルコサミン転移酵素については通常加熱より反応が抑制された結果を得ている。糖加水分解反応においては、マイクロ波加熱によって反応至適温度が60℃から50℃に低下し、50℃における反応性が２倍に向上した。



Carbohydrate, Enzyme, Microwave

講演番号：3A32p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ A校舎32会場

海洋性細菌由来α2, 3−シアル酸転移酵素のイノシトール類に対する転移活性評価

Evaluation of the marine bacterial α2,3-sialyltransferase activity toward inositols

○宮崎 達雄、峯 利喜[1]、館田 尚家、金子 直史、渡部 貴幸、梶原 ひとみ[1,2]、鰺坂 勝美、山本 岳[1,3]
（新潟薬大・応生科、[1]JT糖鎖ビジネスユニット、[2]JT法務部、[3]JTたばこ事業本部）
○ Tatsuo Miyazaki, Toshiki Mine[1], Naoya Tateda, Naofumi Kaneko, Takayuki Watanabe, Hitomi Kajiwara[1,2], Katsumi Ajisaka, Takeshi Yamamoto[1,3]
(Department of Applied Life Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, [1]Glycotechnology Business Unit, Japan Tobacco Inc., [2]Intellectual Property Center, Japan Tobacco Inc., [3]Tobacco Business Headquarters, Japan Tobacco Inc.)

【目的】 α2,3-シアル酸転移酵素は、シチジン-5'-モノホスフォ-*N*-アセチルノイラミン酸（CMP-NeuAc）を糖供与体基質として、そのシアル酸残基を糖鎖の非還元末端ガラクトース、および *N*-アセチルガラクトサミン残基の 3 位水酸基に転移させる反応を触媒する。一般に、哺乳類由来のシアル酸転移酵素は糖受容体に対して厳密な基質認識を有している。しかしながら、我々が海洋性細菌から発見したα2,3-シアル酸転移酵素（*Photobacterium* sp. JT-ISH-224）は非常に幅広い基質特異性を有しており、例えばラクトースのグルコース残基やマンノースを糖受容体基質として認識してシアリルグルコースやシアリルマンノースを合成できる。これらの新たに転移活性が見出された基質は、共通構造として典型的な糖受容体であるガラクトース残基の 3 位と 4 位の水酸基の立体配置に相当する 1,2-*cis*-ジオールを有していた。そのため、この 1,2-*cis*-ジオール構造が本酵素必須の認識部位である可能性が示唆された。そこで、本酵素の稀な基質特異性をより詳細に理解することを目的として、六員環骨格と様々なパターンの 1,2-ジオール構造を併せ持つイノシトール類に対するシアル酸転移活性を評価することとした。
【方法及び結果】 イノシトール類は全9種類の異性体が存在する。しかしながら*cis*-イノシトールと*neo*-イノシトールの入手が困難であった。そのため、既存の報告例に従い化学合成を試みた。*cis*-イノシトールは Tetrahydroxy-1,4-quinoneを原料として、$Pd(OH)_2$を用いた接触還元により一段階にて合成した。一方、*neo*-イノシトールは*myo*-イノシトールを原料として、1,2-*trans*-ジオール部分をブタン-2,3-ジアセタール基にて保護し、位置選択的トリフレート化、ジメチルアセトアミドによる反転反応、最後に脱保護を行うことにより合成した。はじめに全9種類のイノシトールに対するシアル酸転移アッセイを試みた。その結果、予想通りガラクトースの3位と4位の水酸基の立体配置に相当する1,2-*cis*-ジオール構造を有する全てのイノシトール（7種類）に於いて、シアル酸転移生成物を与えていることが示唆された。次いで、ミリグラムスケールにて各々の反応を試み生成物の構造解析を行った。1,2-*cis*-ジオール構造を1カ所のみに有する*myo*-, 1D-*chiro*-, *muco*-イノシトールは、ガラクトースの3位にあたるエクアトリアル水酸基にシアル酸が転移していることが確認された。また2カ所に1,2-*cis*-ジオール構造を持つ*epi*-イノシトールを基質として用いた場合は、モノシアロシドがひとつ得られていることが判明した。現在、2カ所以上の1,2-*cis*-ジオール構造を有する他のイノシトール類から合成されたシアロシドの構造解析を進めている。

Sialyltransferase, Substrate Specificity, inositol

講演番号：3A32p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ A校舎32会場

ヒトER α-1,2 mannosidase Ⅰの *in vitro* におけるマンノース遊離活性の性状

In vitro mannose trimming property of human ER α-1,2 mannosidase Ⅰ

○相川　順一[1]、松尾　一郎[2]，伊藤　幸成[1,3]（[1]理研・基幹研、[2]群馬大院・工、[3]ERATO・JST）
○Jun-ichi Aikawa[1], Ichiro Matsuo[2] and Yukishige Ito[1,3]（[1]RIKEN Advanced Science Institute, [2]Graduate School of Engineering, Gunma University, and [3]ERATO, JST）

【目的】 ER α-1,2 mannosidase Ⅰはアスパラギン結合型糖鎖 $Man_9GlcNAc_2$ から、主にB鎖のα-1,2結合したマンノースを遊離させる酵素である。一方、ER で最終的に正しく折り畳まれなかった糖蛋白質は、その糖鎖のマンノースがより多く刈り込まれ、ER-associated degradation(ERAD)へと導かれる。しかし、ERAD へと導かれた糖蛋白質において、ER α-1,2 mannosidase Ⅰが複数のマンノースを刈り込む主体であるという直接的な証拠は示されていなかった。昨年度の大会においてER α-1,2 mannosidase Ⅰ が1時間の反応で $Man_9GlcNAc_2$-PA を $Man_{6-5}GlcNAc_2$-PA にまで刈り込む活性を報告した。また、$Man_9GlcNAc_2$ の糖鎖構造を有するウシチログロブリン及びダイズ凝集素を基質とした反応では、基質を変性条件にさらした方が、より多くのマンノースを刈り込む傾向をヒト ER α-1,2 mannosidase Ⅰは示した[1)]。そこで、本研究では非還元末端にグルコースを有する糖鎖及び糖蛋白質上の糖鎖に対する ER α-1,2 mannosidase Ⅰの作用を解析し、上記課題のさらなる解明を目指した。

【方法】 ヒトER α-1,2 mannosidase Ⅰの触媒領域を大腸菌で発現させ、可溶型酵素として調製した。イムノグロブリンＹ（ニワトリIgG）より糖鎖を単離後、ピリジルアミンで標識し、$GlcMan_9GlcNAc_2$-PAを得た。得られた$GlcMan_9GlcNAc_2$-PAと酵素標品との反応を行った後、HPLCで分離し、糖鎖の分子種の同定を行った。また、イムノグロブリンＹ及び*Aspergillus oryzae* β－ガラクトシダーゼを尿素あるいは加熱処理に供した。得られた糖蛋白質と酵素標品との反応を行った後、その反応産物から切り出した糖鎖を2-アミノピリジンで標識後、HPLCで分離した。

【結果】 まず、ヒトER α-1,2 mannosidase Ⅰは $GlcMan_9GlcNAc_2$-PA を基質として1時間の反応で少なくとも $GlcMan_{8B}GlcNAc_2$-PA へと分解する活性を示した。次に、$GlcMan_9GlcNAc_2$ の糖鎖構造を有するイムノグロブリンＹを基質とした反応を解析した。その結果、未変性状態のイムノグロブリンＹではヒトER α-1,2 mannosidase Ⅰによるマンノースの遊離はほとんど起こらなかったが、加熱処理したイムノグロブリンＹからはヒトER α-1,2 mannosidase Ⅰによるマンノースの遊離が検出された。従って、ER α-1,2 mannosidase Ⅰが ER においては糖蛋白質の折り畳み状態に依存して酵素活性を発揮することで、ERAD に寄与する可能性が示された。

1) J. Aikawa, I. Matsuo & Y. Ito *Glycoconjugate J.* in press

<Key words> *N*-glycosylation, mannose, pyridylamination

講演番号：3A32p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ A校舎32会場

N-結合型・*O*-結合型糖鎖改変出芽酵母株の開発

Development of *S. cerevisiae* strains engineered *N*- and *O*-glycan

○冨本 和也[1]、藤田 康子[1]、千葉 靖典[2]、地神 芳文[2]、仲山 賢一[3]、中島 芳浩[1]、安部 博子[1]
([1]産総研・健康工学、[2]産総研・糖鎖医工学、[3]産総研・生物プロセス)
○Kazuya Tomimoto[1], Yasuko Fujita[1], Yasunori Chiba[2], Yoshifumi Jigami[2], Kenichi Nakayama[3], Yoshihiro Nakajima[3], Hiroko Abe[1]
([1]AIST, Health Research., [2]AIST, Medical Glycoscience., [3]AIST, Bioproduction Research)

出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）は、組換え糖タンパク質の大量かつ迅速な生産のための宿主として期待されている。しかし、出芽酵母の *N*-結合型糖鎖はヒトに対して高い抗原性を示す糖外鎖を持つため、組換え糖タンパク質を医薬品原料として利用するためには酵母型糖鎖をヒト型糖鎖へ改変する必要がある。我々はこれまでに、この糖外鎖が付加されないようにマンノース転移酵素遺伝子（*OCH1, MNN1*）及びマンノースリン酸化酵素遺伝子（*MNN4*）を破壊した TIY20 株（*N*-結合型糖鎖構造：$Man_8GlcNAc_2$ M8 糖鎖と略称）に不均衡変異導入法を摘要することによって、TIY20 株が示す増殖能およびタンパク質の生産性の低下を回復させた YAB100 株を開発することに成功している。不均衡変異導入法は、DNA 複製時に機能する DNA ポリメラーゼの校正機能を調節することによって、対象生物のゲノム中に致死性を伴わない変異をランダムに導入することができる新規の育種技術である。さらに、YAB100 株に *Aspergillus saitoi* 由来の α-1,2-マンノシダーゼ遺伝子を導入することにより、M8 糖鎖より 3 つのマンノシル基を除去し、ヒト複合型・混成型糖鎖の中間体となる $Man_5GlcNAc_2$ 糖鎖（M5 糖鎖と略称）を主に合成する YFY20 株を新たに開発することに成功した。

一方、*O*-マンノース型糖鎖は生産タンパク質の立体構造の変化や分泌障害を引き起こすことが知られている。*O*-マンノース型糖鎖付加を抑制することが高品質・高収量の組換えタンパク質生産につながるため、上記 YFY20 株の *O*-マンノース転移酵素遺伝子（*PMT*）の破壊を試みた。その結果作出された YFY20 株の *pmt1* 破壊株 YFY21 では *O*-マンノース型糖鎖の減少が認められたものの、著しい増殖能の低下および温度感受性を示した。そこで不均衡変異導入法を本株に適用したところ、増殖回復株 YFY22 を取得することに成功した。この YFY22 株にさらに *pmt2* 破壊・不均衡変異導入を行うことにより、M5 糖鎖を合成する *pmt1, pmt2* 破壊株 YFY24 を取得したが、本株の *N*-結合型糖鎖種は M5 から M8 に戻っていた。そこで YFY24 株に α-1,2-マンノシダーゼ遺伝子を再導入したところ、M5 型糖鎖種を主に合成させることができた。これにより、従来困難とされていた *N*-結合型・*O*-結合型両糖鎖構造を改変した酵母株を開発することに初めて成功した。この研究は平成 21 年度産業技術研究助成事業によって助成されている。

Saccharomyces cerevisiae, glycoprotein, humanized sugar chain

講演番号：3A32p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ A校舎32会場

ビオチンリンカーに結合したコンドロイチン硫酸オリゴ糖の合成と糖-Midkine 間の相互作用

Synthesis ofchondroitin sulfateoligosaccharides having biotin linker and the interaction with Midkine

○武田 尚子、川野 愛美[1]、加藤 早紀[1]、灘中 里美[2]、北川 裕之[2]、田村 純一[1]（鳥取大院工・化、[1]鳥取大地域・地域環境、[2]神戸薬大・生化学）

○Naoko Takeda, Manami Kawano[1], Saki Kato[1], Satomi Nadanaka[2], Hiroshi Kitagawa[2], Jun-ich Tamura[1](Graduate school, Tottori University, [1]Tottori University, [2]Kobe Pharm. University)

【目的】コンドロイチン硫酸は、β-グルクロン酸（β-GlcA）とβ-N-アセチルガラクトサミン（β-GalNAc）で構成された二糖単位の繰返し構造をもつ。また、構成糖の水酸基に結合する硫酸基の数や位置の違いによって、様々な硫酸化パターンを与える。コンドロイチン硫酸によって発現される生理活性には、この硫酸化パターンが密接に関係してくる。一方、天然に存在するコンドロイチン硫酸は、硫酸化パターンの異なる二糖単位の共重合体であるため、天然から単一な硫酸化パターンで構成されたコンドロイチン硫酸オリゴ糖を得ることはたいへん困難である。そのため、特異な生理活性を与えるコンドロイチン硫酸オリゴ糖の構造活性相関を知るためには、特定の硫酸化パターンをもつコンドロイチン硫酸オリゴ糖を化学合成によって正確に得る必要がある。本研究では、いくつかの硫酸化パターンをもつコンドロイチン硫酸四糖を化学合成し、糖鎖の微細構造がMidkineとの相互作用に与える影響を明らかにすることとした。

【方法・結果】β-GalNAc-β-GlcAからなる二糖ユニット間の縮合により効率的にコンドロイチン硫酸四糖骨格を得た。コンドロイチン硫酸とMidkineとの相互作用を確認する方法として、BIACOREシステムを使用する。そのため、コンドロイチン硫酸四糖の還元末端に水溶性リンカーを導入し、その末端をビオチン化することによって、糖鎖を固相担体に保持できるように設計した。このようにして得られたコンドロイチン硫酸の硫酸化パターンの違いによって、Midkineとの相互作用に有意な差がみられたため報告する。

Chondroitin sulfate, Oligosaccharide synthesis, Midkine

講演番号：3A32p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ A校舎32会場

昆虫細胞におけるシアル酸代謝の特徴について

Metabolism of sialic acids in insect cells

○北島 健[1,2]、藤田 明子[1]、小林 隆史[1,2]、呉　迪[1,2]、Garenaux Estelle[1]、濵口香代[1,2]、郷 慎司[1,2]、佐藤 ちひろ[1,2]（[1]名大・生物機能セ、[2]名大院・生命農学）

○Ken Kitajima[1,2], Akiko Fujita[1], Takashi Kobayashi[1,2], Di Wu[1,2], Estelle Garenaux[1], Kayo Hamaguchi[1,2], Shinji Go[1,2], Chihiro Sato[1,2] ([1]BBC; [2]Grad Sch Bioagr Sci, Nagoya Univ)

昆虫細胞は生産性の高さに加えて糖鎖付加能力をもつ点で、糖タンパク質の産生における優位性がある。一方、昆虫細胞におけるシアル酸含有糖鎖の産生については、先駆的な応用研究が多数あるものの、シアル酸代謝の見地からは未解明な点が多い。シアル酸の存在は脊椎動物において普遍的であるが、無脊椎動物においては、後口動物および前口動物の一部に限局しており、前口動物の昆虫におけるシアル酸の存在は進化系統的に特異である。我々は昆虫細胞に糖鎖工学的な有用性を付加することを視野に、昆虫におけるシアル酸の代謝の特徴を解明することを目的として研究を進めている。

シアル酸 (Sia) は*N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)、*N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc)、デアミノノイラミン酸 (Kdn) に大別され、さらに水酸基に対する種々の修飾によって高度な構造多様性をもつ。これらの多様な構造はNeu5AcまたはKdn単糖を起点として生合成される。昆虫におけるNeu5AcとKdnの生合成に関わる酵素に着目して、それらの遺伝子の存在をデータベース検索し、遺伝子発現を調査するとともに、実際に組換え体酵素を調製して活性の有無、基質特異性の解析を行った。これまでに数種の昆虫細胞について、シアル酸 9-リン酸合成酵素、CMP-シアル酸合成酵素、シアル酸-ピルビン酸リアーゼの活性を測定した結果、活性の消失および強弱変化、基質特異性の変化が起こっていることを見いだした。

sialic acid, insect, metabolism

講演番号：3A32p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ A校舎32会場

Photobacterium sp. JT-ISH-224 由来α2,3-sialyltransferaseの受容体基質特異性の解析

Analysis of receptor substrate specificity of α2,3-sialyltransferase from *Photobacterium* sp. JT-ISH-224

○岡　修平、山本　岳[1]、峯　利喜[2]、村田　健臣（静岡大・農・応生化、[1]日本たばこ産業・たばこ事業本部・製品科学部、[2]日本たばこ産業・糖鎖ビジネスユニット）

○Shuhei Oka, Takeshi Yamamoto[1], Toshiki Mine[2], Takeomi Murata (Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [1]Department of Products Science, Tobacco Div., Japan Tobacco Inc., [2]Glycotechnology Business Unit, Japan Tobacco Inc.)

【目的】シアル酸は、細胞表面にある糖タンパク質や糖脂質など、複合糖質糖鎖の末端に存在し、細胞と細胞間の情報伝達や癌化、免疫、ウイルス感染など様々な生体機能の制御に関与している。そして、シアル酸の転移はシアル酸転移酵素によって行われ、海洋性細菌由来のものは動物由来のものとは異なった基質特異性をもっている。しかし、その基質特異性は十分には明らかになっていない。そこで、本研究では、海洋性細菌である *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 由来の α2,3-sialyltransferase を様々な硫酸化糖基質に用いてその基質特異性を解明することを目的とした。

【方法】受容体基質となる硫酸化単糖配糖体である6SGalβ-*p*NP、6SGalNAcβ-*p*NP、6SGlcβ-*p*NP、6SGlcNAcβ-*p*NPを合成した。その後、*Photobacterium* sp. JT-ISH-224 由来α2,3-sialyltransferaseによる転移反応を行い、HPLCで経時変化を解析した。その結果、シアル酸が転移したとみられる6SGalβ-*p*NP及び6SGalNAcβ-*p*NPが検出されたので、HPLCで目的物のピークが変化しなくなったのを確認後、煮沸により反応を停止させた。反応液を遠心分離機にかけCMPを除去後、ODSカラムに供して分離した。その後、NMR及びMSで構造解析を行った。

【結果】6SGalβ-*p*NP及び6SGalNAcβ-*p*NPを受容体基質として用いた場合、本酵素はシアル酸を転移することが示唆された。また、構造解析の結果、それぞれの転移反応生成物がNeu5Acα2,3Gal6Sβ-*p*NP、Neu5Acα2,3GalNAc6Sβ-*p*NPであることが明らかとなった。

Keyword1, Keyword2, Keyword3　Sialyltransferase, Sialic acid, Sulfated carbohydrate

講演番号：3A32p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ A校舎32会場

シアリルオリゴ糖鎖含有デキストリンナノ粒子の合成およびインフルエンザウイルスとの結合能評価

Chemoenzymatic-synthesis of dextrin-based sialo-oligosaccharide and the binding affinity against influenza virus

○杉山 尚弘[1]、梅村 征一郎[1]、尾形 慎[2]、渡邊 浩史[3]、柳瀬 美千代[3]、鷹羽 武史[3]、碓氷 泰市[1,2]
([1]静岡大農・応生化、[2]静岡大・創科技院、[3]江崎グリコ(株)健康科学研)
○Naohiro Sugiyama[1], Seiichiro Umemura[1], Makoto Ogata[2], Koji Watanabe[3], Michiyo Yanase[3], Takeshi Takaha[3] and Taichi Usui[1,2]([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]Institute of Health Sciences, Ezaki Glico Co., Ltd,)

【目的】本研究では、酵素法により構築されたデキストリン骨格の分岐末端をグルクロン酸修飾した生体適合性新規デキストリンナノ粒子（DNP）に対し、インフルエンザウイルスの感染および接着に関与するシアリルオリゴ糖鎖を導入することで、新規インフルエンザウイルス感染阻害剤の開発を目指している。
【方法および結果】始めに、*N*-アセチルラクトサミン（LacNAc）をβ-グリコシルアミノ化後、スペーサー部（4-trifluoroacetoamidobutanoic acid）と縮合し、N結合型二糖配糖体{*N*-(γ-trifluoroacetoamidobutyryl)β-LacNAc}を合成した。次に、合成したLacNAc配糖体のアグリコン部を脱アシル化し*N*-(γ-aminobutyryl)β-LacNAcを得た。続いて、分岐末端グルクロン酸修飾率の異なる高分子量タイプおよび低分子量タイプのDNPs（計5種類）に対して、縮合試薬を用いて配糖体を導入し、各種LacNAc含有アシアロ型デキストリンナノ粒子を合成した。最後に、本アシアロ型デキトリンナノ粒子を受容体基質、CMP-Neu5Acを供与体基質としてα2,6-シアリルトランスフェラーゼを用いることで、Neu5Acα2,6LacNAc含有シアロ型デキストリンナノ粒子の合成に成功した。これらをNMR法および化学-酵素分解法を用いた構成糖分析により構造決定した結果、DNPsの非還元末端グルクロン酸残基への定量的な配糖体導入と非還元末端ガラクトース残基への位置選択的なシアリル化を確認した。また動的光散乱法により、本DNPsの粒子サイズを測定した結果、その粒子径はおよそ15-40 nmでありナノ粒子として特性を有していた。
　さらに、これら一連のアシアロ型及びシアロ型DNPsをヒト型インフルエンザウイルス{A/Beijing/262/95 (H1N1)}に対する赤血球凝集阻害試験に供した結果、構造特異的な赤血球凝集阻害効果が確認された。また、DNPsの分子量（粒子径）及びシアロ糖鎖導入率と赤血球凝集阻害活性との間に相関が確認された。結果として、今回合成した中で分子量（粒子径）が大きく、シアロ糖鎖導入率が高いシアロ型デキストリンナノ粒子が最も強い凝集阻害活性（pMレベル）を示した。

glyco-nanoparticle, multivalent effect, influenza virus

講演番号：3A32p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ A校舎32会場

フコシル三糖及び五糖含有新規4価配位体の合成

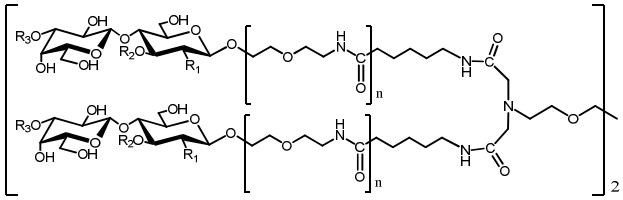
Synthesis of novel tetravalent ligands containing fucosyl-triose or pentaose

○森 大地[1]、尾形 慎[2]、朴 龍洙[2]、碓氷 泰市[1,2]（[1]静岡大農・応生化、[2]静岡大・創科技院）

○Daichi Mori,[1] Makoto Ogata,[2] Enock Y. Park,[2] and Taichi Usui[1,2]([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】我々はこれまでに、キレート分子（EGTA）を構造基盤とした4価糖鎖配位体の酵素化学合成法を確立すると共に、それらの標的タンパク質に対する架橋複合体形成能およびその形成メカニズムを明らかにしてきた。[1] そこで本研究では、本概念を糖鎖 - 糖鎖相互作用に適用することを目的として各種4価LewisX（Le^X; Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAc）配位体の合成を試みた。

【方法・結果】始めに、Le^X糖鎖合成において必須酵素であるα1,3-フコシルトランスフェラーゼの発現系構築を試みた。方法は、ヒト胎児脳cDNAライブラリーを鋳型としたPCRにより、膜貫通領域を除去したヒト由来 α1,3-フコシルトランスフェラーゼVI（FUT6）遺伝子を増幅し、カイコ由来bombixin分泌シグナル配列、FLAGタグ配列を含む融合遺伝子を構築した。続いて、これら融合遺伝子を挿入した組み換えBmNPVバクミドを作製し、カイコ幼虫に注射した。約1週間飼育し、体液を採取することで、目的の組換えFUT6を約300 mU/mLで得た。次に、本組換え酵素等を利用して4価Le^X配位体の合成を試みた。方法は、5-trifluoroacetamidopentyl β-lactose及び-LacNAc（Galβ1,4GlcNAc）受容体基質に対して各種糖転移酵素（β3GnTII・β4GalTI・FUT6）を用いて糖鎖付加反応を行うことで、Le^X配糖体およびlacto-*N*-fucopentaoseIII {LNFPIII; Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc} 配糖体をそれぞれ収率約86%および70%で得た。続いて、これら3糖および5糖配糖体のアグリコン部末端を脱アシル化後、本配糖体とEGTAの四つのカルボキシ基とを縮合試薬を用いて縮合し、糖鎖部位の異なる2種類のLe^XおよびLNFPIII4価配位体（**1**および**2**）をそれぞれ収率約50%で得た。また、スペーサー延長型4価LacNAc配位体をフコシル化することにより、スペーサー部の長さの異なるLe^X4価配位体（**3**）も収率約49%で合成した。今後これら4価糖鎖配位体は、Le^X-Le^X相互作用解析およびフコース認識レクチンとの相互作用解析などに対する糖鎖プローブとして利用する予定である。



1: n = 0, R_1 = NHAc, R_2 = Fuc, R_3 = H
2: n = 0, R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = Le^X
3: n = 1, R_1 = NHAc , R_2 = Fuc, R_3 =H

1) R. Masaka, et al, *Bioorg. Med. Chem.*, ***18***, 621-629 (2010).

fucosyltransferase, lewis X, lacto-*N*-fucopentaose III

講演番号：3A32p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ A校舎32会場

ムラサキヒトデに由来する新奇ガングリオシドGAA-7の合成研究

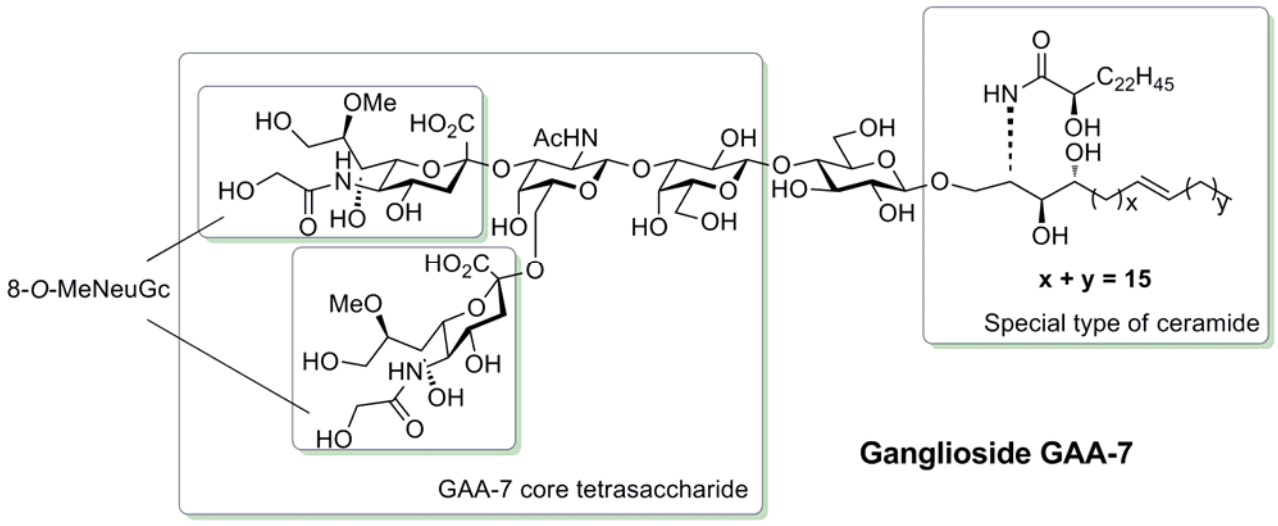
Synthetic Study on Novel Ganglioside GAA-7 from Starfish *Asterias amurensis versicolor*

○玉井秀樹[1]、安藤弘宗[1]、石田秀治、木曽 真[1]（岐阜大・応用生物、[1]京大・iCeMS）
○Hideki Tamai[1], Hiromune Ando, Hideharu Ishida, Makoto Kiso (Gifu Univ., [1]iCeMS)

【目的】近年、無脊椎動物から多くの糖脂質成分が見出されてきている。なかでも、ウニ、ナマコ、ヒトデといった棘皮動物には、ガングリオシド成分が豊富に含まれ、医薬品資源や創薬シーズとしての応用が期待されている。これら海洋生物由来のガングリオシドはマウス副腎髄質由来褐色腫（PC12）に対し、神経成長因子（NGF）存在下、強力な神経突起進展増強活性を示すことが知られている。また、棘皮動物由来のガングリオシドはいずれも複雑でユニークな構造を持つことも報告されている。本研究では、ムラサキヒトデより単離・構造決定されたガングリオシドGAA-7 [1]の化学合成を目指した。

【方法】ガングリオシドGAA-7は、五糖からなる糖鎖部分と特殊なセラミドにより構成される。GAA-7の最大の特徴構造は、シアル酸残基に見られる8位水酸基の修飾構造（8-*O*-MeNeuGc）である。さらに、この修飾型シアル酸残基がガラクトサミンの3位、および6位に結合して分岐型三糖を形成し、この三糖が哺乳類型ガングリオシドと同様にラクトシルセラミドと結合している。そこで、本合成研究では、非還元末端のコア四糖を構築し、その後、当研究室で確立したグルコシルセラミドカセットアプローチによりガングリオシド骨格を合成することとした。

【結果】*N*-Trocシアル酸誘導体を原料とし、9位にクロロアセチル基を有するシアル酸誘導体を合成後、クロロアセチル基を選択的に除去し、アシル基の分子内転移を利用して8位水酸基を遊離とし、8位水酸基の修飾構造を構築して新規シアル酸供与体の合成を達成した。また、内部ガラクトサミニルガラクトースユニットとの二点同時シアリル化により、GAA-7コア四糖の構築に成功した。さらに、コア四糖供与体とグルコース受容体との縮合により、GAA-7糖鎖構造の合成を達成した。



[1] R. Higuchi *et al*. *Liebigs Ann*. *Chem*. **1993**, 359-366.

Ganglioside, GAA-7, 8-*O*-MeNeuGc

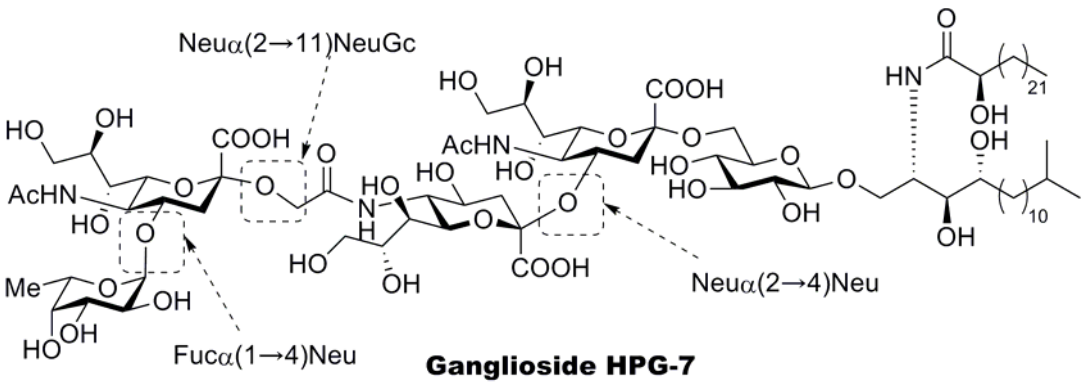
講演番号：3A32p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ A校舎32会場

トラフナマコに由来する新奇生理活性ガングリオシドHPG-7の全合成

The First Total Synthesis of Novel Bioactive Ganglioside HPG-7

○岩山 祐己[1]、安藤 弘宗[1]、石田 秀治、木曽 真[1]（岐阜大・応用生物、[1]京大・iCeMS）
○Yuki Iwayama[1], Hiromune Ando[1], Hideharu Ishida, Makoto Kiso[1] (Gifu Univ., [1]iCeMS)

【目的】海洋生物に由来するガングリオシド類の多くは、マウス副腎髄質由来褐色細胞(PC12)に対し、強力な神経突起伸長作用を示すことが知られており、それらガングリオシドの分子構造は非常に複雑かつ多様であることが近年の研究により明らかとなってきた。本研究では、トラフナマコから発見された新たなガングリオシド成分である、HPG-7の全合成を目指した。
【方法】HPG-7の持つ糖鎖は、他のガングリオシドには見られない、残基間の結合様式が全て異なるシアル酸三量体を内部に有し、かつその三量体の終端にフコースが結合するという特殊な構造である。さらに、セラミドにもα-ヒドロキシ脂肪酸や末端分岐アルキル鎖などの特異な部分構造がある。このようなユニークな構造を持つHPG-7を合成するに当たり、まずは糖鎖骨格の構築に向け、HPG-7の五糖骨格をグリコリルアミド部分で分断し、非還元末端二糖と還元末端三糖をそれぞれ合成し、最後にアミド結合形成により五糖とすることとした。また、セラミド部分は、マンノース誘導体やエポキシドの立体配置を活用して合成を行うこととした。最後に糖鎖とセラミドの縮合を行うことにより、HPG-7の合成を目指した。
【結果】非還元末端二糖のシアリルグリコール酸ユニットは、糖供与体、糖受容体の両方の点で有用とされる*N*-Trocシアル酸を用い、グリコール酸の導入および4位をフコシル化することにより効率的に合成した。また、還元末端三糖は、5-アジドシアル酸供与体と、シアル酸9位をピバロイル基で保護したラクタム型シアリルグルコース受容体を用いることで、シアル酸二量体構造を効率よく構築した後、ラクタムを開環し、末端シアル酸5位をアミノ基へと変換することで合成した。以上の方法により得られた二糖ユニットと三糖ユニットをアミド結合形成反応に供し、五糖骨格を高収率で得ることに成功した。また、過去の類似化合物の合成例を参考にして、高収率でのセラミド合成を完了したのち、最後に得られた糖鎖とセラミドとの縮合反応、および脱保護反応を行うことにより、世界初のHPG-7全合成を達成した。



Ganglioside, Total syntheisis, HPG-7

講演番号：3A32p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ A校舎32会場

ニッポンウミシダ由来ガングリオシドCJP-2の合成研究

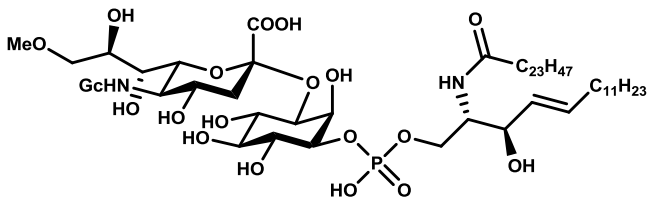
Synthetic study on Ganglioside CJP-2 from *Comanthus japonicus*

○水野　孝星、玉井　秀樹[1]、安藤 弘宗[1]、石田 秀治、木曽 真[1]（岐阜大・応用生物、[1]京都大・iCeMS）

○Takashi Mizuno, Hideki Tamai[1], Hiromune Ando[1], Hideharu Ishida, Makoto Kiso[1]（Gifu Univ., [1]iCeMS）

【目的】ここ10年の間に、ウニやヒトデなどの棘皮動物より哺乳動物由来ガングリオシドとは異なる構造を持ったガングリオシドが多数発見された。棘皮動物由来ガングリオシドはいずれも、ラット褐色腫由来細胞PC-12に対する神経突起進展作用を示し、中には哺乳動物由来ガングリオシドGM1と同等、もしくはそれ以上の活性を示すものも報告されている。そのため、各種神経疾患に対する医薬資源として注目されている。なかでも、ニッポンウミシダ(*Comonthus japonica*)より発見されたガングリオシドCJP-2は、NGF非存在下においても強い神経突起進展作用を有することが示唆されており、各種神経疾患治療薬のシード化合物として期待されている[1]。しかしながら、極微量成分のため生理活性評価に対する十分な資料を天然より供給することは困難であり、有機合成による均一かつ大量のガングリオシド供給が望まれている。そこで、本研究ではガングリオシドCJP-2の生理活性評価及び構造活性相関の解明を見据え、全合成に取り組んだ。

【方法・結果】ガングリオシドCJP-2は、9-メチル-N-グリコリルシアル酸と*myo*-イノシトールより成る糖鎖部分とセラミドが、リン酸エステル結合を介して繋がった特異な構造を有している。そこで、CJP-2を部分修飾シアル酸供与体、イノシトール受容体、リン酸部、セラミド部に分割し各ユニットを合成後、非還元末端より順次伸長させることとした。シアル酸供与体は、C-5位に選択的脱保護が可能な*N*-Troc基を導入した後、9位水酸基のみが遊離の化合物へと誘導し、MeOTfを作用させることにより高収率で9-メチルシアル酸供与体を得た。イノシトール受容体は、Bruzikらの手法[2]に従いスピロケタール形成による光学分割を行った後、ジオール型のイノシトール受容体へと導いた。得られたシアル酸供与体とシアリルイノシトール受容体とのグリコシル化をEtCN中NIS-TESOTfの存在下-80℃で行うことにより目的とするシアリルイノシトール骨格を68%(α：β = 10:1)の収率で得ることができた。CJP-2特異の短鎖スフィンゴシンを有するセラミドの合成も完了し、現在糖リン脂質骨格の構築を種々検討中である。



[1] Arao, K. *et al. Chem. pharm. Bull.* **2004**, *52*, 1140-1142.

[2] Bruzik, K. S. *et al. Carbohydr. Res.* **1989**, *195*, 67-73.

Ganglioside, CJP-2

講演番号：3A32p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ A校舎32会場

Siglec-2阻害剤の効率的合成法の開発

Development of anefficient synthetic method for Siglec-2 inhibitor

○菅沼 勇輝、岩山 祐己[1]、植木 章晴[1]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1]、石田 秀治、木曽 真[1]（岐阜大・応用生物、[1]京大・iCeMS）

○Yuki Suganuma, Yuki Iwayama[1], Akiharu Ueki[1], Akihiro Imamura[1], Hiromune Ando[1], Hideharu Ishida, Makoto Kiso[1] (Gifu Univ., [1]iCeMS)

【目的】糖鎖が機能的に働くためには、糖鎖を構造特異的に認識するレクチンの存在が重要である。生体内に存在するシアル酸認識型レクチンSiglec-2は、B細胞表面上に発現し、マウスにおいてはガラクトースとα2-6結合したNeu5Gcを、ヒトにおいてはガラクトースとα2-6結合したNeu5GcとNeu5Acをリガンドとして認識する。Siglec-2は、同一細胞上のシスリガンドを認識することでB細胞増殖抑制シグナルを放出し、免疫機能を抑制していると考えられている。したがって外因性のSiglec-2リガンドのミミックにより免疫機能の抑制を解除し、活性化することが可能であると予想される。本研究室では、Siglec-2に対して顕著な阻害活性を持つ化合物 (GSC-718) を報告しているが[1] 、in vivo試験のための大量合成や、より強力な阻害活性を持つ化合物を得るための構造展開を行う上で、種々の合成上の問題点が存在している。そこで本研究では、GSC-718の合成経路を再点検し、大量合成や種々の類縁体への拡張に向けた効率的な合成経路を確立することとした。

【方法・結果】従来法で最も問題となったのは、シアル酸のグリコシド化反応によるアグリコン導入段階であり、特に、目的物 (α体) と副生成物 (β体、2,3-ene体) の分離が非常に困難であった。そこで、グリコシド化反応後の反応混合物から、1,5-ラクタム化反応によって、α体のみを分離する手法を応用することで改善を図った。まず始めに、シアル酸の*N*-TFA誘導体9位選択的N_3化を行った後、Ac化を行うことで9-N_3-シアル酸供与体を合成した。次にこの供与体を用いて受容体とのシアリル化反応を行った後、ゲルろ過クロマトグラフィーより過剰の試薬を除いた粗精製物をラクタム化 (NaOMe, MeOH, reflux) に供した。予想通りラクタム化はα体特異的に進行し、遊離のアミノ基を有するβ体、2,3-ene体と容易にシリカゲルカラムクロマログラフィーで分離することができた。単離したラクタム体は、Ac化、選択的脱*N*-Ac化、*N*-Boc化を経た後、ラクタムを開環させた。次に、N_3基の還元および9位アミド形成を行った後、脱*N*-Boc化、*N*-アセトキシアセチル化を行うことで目的化合物の骨格構造を得ることに成功した。最後にこの化合物を脱保護することにより目的化合物を得ることに成功した。この新規合成経路では、各反応段階の収率も高く、かつ精製も容易となったため、従来経路よりも効率的に目的化合物を合成することが可能になった。

[1] H. H. M. Abdu-Allah, K. Watanabe, K. Hayashizaki, C. Takaku, T. Tamanaka, H. Takematsu, Y. Kozutsumi, T. Tsubata, H. Ishida, M. Kiso, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 5573-5575.

Sialylation, Lactamization

講演番号：3A32p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ A校舎32会場

LPS/LOSに存在するKdo２糖の合成：Kdo供与体の反応性

Synthetic study of Kdo dimer, Kdo(2-4)Kdo

一柳 剛，○大柿 敦嗣，Yi Ruiqin[1]，庄野 結大，島田 麻衣[1]（鳥取大・農，[1]鳥取大院・農）
Tsuyoshi Ichiyanagi, ○Atsushi Ogaki, Ruiqin Yi[1], Keita Shono, Mai Shimada[1], (Tottori Univ.)

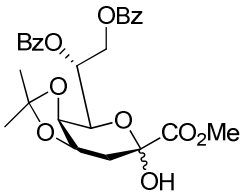
【目的】

2-Keto-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid (Kdo)はグラム陰性細菌が細胞外膜に産生するリポ多糖(LPS)/リポオリゴ糖(LOS)の構成糖であり，多糖(PS)/オリゴ糖(OS)と Lipid A との架橋部に 1～3 分子の形で存在する。我々は Kdo 糖鎖合成に向けた合成中間体の設計と合成に取り組んでおり，これまでにマンノースから 4，5；7，8 位に異なる保護基を有する中間体 methyl (7,8-di-*O*-benzoyl-4,5-*O*-isopropyliden-D-*manno*-2-octulopyranose)onate **1** の合成と，Kdo２糖 [Kdo(α2-4)Kdo] **2** の合成を報告した．[1]しかし本合成では収率，選択性について改善の余地があった．本研究では反応条件の最適化による Kdo 中間体 **1** までの収率の改善および脱離基の異なる糖供与体を作成し，グリコシル化における Kdo 供与体の反応性，選択性などの化学的性質を明らかにすることを目的とした．

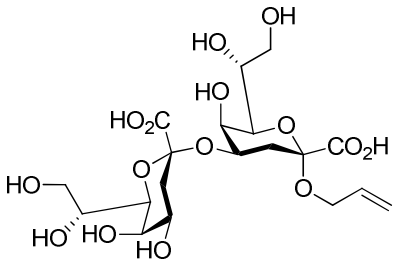
【方法と結果】

5,6-di-*O*-benzoyl-2,3-*O*-isopropylidenemannofranose から Wittig 反応による２炭素伸長，得られた不飽和エステルのオスミウム酸化，次いで環状亜硫酸エステルを経由したピラノース環への変換により 5 工程で合成中間体 **1** を合成した．ジヒドロキシル化反応では触媒量を 2 mol%から 4 mol%に増やすことで定量的に酸化することができた．またピラノース環構築では反応温度を適切に制御することが必要であることが明らかになった．

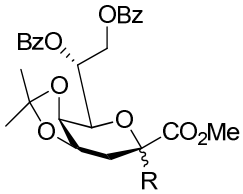
この中間体をそれぞれフッ化糖 **3**，チオグリコシド体 **4**，トリクロロアセトイミデート体 **5** へと変換した．またアノマー水酸基をアリル化した後4,5位の脱保護を行い受容体へと変換した．これらを用いたグリコシル化を検討しており得られた知見を報告する．



1



2



3: R = F
4: R = STol
5: R = $OC(=NH)CCl_3$

[1] Ichiyanagi T. *et.al. Tetrahedron*, **2011**, 67, 5964-5971

Kdo, LPS, glycosylation

講演番号：3A32p17
講演日時、会場：3月24日17:15～ A校舎32会場

共通の中間体を用いたLPSに含まれるKdo2糖[Kdo(α2-8)Kdo]の合成

Synthesis of dimeric Kdo, Kdo(α2-8)Kdo by using a common Kdo derivative.

一柳 剛，○庄野 結大，大柿 敦嗣，島田 麻衣[1]（鳥取大・農，鳥取大院・農[1]）
Tsuyoshi Ichiyanagi, ○Keita Shono, Atsushi Ogaki, Mai Shimada, (Tottori Univ.)

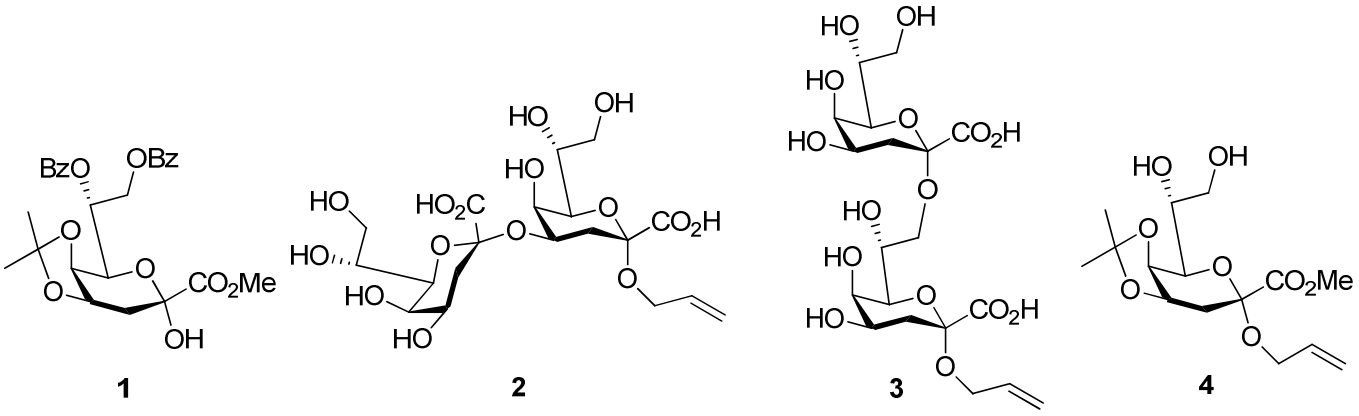
【目的】

2-Keto-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid (Kdo)はグラム陰性細菌が細胞外膜に産生するリポ多糖(LPS)の構成糖であり、多糖(PS)と Lipid A との架橋部にα2-4 またはα2-8 結合した 1～3 分子の形で存在する。これらの Kdo 糖鎖構造は細菌表層にのみ存在するが機能は明らかにされていない。我々は Kdo 糖鎖の合成を行っており、これまでに共通の鍵中間体 **1** の合成と Kdo2 糖[Kdo(α2-4)Kdo]**2** の合成を報告した。[1]本研究では共通の鍵中間体を利用してα2-8 結合を有する Kdo2 糖[Kdo(α2-8)Kdo]**3** の合成を試みた。

【方法と結果】

共通の鍵中間体 methyl (7,8-di-*O*-benzoyl-4,5-*O*-isopropyliden-D-*manno*-2-octulopyranose)onate **1** はマンノースから 10 段階で合成した。この化合物のアノマー水酸基をパラジウム触媒とアリル炭酸エステルによりアリル化し、7,8 位の安息香酸エステルを加メタノール分解することによって収率良くジオール体 **4** へと変換した（収率 57 %）。一方アノマー水酸基をフッ素またはアリールチオ基に変換し供与体とした。これらを用いてグリコシル化反応またはヨードアルコキシル化反応を行うことにより Kdo２糖の合成を達成した。

得られた２糖の構造は 2D NMR および質量分析のデータを解析することによりα2-8 結合であることを決定した。また、全ての保護基を除去することにより既知物質へと誘導し、^{13}C NMR データを文献値と比較することにより確認した。現在、収率および選択性の改善に向けた反応条件の最適化を行っており、得られた知見を報告する。



[1] Ichiyanagi T. *et.al. Tetrahedron*, **2011**,*67*,5964-5971

LPS,glycosylation,Kdo

講演番号：3A32p18
講演日時、会場：3月24日17:26～ A校舎32会場

LPS/LOS の分岐酸性コア 3 糖コンジュゲート前駆体の合成

Synthesis of a glycoconjugate precursor containing in acidic core oligosaccharide expressed in LPS/LOS

一柳 剛[1]，○島田 麻衣，福永 真弓，山崎 良平[1]，（鳥取大院・農，[1]鳥取大・農）
Tsuyoshi Ichiyanagi[1], Mai Shimada, Mayumi Fukunaga, Ryohei Yamasaki[1] (Tottori Univ.)

【目的】

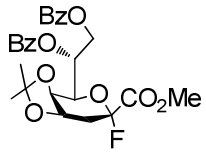
グラム陰性細菌は細胞外膜に多糖(PS)が Lipid A に結合したリポ多糖(LPS)を産生する。PS と Lipid A との架橋部には 1ー3 分子の酸性 8 炭糖 2-Keto-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid (Kdo)が普遍的に存在する。この Kdo 糖鎖を認識するヒト抗体の存在が山崎らによって見出され[1]，そのエピトープの解明が取り組まれている．我々はこれらに寄与するための Kdo 糖鎖合成に向けた Kdo 中間体の設計と Kdo 糖鎖合成に取り組んできた。昨年 LPS に共通に存在する Kdo 2 糖[Kdo(α2-4)Kdo]の合成を達成した．[2]本研究では分岐構造を有する Kdo3 糖の合成を目指した．

【方法と結果】

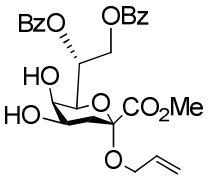
マンノースから 10 段階で合成した methyl 7,8-di-*O*-benzoyl-4,5-*O*-diisopropyliden-D-*manno*-oct-2-ulosonate **1** を DAST によるフッ素化により供与体を 81%(α/β=5:1)で、またパラジウム触媒を用いたアリル化、続く酸加水分解によりに受容体 **3** を 70%(α/β=5:1)で合成した。これらを三フッ化ホウ素エーテル錯体を活性化剤に用いて縮合することにより 2-4 結合を持つ 2 糖誘導体 **4** を合成した。続いてマンノヘプトースのトリクロロアセトイミデート誘導体を TMSOTf 触媒存在下この 2 糖と縮合することにより、収率 87%で 4,5-分岐構造の構築に成功した。さらに脱保護を行い 3 糖 **5** の合成を達成した。本合成はこれまで報告されている Paulsen らの方法より高収率で合成できた。

次に、Kdo 単糖、Kdo(α2-4)Kdo、Kdo(α2-8)Kdo、分岐 Kdo3 糖の糖鎖コンジュゲートを作成するために還元末端のアリル基を変換した。糖鎖とチオグリコール酸メチルを高圧水銀ランプ下で UV 照射(254 nm)して約 5 時間光反応を行い、サイズ排除カラムクロマトグラフィーによって精製しチオグリコール酸メチル付加体を収率 48−89%で得た。現在これら 4 種類の Kdo 糖鎖と樹脂とのコンジュゲート化を行っている。これらの取り組みと併せて報告する．

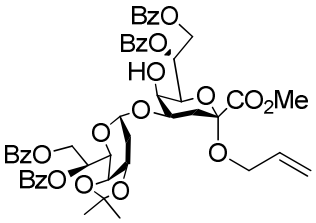
[1] R. Yamasaki, et. al. *Infect. Immun.* **2010**,3247-3257.
[2] T. Ichiyanagi, et. al. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 5964-5971



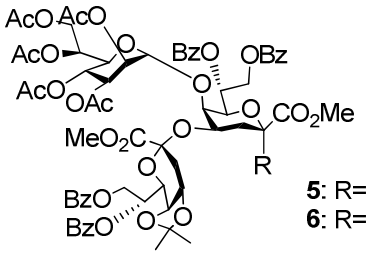
2



3



4



5: R= -$OCH_2CH=CH_2$
6: R= -$O(CH_2)_3SCH_2CO_2Me$

Keyword1 LPS, Keyword2 oligosaccharide, Keyword3 kdo

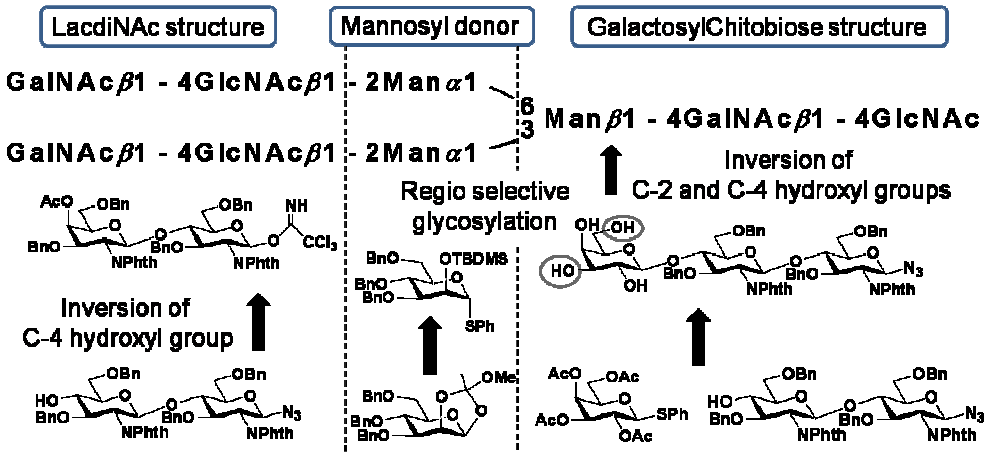
講演番号：3A32p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ A校舎32会場

LacdiNAc構造を有する複合型糖鎖の効率的合成

Synthesis of complex type *N*-glycan containing LacdiNAc structure

○宮沢 進平、真下竜也[1]、松尾 一郎（群馬大院・工、[1]群馬大・工）
○Shinpei Miyazawa, Tatsuya Mashimo, Ichiro Matsuo (Gunma Univ.)

【目的】有機化学的手法による糖鎖合成は均一構造の糖鎖を大量に供給可能であることから，糖鎖機能の解析に大きく貢献すると期待されている。しかし糖鎖合成は保護・脱保護など多工程を要することや，グリコシル化における立体制御など解決すべき問題も多く，効率的な合成法の開発が望まれている。そこで我々は，近年その機能が注目されている LacdiNAc 構造を有する N 結合型糖鎖 9 糖を標的に，1）グリコシル化反応における位置選択性を制御することで無駄な保護・脱保護工程を省き，2）構築困難な立体配置であるβ-マンノシド結合の構築を 2 位水酸基の反転反応[1]により回避する、効率的かつ実践的な糖鎖合成を行うこととした。
【方法・結果】D-グルコサミン塩酸塩から10工程でキトビオース誘導体を合成した。これに対してガラクトース供与体をβ結合選択的に導入し，ガラクトシルキトビオースブロックへと導いた。マンノース供与体はオルソエステル体から，さらにLacdiNAcブロックはキトビオース誘導体の4位水酸基を反転させることにより合成した。以上，9糖構築に必要な各ブロックの合成が完了した。本発表では，LacdiNAc構造を有する9糖の構築に向けた，ガラクトシルキトビオースユニットに対するマンノース供与体のグリコシル化反応における位置選択性の制御，並びに水酸基の反転反応について検討した結果について報告する。



[1] I, Matsuo. et al., *J. Carbohydr. Chem. 18 (7)* 841-850 (1999).

N-Glycan, LacdiNac, glycosylation

講演番号：3C33a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ C校舎33会場

カーボンナノチューブへのアルカリホスファターゼの固定化

Immobilization of alkaline phosphatase on carbon nanotubes

○橋田 泰彦、梅山 有和[1]、今堀 博、橋田 充（京大・iCeMS、[1]京大院工・分子工）

○Yasuhiko Hashida, Tomokazu Umeyama[1], Hiroshi Imahori, Mitsuru Hashida (iCeMS, Kyoto Univ., [1]Dep. of Mol. Eng., Grad. Sch. of Eng., Kyoto Univ.)

【目的】カーボンナノチューブ(CNT)はユニークな電気的特性や優れた機体的強度、高い熱伝導性などの特徴を有したナノ炭素材料であり、生命科学分野においてもその高い電気伝導性を利用して酵素電極やバイオセンサーなどの開発が進められている。これらの研究において、CNTへの酵素の固定化はその性能を左右する重要な要素であり、酵素活性を保ったまま効率よく酵素を固定化する手法の開発が望まれている。CNTはその表面の疎水的性質やπ電子系のためにCNT間に強力な相互作用を形成し、バンドルと呼ばれる束状凝集物を形成する。CNTの特性を十分に発揮させるためには、この構造を解きCNTをばらばらに孤立分散させる必要がある。本研究では、我々が開発したCNT分散ペプチドを用いて分散されたCNTへの酵素の固定化方法を確立するとともに、その表面に固定化された酵素の機能性変化を確認することを目的として、アルカリホスファターゼ（ALP）をCNT表面に固定化し、その活性と熱安定性の変化について検討した。

【方法】CNT（HiPco, Unidym社製）1 mgにCys残基を含むCNT分散ペプチドを10 mg添加し、重水中で1時間超音波処理することによりCNT分散液を調製した。このCNT分散液を超遠心（200,000×g, 150分）してCNTバンドルを取り除いた後、透析（分画分子量100,000）して過剰なペプチドを取り除いた。この分散CNT 380 μgに対してマレイミド基導入ALP 10 μgを添加し、4℃で一晩反応させた。ALP活性の測定は、基質として*p*-nitrofhenyl phosphate（*p*NPP）を用いて行い、1 mM $MgCl_2$および20 μM $ZnCl_2$を含む50 mM Tris-HCl緩衝液中（pH8.5）で反応を行った。反応時のALP濃度は2.5 pg/mlとし、405 nmの吸光度を連続的に測定することによりリン酸エステルの加水分解に伴う*p*-nitrophenol（*p*NP）の生成を経時的に追跡した。

【結果】ALP結合CNTの分散液をろ過（孔径0.22 μm）した後に濾液のALP活性を測定したところ、濾液に含まれるALP活性は添加した全ALP量の8%程度となり、大部分のALPがCNTに固定化されていることが確認された。*p*NPP加水分解活性の基質濃度依存性を検討した結果、CNT固定化ALPと遊離ALPのV_{max}はそれぞれ12.9 nM/sと13.2 nM/s、K_mはそれぞれ70 μMおよび57 μMとなり、両者の間に大きな差は見られなかった。pH8.5のTris-HCl緩衝液中におけるALPの熱安定性について検討した結果、本条件下では遊離ALPの安定性は非常に低く、30分間の熱処理によってその活性が50%となる温度T_{50}は40℃と見積もられた。これに対してCNT固定化ALPのT_{50}は45℃と見積もられ、熱安定性が向上していることが確認された。これらの結果から、我々の開発したCNT分散ペプチドを用いて分散されたCNTは、大きな活性低下を伴わずにALPをその表面に固定化することが可能であり、しかも固定化がALPの安定性を向上させることを示した。

Carbon nanotubes, Alkaline phosphatase, Immobilization

講演番号：3C33a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ C校舎33会場

糸状菌界面活性蛋白質 RolA と固体表面間の相互作用機構の解析

Analysis of the interaction between *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA and solid surfaces

○田邊弘毅[1]、大類景子[1]、上原健二[1]、高橋徹[2,3]、冨樫貴成[4]、有田稔彦[4]、阿部敬悦[1,3]（[1]東北大院・生物産業創成、[2]酒総研・基盤、[3]東北大・未来研、[4]東北大・多元研）

○Hiroki Tanabe[1], Keiko Orui[1], Kenji Uehara[1], Toru Takahashi[2,3], Takanari Togashi[4], Toshihiko Arita[4], Keietsu Abe[1,3] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NRIB., [3]NICHe., Tohoku Univ., [4]IMRAM., Tohoku Univ.)

【背景・目的】黄麹菌は生分解性ポリエステルである PBSA (Polybutylene succinate-*co*-adipate) を唯一の炭素源として培養すると、PBSA 分解酵素の cutinase CutL1 と共に、界面活性蛋白質である hydrophobin RolA を発現する。RolA は PBSA に吸着した後、CutL1 を PBSA 表面にリクルートすることで、PBSA 分解効率を上昇させている [(1)]。さらに、hydrophobin は、固体表面の湿潤性を逆転させることや、免疫学的に不活性であることが示されており、機能性ナノ粒子などの材料表面加工への応用が期待されている。その一方で、様々な特性を有する固体表面と hydrophobin との相互作用機構や、その kinetics についての詳細は不明である。現在までに、我々の RolA 変異体を用いたプルダウンアッセイにより、RolA の 137 番目, 142 番目の Leu 残基が RolA の PBSA 表面への結合に重要であり、RolA と PBSA 間の相互作用に“疎水的相互作用”が関与することが示唆されている。本報告では、PBSA をはじめとした種々の固体表面に対する RolA の相互作用機構を解析し、RolA と固体表面の相互作用機構について考察する。

【方法】まず、pH 4-10 の反応溶液下で、野生型 RolA の PBSA 微粒子への結合量をプルダウンアッセイにより定量した。次に、pH 4-10 の反応溶液下での PBSA 微粒子の分散度を観察した。さらに、分子間相互作用解析装置 QCM のセンサーチップ表面を様々な化学性質を持つ物質で被覆し、その表面に対する RolA の親和性を QCM により、定量的に解析した。

【結果・考察】各 pH における PBSA への RolA の吸着量を解析した結果、pH 依存的に PBSA への吸着量が変化した。また、各 pH における PBSA 微粒子の分散度を観察した結果、酸性側に比べて、アルカリ性側では PBSA 微粒子の良好な分散が観察された。これより、アルカリ性側に比べ、酸性側における PBSA 微粒子の表面電荷は小さいことが示唆された。さらに、RolA の等電点が 4.8 であることから、pH 変化による RolA の PBSA への結合量が、両者の等電点付近で最大になることが推察された。以上の事から、“疎水的相互作用”だけでなく、“静電的相互作用”もまた RolA の PBSA への結合に関与している可能性が考えられた。これらの結果から、我々は PBSA が有するアルキル鎖や極性官能基などの化学的性質も RolA との相互作用に寄与することを推論した。現在、QCM のセンサーチップ表面に、様々な疎水度や極性を示す化学修飾を施した表面（Self-Assembled Monolayers）と、PBSA をはじめとした様々なポリマーを塗布した表面を作製し、それら表面に対する RolA の吸着能を定量的に評価している。

[(1)] Takahashi *et al.*, *Mol Microbiol.* 57: 1780-1798 (2005)

biodegradable plastic, *Aspergillus oryzae*, quartz crystal microbalance (QCM)

講演番号：3C33a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎33会場

タイトル　昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系における翻訳促進配列の解析

Title　Analysis of translational enhancer sequence on cell-free translation system derived from cultured insect cell

○島村修司，湧川盛洋[1]，伊東昌章[1]（沖縄高専　専攻科，[1]沖縄高専　生物資源工学科，[1]沖縄高専　生物資源工学科）

○Shimamura Shuji(ONCT), Wakugawa Morihiro(ONCT), Ito Masaaki(ONCT)

【目的】昆虫培養細胞を由来とする無細胞タンパク質合成系（昆虫無細胞系）は，動物細胞由来の無細胞タンパク質合成系の中では高い合成能を有する．またアシル化やプレニル化，ユビキチン化などの翻訳後修飾も可能である．しかし，より高い合成能を有する系の需要も多く，さらなる合成能の向上は昆虫無細胞系の課題の一つである．昆虫無細胞系は，タンパク質合成能を向上させる翻訳促進配列がベクターに挿入されており，その改変によりさらに翻訳促進能が向上する可能性がある．本研究では，従来よりも高い翻訳促進能を有する新たな翻訳促進配列の創出を目的として，改変した翻訳促進配列の翻訳促進能の解析を行った．

【方法】合成量の評価には，β-galactosidase遺伝子を挿入した昆虫無細胞系用のベクターpTD1(Accession number：AB194742)をもとに，①5’末端から，②3’末端から，③3’末端の（TAAA）を保存してその上流から，2塩基ずつ短縮を行ったプラスミド67種と，3’末端から16塩基の配列[5’-AAAAATAAAATATAAA-3’]を1-3回反復させた配列を有するプラスミド3種の，合計70種を用いた．これらのプラスミドからPCRにより直鎖状DNAを調製し，これを鋳型として*in vitro* mRNA合成を行った．タンパク質合成は転写と連続して行う方法，あるいはmRNAを精製して行う方法で行い，反応液中のβ-galactosidase活性を測定した結果と，比活性の値よりβ-galactosidase合成量を算出した．またウエスタンブロッティングによる合成の確認も行った．

【結果】反応液中の活性測定から求めた合成量とウエスタンブロッティングの結果には相関が認められ，配列長の短縮に伴い合成量も低下する傾向がみられた．しかし，3’末端から16塩基の配列[5’-AAAAATAAAATATAAA-3’]を翻訳促進配列として有するプラスミドでは，配列長が約三分の一に短縮されているにも関わらず，改変前の配列を有するプラスミドの71.8%に相当する合成量を示した．この結果からこの配列が翻訳促進能を有する重要な部位であると仮定し，コア配列と名付けた．コア配列を1-3回反復させた配列をそれぞれ有するプラスミドを解析した結果，コア配列を2回反復させた配列は改変前の配列と比較して約138%の合成量を示し，残り2つの配列では90%以上の合成量を示した．この結果から，コア配列が翻訳促進能を担う重要な部位であり，そのリピート配列を用いることで昆虫無細胞系の合成量向上の可能性が示唆された．

Cell-Free Translation, Translational enhancer sequence, 5’-UTR

講演番号：3C33a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎33会場

植物由来多糖を利用した酵素の安定化

Stabilization of Enzyme Using with Polysaccharide Derived from Plant

○寺田 聡、清水 雅史、川原 渉、小林 恭一[1]、大浦 剛[1]（福井大・工、[1]福井県食加研）
○Satoshi Terada, Masafumi Shimizu, Wataru Kawahara, Kyoichi Kobayashi[1], Takeshi Ohura[1]
(Fukuidai, [1]Fukui-Shokkaken)

【目的】大部分の酵素は不安定で、特に溶液状態では短期間で失活してしまう。そのため、酵素を利用する場合には、何らかの方法で酵素が安定化されていることが多い。酵素を安定化させるために牛血清アルブミン(BSA)が広く添加されているが、BSAは人畜共通感染症の懸念から、医療分野では使用することはできない。そのため、人畜共通感染症の懸念の無い酵素安定化剤が求められている。人畜共通感染症の懸念の無い酵素安定化剤として、トレハロースなど糖がよく利用されている。そこで我々は、ラッキョウから得られるフルクタンに着目した。フルクタンはフルクトースのみからなる多糖であり、特にラッキョウ由来のフルクタンは冷水にもよく溶解するなど、優れた特性を持つ。さらに、食品加工過程で廃棄される部分からも得られるため、資源の有効活用という点からも有益である。
【方法】酸化還元酵素であるHorseradish Peroxidase(HRP)と加水分解酵素であるAlkaline Phosphatase(ALP)という２つの酵素を対象に、その安定性に対して、ラッキョウフルクタンが与える影響を次の２つの方法で検討した。(1)溶液中で 20日間保存した場合の残存活性、(2)85℃という高温にさらした場合の残存活性、を測定した。
【結果】
(1)溶液中で 20日間保存した場合のフルクタンの効果
　20日間保存した後、HRPの活性を測定し、残存活性で評価した。残存活性は、保存後の酵素を用いた反応で得られた吸光度を、保存前の酵素で得られた吸光度で除した値で定義した。20日間保存すると、酵素活性は半分以下に低下していた。ところが、保存中にフルクタンが共存した場合、保存後の活性は高く保たれ、特に1 mg/mlのフルクタンが添加されていた場合、8割以上の活性が残されていた。トレハロースを添加した場合も、酵素活性は高く保たれたが、フルクタンにくらべてその効果は著しく小さいものであった。一方、BSAを添加した場合は、かえって酵素活性が大きく損なわれていた。
(2)85℃という高温にさらした場合のフルクタンの効果
　85℃で10分加熱後、ALPの活性を測定し、残存活性で評価した。残存活性は、加熱後の酵素を用いた反応で得られた吸光度を、加熱前の酵素で得られた吸光度で除した値で定義した。加熱したことで、酵素活性は半分以下まで低下していた。ところが、フルクタンを1 mg/mL添加しておくと、加熱後も酵素活性は8割近く残存しており、加熱による失活が大いに改善された。一方、トレハロースはほとんど改善できなかった。さらにBSAはかえって酵素活性を損なった。
　以上のように、フルクタンは、酵素の安定化剤として有効であり、応用が期待される。

polysaccharide,　enzyme,　clinical diagnosis

講演番号：3C33a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ C校舎33会場

酵母細胞表層工学を用いたバイオツールに適した新規ルシフェラーゼの創出

Creation of modified luciferase toward development of various biotechnological tool by cell surface engineering

○伏見 達也、三浦 夏子、新谷 英也、角田 弘之[1]、黒田 浩一、植田 充美（京大院農・応用生命、[1]日立製作所・中央研究所）

○Tatsuya FUSHIMI, Natsuko MIURA, Hideya SHINTANI, Hiroyuki TSUNODA[1], Kouichi KURODA, Mitsuyoshi UEDA (Kyoto Univ, [1]Hitachi Ltd.)

【目的】現在、アカデミックな分野から医療分野に至るまで様々なニーズから、より高速で低価格なDNAシークエンス技術や分子イメージング技術の開発が望まれている。例えば、次世代シークエンサーの 1 つとしてホタルなどの発光生物が有する発光酵素ルシフェラーゼを用いたパイロシークエンス法がある。現状のパイロシークエンス法の課題として挙げられるのが、用いられる核酸基質として、dATP ではなく、dATPαS と表記される dATP アナログ化合物を用いる点である。これは dATP を使用すると、ルシフェラーゼの誤認識により、バックグラウンドとなる発光が生じるためであり、そのため高価なアナログ化合物を使用しなければならない。この課題を解決するためには ATP 特異性の高いルシフェラーゼの作製が必要である。本研究では、酵母細胞表層工学を用いて変異体ルシフェラーゼのライブラリーを作製し、候補変異体のスクリーニングを行い、活性測定をすることで ATP 特異性の高いルシフェラーゼを創出することを試みた。
【方法および結果】北米産ホタル*Photinus pyralis*由来のルシフェラーゼ（ppyLuc）の野生型を酵母細胞壁タンパク質α-アグルチニンとの融合タンパク質として発現させ、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞表層に提示させた。次に、この作製した酵母ディスプレイ系によるルシフェラーゼ発現系を用いて、変異体ルシフェラーゼのライブラリーを作製した。このライブラリーから変異体をスクリーニングして活性を調べたところ、ATP反応性、および特異性が共に向上するルシフェラーゼ変異体が見つかったのでまとめて報告する。

Photinus pyralis luciferase, yeast cell surface engineering, ATP-specificity

講演番号：3C33a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ C校舎33会場

*Pseudomonas*属細菌由来γ-グルタミルトランスフェラーゼの諸性質

Characterization of γ-glutamyltransferase from *Pseudomonas* sp.

○ 椹木　庸介、矢野　成和、今岡　大士、日び　隆雄[1]、若山　守 （立命大・生命, [1]福井県大・生物資源）

○ Yosuke Sawaragi, Yano Shigekazu, Masashi Imaoka, Takao Hibi[1], Mamoru Wakayama (Dept. Biotech, Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [1]Dept. Bioresource, Fac. Bioresource, Fukui Pref. Univ.)

【目的】γ-グルタミルトランスフェラーゼ（以下、GGT）は、γ-グルタミル化合物のγ-グルタミル基の他化合物への転移反応を触媒する酵素で、グルタチオン代謝において重要な役割を担っている。微生物由来の酵素については、これまでに大腸菌を中心に、*Helicobacter* や *Pseudomonas* において、その諸性質が報告されている。我々は、微生物由来の GGT として *Pseudomonas* 属細菌由来の酵素に着目して研究を行っている。これまでに、我々は、*P. nitroreducens* 由来 GGT（PnGGT）の諸性質と構造解析について報告した[1)]。また、*P. putida* のゲノム中に見出された PnGGT とは相同性が低い GGT ホモログ遺伝子（*ggt* Ⅰ）の大腸菌での発現と精製を行い、*ggt* Ⅰ遺伝子発現産物が約 22kDa と 40kDa のヘテロダイマーとして発現すること、ならびにγ-グルタミル化合物に対する加水分解活性を有することを報告した[2)]。本発表では、*P. putida* が有している PnGGT と相同性が高い GGT ホモログ遺伝子（*ggt*Ⅱ）の発現産物（PpGGTⅡ）と *ggt* Ⅰ遺伝子の発現産物(PpGGTⅠ)の諸性質を比較検討した結果を報告する。
【方法】*P. putida*のゲノムDNAを鋳型とし、PCRで増幅した*ggt* Ⅰおよび*ggt*II遺伝子断片をpET-22bに挿入し、発現プラスミドppGGTⅠとppGGTⅡ構築した。これらのプラスミドで形質転換した大腸菌Rosetta gami Bを、グルコースとラクトースを含む培地にて培養した。それぞれの粗抽出液からDEAEとButylの両カラムクロマトグラフィーにより単一に精製した。加水分解活性はγ-グルタミル-*p*-ニトロアニリドとL-グルタミンを基質とし、転移活性はγ-グルタミル基の供与体としてL-グルタミン、受容体として各種アミン類、アミノ酸やペプチドを用いて、生成する*p*-ニトロアニリンの吸光度変化とHPLCを用いてγ-グルタミル化合物の生成量を測定した。
【結果】均一に精製したGGTⅠおよびGGTⅡの諸性質を検討した。転移活性において、GGTⅠはGlyやGly-Glyを受容体基質とするのに対して、メチルアミンやエチルアミンなどのアミン類は受容体としなかった。一方、GGTⅡはメチルアミンやエチルアミンなどのアミン類を良い受容体基質とするのに対して、GlyやGly-Glyは良い受容体としなかった。また、γ-グルタミル-*p*-ニトロアニリドを基質として、加水分解活性に対する金属イオンの影響を比較したところ、GGTⅠではほとんど影響を受けなかったのに対して、GGTⅡではZn^{2+}、Ni^{2+}、Cu^{2+}などの金属イオンの添加により80%以上の活性の低下がみられた。一方、基質としてL-Glnを用いた加水分解反応では、GGTⅠとGGTⅡともに金属イオンによる活性の低下はみられなかった。

1) Biosci. Biotechnol. Biochem., 74 (9), 1936-1939,2010.
2) 2011年度農芸化学会大会(京都)講演要旨集p.39

γ-glutamyltransferase, *Pseudomonas putida*, alkylamine

講演番号：3C33a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎33会場

Streptomyces antibioticus 由来ホスホリパーゼ D の発現と安定化における分子表面ループ (D40 ループ) 欠損の影響

Influence of surface loop (D40 loop) deletion on expression and stability of Streptomyces antibioticus phospholipase D

○ダムナニョヴィッチ ヤスミナ, 中野英雄, 岩崎雄吾 (名大院・生命農・生命技術)
○Damnjanovic Jasmina, Nakano Hideo, Iwasaki Yugo (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】Phosphatidylinositol (PI) is an attractive molecule for biotechnological applications since it regulates cholesterol transition into high-density lipoprotein (HDL) and its metabolic cleavage in human body. The idea of conducting phospholipase D (PLD) catalyzed transphosphatidylation yielding 1(3)-PI at elevated temperatures can potentially increase product yield since excess substrate, *myo*-inositol, could be introduced due to significant increase in its solubility at high temperatures. This would push reaction equilibrium towards synthesis of the desired product.
However, thermal stability of PLD remains the object of further improvement. Previously, introduction of W187D/Y191Y/Y385R (DYR) mutations into wild-type *Streptomyces antibioticus* PLD (SaPLD), generated DYR PLD having 1(3)-PI synthesizing ability, that wild-type did not have. Further introduction of single point and double mutations into DYR PLD resulted in 3.5°C increase in melting temperature. Mutations were introduced into surface residues having high value of B-factors, as an indication of thermal instability.
【方法】Still, further improvement is desired. Therefore, removal of nine amino acid residues contained in D40 surface loop, marked as a spot having high B-factor, was attempted. Structural 3D analysis carried out using Yasara structure software pointed that the loop seems to interrupt two ß-strands, N34-36, and W46-Q49, causing the second strand to twist. As a result, W46 residue is uncommonly oriented at the same side of the ß-strand as the next residue L47. Producing one continuous ß-strand instead of two can dramatically reduce the local structural strain. Trimming of the loop residues 37-45 or 38-46 would result in a creation of one continuous ß-strand, untwisting of the W46-Q49 region, and thus, removal or reorientation of W46 towards neighboring residues. To test this hypothesis, both deletion patterns were introduced into *dyr pld* gene and expressed in BL21(DE3).
【結果】Expression of functional (active in 1(3)-PI synthesis), extra cellular PLD deletion mutants was detected, indicating no significant role of D40 loop in secretion or enzyme function. This result came as interesting since this loop is conserved among 12 microbial PLDs, as seen in the sequence alignment, although the sequences vary. Yasara molecular dynamics analysis, including RMSF and RMSD enzyme profiles at 40-70°C and total energy analysis, pointed at del 37-45 PLD as more stable compared to parent DYR and del 38-46 PLD. Both, del 37-45 PLD and del 38-46 PLD are being characterized in terms of specific activities, 1(3)-PI synthesis at high temperatures, melting temperatures, and compared with parent DYR PLD.

Phospholipase D, computational protein design, enzyme stability

講演番号：3C33a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ C校舎33会場

深海環境下での好気性微生物活性を推定するための実験装置開発とそれを用いた生分解プラスチック分解

Development of high pressurized cultivation system for aerobic microorganisms and degradation of biodegradable plastics under high pressures and low temperatures by the system

○開俊樹[1] 関口峻允[2] 加藤千明[1] 秦田勇二[1] 丸山正[1] 阿部文快[1, 3] 小西正朗[1] （[1]独）海洋開発機構 [2]東京海洋大学 [3]青山学院大学・理工）

○ Toshiki HIRAKI[1], Takayoshi SEKIGUCHI[2], Chiaki KATO[1], Yuji HATADA[1], Tadashi MARUYAMA[1], Fumiyoshi ABE[1, 3], Masaaki KONISHI[1], （[1]JAMSTEC [2]Tokyo University of Marine Science and Technology [3]College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University,）

【目的】一般的に好気性深海微生物の増殖活性を調べる高圧培養装置は閉鎖系であり、極端な酸素濃度の制限下での培養を余儀なくされてきた。そのため、実験室において、好気性微生物の高圧下における微生物の活性を十分に評価することができなかった。我々は酸素飽和培地の循環システムと高圧メンブレンリアクターシステムを使用し、高圧下での酸素律速問題を解決する新たな高圧培養方法を開発し、深海環境を模倣した高圧・低温下での生分解性プラスチックの分解率評価することを目的とした。

【方法】培養液を透析膜に入れることで、加圧容器内に試験菌株を保持し、高圧ポンプにより、ばっ気した培地を循環させる事で、高圧培養容器内部に酸素を継続的に供給する事を可能としたHPMR-ASMC法を考案した。この装置の評価は、偏性好気性酵母を2日間培養し、その増殖量を指標とした。通気効率を推定するため、別途フラスコ培養も行った。生分解プラスチックの分解評価の場合、プラスチックフィルムを供試菌とともに透析バックに入れて4週間, 5℃で培養した。分解量はフィルムの乾燥重量の変化を指標とした。

【結果】HPMR-ASMC法では、従来法の約20倍の菌体濃度まで酵母が増殖した。その増殖量から、本法における通気効率は20 rpm程度のフラスコ培養に匹敵することがわかった。増殖量は培養液の循環速度に依存しないことから、透析膜における酸素の移動が律即となることが推定された。同様の装置を用いて、深海由来バクテリアを用いて、生分解性プラスチック(ポリカプロラクトン製フィルム)の分解を評価したところ、従来法では重量変化がほぼ見られなかったが、本法では約8 mgの重量減少が見られた。これらの結果から、低温・高圧の深海底でも好気性微生物が増殖し、生分解性プラスチックを分解することが示唆された。

high pressurized cultivation, aeration, biodegradable plastics

講演番号：3C33a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎33会場

光照射は海産種苗の初期餌料動物プランクトン、ワムシの増殖密度を増加させる

Effect of lighting on increase in growth population of marine zoo plankton, rotifer

○天井　友仁、田中 賢二、吉松　隆夫[1]（近大院・産技、[1]三重大院・生資）
○Tomohito Amai, Kenji Tanaka, Takao Yoshimatsu[1] (Kinki Univ., [1]Mie Univ.)

【目的】 養殖や栽培漁業など“つくって育てる”漁業の重要性が世界的に高まっている。魚介類の種苗である仔稚魚を生産するには大量の生きた動物性餌料生物が必要である。海産動物プランクトンのうちシオミズツボワムシ（以下ワムシと称す）は仔魚の初期餌料として必須であり、１つの種苗生産機関でピーク時には１日で数十億から100億個体ものワムシが消費される。ワムシは体長80～220μmのS型*Brachionus rotundiformis*や130～320μmのL型*B.plicatilits*などの種があり、L型は大型魚介類の初期餌料として重要である。種苗生産機関の多くは、ビタミンB_{12}を人工的に含有させた市販の濃縮淡水クロレラを給餌する自家培養によりワムシを調達しているが、すでに高密度培養法が開発されたS型ワムシ[1)]に較べてL型は増殖密度（個体群密度）が格段に低いためいまだに大掛かりな培養設備を必要とし作業省力化も困難である。また、濃縮淡水クロレラは価格が高くこれがワムシ生産コストを圧迫している。我々は過去の研究で、光照射下では、増殖必須因子であるビタミンB_{12}を含有しないクロレラを給餌してもL型ワムシは良好に増殖することを明らかにしている[2)]。本研究ではL型ワムシの増殖密度向上と濃縮淡水クロレラに替わる安価な餌料の開発を目的として、照射光の波長と光量がワムシ増殖に及ぼす影響を調べた。

【方法】１L容のガラス水槽に希釈海水（塩分20‰）を入れ、L型ワムシ(近大小浜株)を接種し、24℃・空気通気の条件で、CCS社製のLEDパネルから青色(470nm)、緑色(525nm)および赤色(660nm)の３波長の光を様々な光量子束密度で照射しつつ培養試験を行った。ワムシ用餌料は、クロレラ工業（株）社製のビタミンB_{12}含有クロレラおよび市販の圧搾パン酵母（ビタミンB_{12}非含有）を用いた。そして、各試験区におけるワムシ増殖密度、携卵数、体長および培養水のpH、DO、NH_4^+濃度、細菌数、ビタミンB_{12}蓄積量を比較した。

【結果】ビタミンB_{12}含有濃縮淡水クロレラを給餌した培養では、LED光照射下では遮光下に較べてL型ワムシの増殖が良く、ある程度までは光量子束密度が増えるにつれて増殖密度も増加した。照射波長の影響については、青色光＞緑色光＞赤色光の順に増殖密度は高くなった。最も高い増殖密度が得られた光量子束密度は青色光の3.0～5.0μmol・m^{-2}・s^{-1}であった。また、ビタミンB_{12}を含有しない生パン酵母を給餌した場合、L型ワムシは遮光下ではほとんど増殖しなかったのに対して光照射下では活発に増殖し、波長・光量子束密度によってL型ワムシの増殖密度は変化した。とくに青色光3.0～5.0μmol・m^{-2}・s^{-1}では、パン酵母給餌でも濃縮淡水クロレラ給餌に匹敵する高いワムシ増殖密度が得られた。バイオアッセイの結果によれば、光照射下では培養水中のビタミンB_{12}蓄積量が増大しており、これによりワムシ増殖密度が向上したと推察された。

文献[1)] 田中賢二、吉村研治、吉松隆夫.　生物工学会誌、81巻、3号、1-7、2003.
文献[2)] T.Yoshimatsu, K.Tanaka et al. JARQ 42 (2), 131-136 (2008)

Rotifer,　Aquaculture,　Cyanocobalamin

講演番号：3C33a10
講演日時、会場：3月24日10:49～ C校舎33会場

代謝病における CRP 検査の高感度かつ定量域の広いラテックス凝集試薬の研究

Study on latex reagent for C-reactive protein (CRP) using a high-sensitive latex agglutination on metabolic disease.

○板橋　忠生、小森谷　友絵、吉宗　一晃、神野　英毅（日大生産工・物応化）
○Tadao Itabashi，Tomoe Komoriya，Kazuaki Yoshimune，Hideki Kohno (Nihon University)

【緒言】生活習慣病や感染症において迅速診断するため、イムノアッセイ法による高感度かつ迅速な測定方法の検討を行った。その結果、ラテックス凝集試薬は高感度化が進められているが、測定領域がng/mLからμg/mLと狭いので、幅広い測定領域が必要である。そこで我々は、B/F分離を必要とせず測定できるラテックス比濁法（LTIA）に着目し、抗原1 ng/mLから10 μg/mLの幅広い範囲おいて迅速に測定できるラテックス凝集試薬を検討した。
【方法】100nmのカルボキシル基を持ったラテックス粒子にカルボジイミド法により抗CRPポリクローナル抗体を結合して、高感度ラテックス試薬を作製した。作製した試薬の反応性は、CRP抗原溶液を加えて反応させたものを比色計にて測定した。
【結果】100nm付近のラテックス粒子を用いて作製した凝集試薬は、抗原1μg/mLから5μg/mLの高濃度領域で測定が可能であった。一方、1μg/mL以下の測定は不可能であったため、低濃度側でも測定可能な試薬を検討している。

latex agglutination, antibody, crp

講演番号:3C33p02
講演日時、会場:3月24日14:00～ C校舎33会場

Sphingobium sp. MI1205株由来のハロアルカンデハロゲナーゼLinB_MIにおけるbeta-HCH分解活性に重要なアミノ酸残基の同定

Identification of the important amino acid residues for the beta-hexachlorocyclohexane degradation activity of haloalkane dehalogenase LinB_MI from *Sphingobium* sp. MI1205

○森内 良太、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院・生命科）
○Ryota Moriuchi, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Grad. Sch. of Life Sci., Tohoku Univ.)

【背景】HCH (hexachlorocyclohexane)はPOPsに指定されている残留性有機塩素系化合物であり、かつては主に殺虫剤として世界中で広く使用されてきた。またHCHは製造過程でいくつかの異性体が生じ、中でもbeta-HCHは最も難分解性であるため環境中における残留が問題となっている。有機塩素系化合物分解に関与する酵素として、細菌由来のハロアルカンデハロゲナーゼがある。これは加水分解酵素の一種であり広い基質特異性を持つため、様々な有機塩素系化合物分解の鍵酵素として期待されている。
【目的】gamma-HCH分解細菌*Sphingobium* sp. MI1205株由来のハロアルカンデハロゲナーゼLinB_MIは、*Sphingobium japonicum* UT26株由来のLinB_UTと全296アミノ酸残基中わずか7アミノ酸残基(8塩基対)の違いにも関わらず、高いbeta-HCH分解活性とbeta-HCH分解産物をさらに次の物質に変換する、LinB_UTにない活性を有している。これまでの研究で、活性中心ポケットを形成する134、247番目アミノ酸残基の重要性が示唆されたが、両アミノ酸残基だけがMI型の変異酵素はMI型の活性を示さなかった。そこで本研究では残りの5つのアミノ酸残基のうち、どのアミノ酸残基が2つの酵素活性の差異により大きな影響を与えているのか検討した。本研究の結果は、HCH分解酵素の進化や活性強化のための重要な基礎データになると考える。
【方法】部位指定変異導入法を用いて変異酵素を作製し、beta-HCH分解活性測定を行った。
【結果・考察】まず5つのアミノ酸それぞれに変異を導入したLinB_MI単独変異酵素を作製し、beta-HCH分解活性を測定した。その結果112、138、253番目アミノ酸残基の重要性が示唆されたため、134、247番目アミノ酸に加えて112、138、あるいは253番目アミノ酸残基に変異を導入した3重変異酵素を3つ作製し、beta-HCH分解活性測定を行った。結果、253番目に変異を入れた酵素はUT型の活性のままであったが、112、138番目アミノ酸残基に変異を入れた酵素は、中間的ではあるがMI型の酵素活性を示し、138番目に変異を導入した酵素が最もMI型に近かった。そこで134、138、247番目アミノ酸に加え、112あるいは253番目に変異を導入した4重変異酵素を2つ作製し、beta-HCH分解活性測定を行った。両酵素ともMI型の酵素活性を示し、253番目に変異を導入した酵素はほぼLinB_MI野生型に近い活性を示した。これらの結果より、7アミノ酸残基のうち134、138、247番目アミノ酸の3つが特に重要であること、LinB_UT型からLinB_MI型へは段階的に活性が変化すること、また変異を導入する順番により1アミノ酸残基の置換で酵素活性が劇的に変化するポイントがあることが示された。

hexachlorocyclohexane, *Sphingobium*, haloalkane dehalogenase

講演番号：3C33p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ C校舎33会場

超好熱菌由来CutA1に異常に多く存在するイオン性残基の熱安定化戦略

Heat-stabilization strategy due to unusual amount of charged residues in hyperthermophilic CutA1

○松浦祥悟、国島直樹、油谷克英 (理研・播磨研)
○Yoshinori Matsuura、Naoki Kunishima、Katsuhide Yutani (RIKEN SPring-8 Center)

【目的】蛋白質の産業利用において、蛋白質のかたちを保持する熱安定性は重要な要素の一つである。そのため、現在までに様々な熱安定化因子が提案され、実用への適応が試みられてきた。しかし、未だに有効な熱安定化の設計指針は確立されていない。我々は、普遍的な蛋白質の熱安定化戦略の構築を目指す過程で、超好熱菌*Pyrococcus horikoshii*由来CutA1(*Ph*CutA1)蛋白質に注目した。*Ph*CutA1の変性温度(T_d)は中性付近において約150^{o}Cであり、史上最高の熱安定性を示す。*Ph*CutA1と他生物種由来CutA1の一次構造を比較すると、*Ph*CutA1ではイオン性残基の割合が異常に高い。超好熱菌由来の蛋白質は一般的にもイオン性残基の割合が非常に高い。しかし、蛋白質に存在する塩結合がどのように熱安定化に寄与しているかは、疑問な点も多い。本研究では、*Ph*CutA1に異常に多く含まれるイオン性残基がどのようにして熱安定化に寄与しているかを明らかにすることを目的としている。
【方法】以下に述べる方針に沿って*Ph*CutA1のイオン性残基を選び、非イオン性残基に置換した変異型蛋白質を作製した。安定性の変化は示差走査熱量計(DSC)を用いて評価した。(1)*Ph*CutA1と他生物種由来CutA1の立体構造を比較すると、同一サブユニット内における4Å以内のイオン対の数が多いため、これらの残基を対象とした。(2)静電相互作用を含む各種安定化因子を立体構造から推定できるプログラムFoldX(http://foldx.crg.es/)を用いて、イオン性残基が熱安定化に寄与（もしくは不安定化に寄与）しているイオン性残基(各15残基程度)を選んだ。
【結果】53種の変異型のT_dの増減を調べた結果、予想に反して13種の変異型が野生型のT_dよりも高く、中でもE59Q変異型はT_d =154.9^{o}Cで、野生型の史上最高のT_dを6.4^{o}Cも更新した。正荷電残基を置換した場合の方が負荷電残基を置換した場合よりもT_dの減少程度は顕著であった。21種のGlu変異型の野生型とのT_dの差の平均値は、ΔT_d =0.03 ± 2.05^{o}Cで、あたかもGlu残基が平均して安定化への寄与がほとんどないかの如き結果を示した。また、4Å以内でイオン対を形成しているイオン性残基を対象とした変異型では顕著なT_dの減少が見られなかった。そして、実際の変性温度と予測された静電相互作用の増減との相関は低かったが、他の熱安定化因子も考慮した全体としてのΔΔGとΔT_dとは良好な相関が認められた。全体を総括すると、(1)*Ph*CutA1はイオン性残基を多く含有することで、高い静電相互作用を得ていた。等電点,4.9に保つためには*Ph*CutA1には多くの負荷電を必要として、結果的に、互いに部分的には反発せざるを得なくなるが、これをある程度許容してでも正荷電残基と効果的な静電相互作用を必要としている。(2)静電相互作用の強化により熱安定化を試みる際には、置換の際他の安定化因子に与える影響も考慮した上でイオン性残基を導入することが必須である。そのため、他の熱安定化因子に極力悪影響を与えずに、如何にしてイオン性残基を導入するかが耐熱化の鍵である。(3)更に、本研究は140-150 ^{o}C にT_dを持つ蛋白質であっても、従来から報告されている熱安定化因子が有効であることを示した。これらの知見は100 ^{o}C以上の温度領域で蛋白質を安定化する際に有用である。

hyperthermophile; ion-ion interaction; heat stability of protein

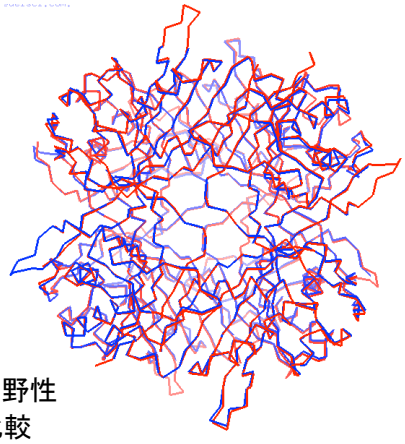
講演番号：3C33p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎33会場

耐熱性を有する好冷性変異体*Bacillus*ウリカーゼの構造機能解析

Structure-function analysis of the thermostable psychrophilic mutant of *Bacillus* uricase

小川 智輝、伊藤 貴文、岸本 高英[1]、西矢 芳昭[2]、○日ビ 隆雄
（福井県大 生物資源、[1]東洋紡 敦賀バイオ研、[2]摂南大 理工）
Tomoki Ogawa, Takafumi Itoh, Takahide Kishimoto[1], Yoshiaki Nishiya[2] and ○Takao Hibi
(Fukui Prefectural University, [1]Toyobo Co. Ltd., [2]Setsunan University)

【目的】ウリカーゼは尿酸を酸化する酵素であり、尿酸の定量分析に利用できるため、臨床検査薬や血中尿酸測定用センサに用いられる。既に実用化されている *Bacillus* 属細菌由来ウリカーゼ（bUOD）は熱安定性が高く長期保存にも耐えるが、特にセンサ用途では低温（25～30℃）における高い反応性も同時に求められる。これまでに、四量体 bUOD のサブユニット間の結合に関与するインタフェースループ II の改変により、耐熱性を維持したまま低温での活性を発現した変異体酵素 W279L+P287G についてその酵素学的な諸性質を報告してきた。本研究では、その好冷性発現の分子機構を調べるため、その X 線結晶構造解析に取り組んだ。
【方法】変異体酵素の結晶化は、PEG 8000 を結晶化剤しハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。結晶化の際に加えるリガンドには 9-methyl uric acid または 8-azaxthantin を用いた。放射光実験施設 Photon Factory のビームライン BL17A において X 線回折強度測定を行った。
【結果】bUOD 変異体 W279L+P287G の 9-methyl uric acid 複合体の結晶化は 20℃で行った。得られた結晶について 2.6Å分解能の X 線回折強度データを収集した。野性型酵素の結晶構造 (PDB: 1J2G)を初期モデルとした分子置換法により位相を決定後、*R* 因子 19%で立体構造を決定した。本結晶構造を野性型酵素のサブユニット主鎖間の構造を比較すると、インタフェースループ II 中の 8 残基の電子密度が変異体では消失しており、大きく揺らいでいることが示唆された。それに対して両者のペプチド主鎖の二乗平均偏差は 0.51 Åと極めてよく一致し、全体構造はよく保存されていた。インタフェースループ II およびその近傍の構造変化の詳細を調べるため、より精密な結晶構造を得ることを目的として、ゆらぎの大きな C 末端部分 8 残基を欠損させた W279L+P287G+ΔC8 欠損変異体を作製した。本欠損変異体酵素を用いた結晶化条件の最適化を検討し、15℃で 8-azaxthantine 複合体の良好な結晶が得られ、2.1Å分解能の X 線回折強度データを収集することができた。



W279L+P287G 変異体（青）と野性型酵素（赤）の主鎖構造の比較

Uricase, Psychrophilic enzyme, X-ray crystallography

講演番号：3C33p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ C校舎33会場

不安定タンパク質の効率的再生法の確立

Development of efficient refolding of an unstable protein.

○保田　達哉、 野稲　俊宏、 松元　俊彦、安藤　祥司、 井本　泰治
（崇城大工・応微工）
○Tatsuya Yasuda, Toshihiro Noine, Toshihiko Matsumoto, Syoji Ando, Taiji Imoto (Sojodai)

【目的】タンパク質は容易に変性し活性を失う。また、遺伝子工学で発現したタンパク質は凝集体を形成していることが多い。そこで、これらのタンパク質を元の形に巻き戻す（再生する）ことが必要となる。タンパク質の再生は凝集の抑制が重要であり、安定なタンパク質は透析法を用いて高効率に再生することができる。しかし、不安定なタンパク質では低濃度尿素まで変性タンパク質が多量に存在するため凝集が起こりやすく高効率での再生が難しい。そこで再生する際に様々な添加剤を加え、不安定なタンパク質の高効率再生を行うことを目的とした。

【方法】不安定なタンパク質のモデルとしてニワトリリゾチームの 4 本のジスルフィド結合のうち特定の一本のみ（Cys6-127）を還元カルボキシメチル(CM)化した 3SS リゾチームを用いた。ネイティブリゾチームをジチオスレイトールで還元後、モノヨード酢酸溶液で CM 化し、CM - トヨパールクロマトグラフィーで分離、調製した。再生方法は 3SS リゾチームを 8M 尿素および 2-メルカプトエタノールで変性還元状態にし、様々な添加剤を含む溶液を用い 100 倍希釈で行った。3 分毎にサンプリングし、タイムスキャンにより 1 分間の溶菌活性を測ることで再生収率とした。また活性は、基質に *Micrococcus luteus* を使用して 40℃での A350 の吸収の低下で調べた。

【結果】3SS リゾチームはイオン交換クロマトグラフィーでネイティブリゾチームより早く溶出した。透析し凍結乾燥した後、収率を求めた結果、約 10%であった。再生実験において添加剤なしの場合、再生収率は約 10%と低かったが、グリセリンを約 10%、30%、40%、50%のいずれの濃度で添加した場合も再生効率を向上させることができた。40%の濃度で添加したとき、最も高い再生効率約 30%を得ることができた。シュクロースの場合においても 1M 濃度添加したとき約 25%の再生収率を示し、0.25M、0.5M 添加でも約 20%であり無添加より約 2 倍上昇した。それ以外のアセトニトリルやアルギニンは顕著な上昇は認められず有害な影響を及ぼした。

Keywords: Stabilizer/Refolding/Lysozyme

講演番号：3C33p06
講演日時、会場：3月24日14:44～ C校舎33会場

オボアルブミンのポリマー化機構

The polymerization of ovalbumin

○川本 好博[1]，多田 俊治[1]，恩田 真紀[1]（[1]大阪府立大・理・生物）
○Kawamoto Yoshihiro[1]，Tada Toshiji[1]，Maki Onda[1]（[1]Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. Of Sci., Osaka Pref. Univ.,）

【目的】卵白の主要成分であるオボアルブミンは、構造上セルピン・スーパーファミリー(serpin : serine protease inhibitor superfamily) に属するが、セリンプロテアーゼを阻害する機能を持たない。その理由は、オボアルブミンの Arg339（他のセルピンでは Thr／Ser が保存）が、阻害活性の発現に必要な「分子内ループ挿入反応」を妨げるからである。セルピンにはポリマーを形成しやすい性質があり、これが生体内に蓄積すると認知症（ニューロセルピン）、肝硬変（α_1-アンチトリプシン）、血栓症（アンチトロンビン）などを引き起こす。これまで、セルピンのポリマー化は「分子間ループ挿入反応」により起こるため（A-sheet モデル）、阻害活性の無いセルピンはポリマー化しないと考えられてきた。実際、ポリマー化することが確認されているセルピンは全て阻害活性のあるものである。しかし近年、別のポリマー化モデルが提唱され、これによるとセルピンのポリマーは Folding 中間体から形成される（domain-swapping モデル）。このモデルの経路に従えば、阻害活性の無いオボアルブミンも Folding 中間体が生じる条件下でポリマーを形成する可能性がある。そこで本研究では、オボアルブミンがポリマーを形成するかどうかを調べた。
【方法と結果】オボアルブミンは卵白を硫安分画し、これを陰イオン交換クロマトグラフィーで精製して得た。ポリマーを形成することが知られているセルピンでは、加温や低濃度の変性剤など、穏やかな変性条件下でインキュベーションするとポリマーを形成する。そこで、様々な条件下でオボアルブミンをインキュベーションし、ポリマーを形成するかどうかを調べた。その結果、4 M 尿素, 45 ℃, pH 8.0の条件下でオボアルブミンがポリマーを形成することを Native-PAGE で確認した。次に、得られたポリマーの諸性質を調べた結果、ポリマー化速度、ポリマーの形成パターンおよびチオフラビンTとの結合などが、代表的な病原性ポリマーであるニューロセルピンのポリマーとよく一致していた。このことから、オボアルブミンから形成されるポリマーは典型的なセルピンのポリマーであることがわかった。これは阻害活性のないセルピンのポリマー化の初めての例である。オボアルブミンはループ挿入型構造をとることができないことから、ここで得られたポリマーはA-sheetモデルと異なるメカニズムで形成されたと考えられる。オボアルブミンのポリマーはFolding中間体から形成されると考えられるので、この点ではdomain-swappingモデルに従うといえるが、domain-swapping機構により得られるポリマーはループ挿入型構造であるため、これともオボアルブミンのポリマーは一致しない。従ってオボアルブミンは、A-sheetモデルやdomain-swappingモデルと異なった機構でポリマー化すると考えられる。

serpin, ovalbumin, polymerization

講演番号：3C33p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎33会場

セルラーゼの進化分子工学のためのビーズディスプレーシステムの開発

Development of bead display system for molecular evolution of cellulases

○朱　博、森　翔也、松田　英樹、兒島　孝明、中野　秀雄（名大院・生命農・生命技術）
○Bo Zhu, Shoya Mori, Hideki Matsuda, Takaaki Kojima, Hideo Nakano (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】Cellulases are a group of enzymes, which catalyze degeneration of cellulose to glucose. Since biofuel can be produced at a low cost from cellulosic biomass by cellulases, it is important to get effective cellulases with suitable properties for the industrial application. Recently, molecular evolution becomes an efficient and popular method to improve enzymes. In this study, we tried to establish the bead display system for high-throughput molecular evolution of cellulases coupled with emulsion polymerase chain reaction (emulsion PCR), *in vitro* compartmentalization cell-free protein synthesis and enzyme reaction.
【方法と結果】Firstly, the gene of endoglucanase from *Phanerochaete chrysosporium* (PcEG) was immobilized on magnetic bead by emulsion PCR, and the enzyme was successfully expressed and displayed on the same bead by an *E. coli* cell-free protein synthesis system. Next, the cellulases activities were measured in an assay mixture containing Sodium Carboxymethyl Cellulose, β- glycosidase, glucose oxidase, peroxidase and 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein. The fluorescence product could be captured on the same bead by antibody against fluorescein. Finally, fluorescence-activated cell sorting was used to measure the intensity of fluorescence on the beads and the beads with strong intensity could be sorted at the same time. The system was applied for a mock screening of a library with 1% wild-type and 99% inactive mutants of PcEG. The wild-type concentration was enriched after several rounds screening. It demonstrates that our system is promising for actual mutant library screening of cellulases.

bead display, molecular evolution, cellulases

講演番号：3C33p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎33会場

バイオシリカ形成作用をもつ新規ペプチドの構築

Creation of the novel peptide with the ability of silica precipitation

○木村 友紀、藤山 一平、松田 祐介（関西学院大院・理工）
○Yuki Kimura, Ippei Fujiyama, Yusuke Matsuda (Kwansei-Gakuin university)

【目的】珪藻は、外界に存在する珪酸をとりこみ自己組織化を行うことで、シリカを主成分とした被殻を形成する。この反応にはSilaffinペプチドやポリアミン鎖などが関わることが知られており、常温・常圧・中性環境で迅速に珪酸を重合する。特に分子内に高密度に正電荷を有するペプチドが珪酸を極めて効率よく重合・沈積する機構に着目し、この特徴を有する全く新しい珪酸重合ペプチドの作製を行った。このペプチドは疎水性相互作用とともに非常に強い正電荷領域を形成すると予想され、更にペプチドを複数連結することで立体的なネットワークを形成する可能性が考えられている。そこで、ペプチドの連結と生成されるバイオシリカの構造との関連を調べた。

【方法】海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の葉緑体局在型 βcarbonic anhydrase の C 末端に存在する両極性α-helixに、部位特異的変異を複数導入し、α-helix 構造内にリシン或いはアルギニンによる正電荷クラスターを導入した。これらをcationized diatom pyrenoid forming factor 1 或いは 2 (CDPF1,2) と命名した。さらに各 CDPF を 2 つ連結したペプチドも作製し、それぞれのペプチドとオルト珪酸との反応で得られるバイオシリカの表面構造を、走査型顕微鏡を用いて観察した。

【結果】CDPF1,2 は Silaffin に比べて高いバイオシリカ形成活性を有していたが、正電荷を全くもたないコントロールペプチドである CDPF0 においては、ほとんどバイオシリカ形成は確認できなかった。更にペプチド濃度依存的に粒子径は変化し、pH 依存的に粒子状から繊維状へ形状は変化した。また 0.1μM の低濃度領域においても CDPF は安定な活性作用を有しており、同濃度の Silaffin を用いた場合の結果と比較して、高いバイオシリカ形成活性を有するといえる。このような作用を有する CDPF を連結することで、更に得られるバイオシリカ量は増加することが予想されたが、単ペプチドと連結ペプチドで大きな差は確認できなかった。一方、バイオシリカの形状を単ペプチドと連結ペプチドで比較すると、粒子径に大差は見られなかったが、連結ペプチドが形成するバイオシリカには、単ペプチドでは確認できなかったバイオシリカの形状がみられた。ペプチドの連結とバイオシリカ構造の関連について議論する。

biosilica, peptide, diatom

講演番号：3C33p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎33会場

リバースアラニンスキャン法による腸球菌のクオラムセンシング阻害剤ZBzl–YAA5911の創製

Development of ZBzl–YAA5911 that is *fsr* quorum sensing inhibitor of *Enterococcus faecalis*

○横畑　綾治[1]、佐藤　まみ[1]、西口　賢三[1]、園元　謙二[1,2]、鈴木　崇[3]、中山　二郎[1]（[1]九大院・農、[2]九大・バイオアーク、[3]愛媛大院・医学系研究科）

○Ryoji Yokohata[1], Mami Sato[1], Kenzo Nishiguchi[1], Kenji Sonomoto[1,2], Takashi Suzuki[3], Jiro Nakayama[1] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Bio-Arch, Kyushu Univ., [3]Ehime Univ. School of Medicine)

【目的】クオラムセンシング(QS)は、微生物が自己誘導因子を介して互いに菌密度を把握し合い、それに応じて遺伝子発現を制御する機構で、病原性細菌においては宿主への感染を効率よく成立させる戦略の一つである。このため、QS阻害剤は菌の生育には影響を与えず、病原性のみをコントロールする新しいタイプの薬剤として開発が期待されている。近年、薬剤耐性の院内感染菌として医療の現場で問題視されている腸球菌*Enterococcus faecalis*もQSによって病原因子の一つであるゼラチナーゼの発現制御を行う。このQSの自己誘導因子はGBAPと命名された11残基(QNSPNIFGQWM)の環状ペプチドである。本研究では、GBAPアンタゴニストを創製し、新規抗感染症薬開発の一助とすることを目標とした。

【方法・結果】これまでの構造活性相関解析によりGBAPのPhe[7]およびTrp[10]が受容体との結合に必須であることが示された。そこでアゴニスト活性に重要でないN末端3残基以外を全てAlaに変換した仮想受容体結合スキャフォールド[Ala[4,5,6,8,9,11]]Z-GBAPを化学合成した。その結果、このペプチドは腸球菌のゼラチナーゼ発現を微弱ながら阻害した(IC_{20} = 100 μM)。次に、この受容体結合スキャフォールドを基に各アミノ酸残基を1つずつGBAPに近付けたペプチドを合成し、アンタゴニスト活性を段階的に向上させるリバースアラニンスキャン法を行った。その結果、[Ala[5,9,11]]Z-GBAP (IC_{20} = 10 μM)の創製に成功した。そしてさらに、このペプチド配列のうち、阻害活性に重要であると示された5番目残基を種々のアミノ酸に置換し、最終的にIC_{80} = 100 nMを示す[Tyr(Bzl)[5],Ala[9,11]]Z–GBAP (ZBzl-YAA5911)を得た。ZBzl–YAA5911はラット眼内炎モデルにおいて腸球菌の前眼房から硝子体への侵入を有意に阻害し、また網膜電位の低下を有意に抑えた。これらの事からYAA5911はQSを標的とする抗感染症剤として有効であることが示された。

quorum sensing, antagonist, reverse alanine scanning

講演番号：3C33p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎33会場

タイトル　抗微生物ペプチドを利用した抗菌性素材の開発

Title　Development of antibacterial materials using antimicrobial peptides

中村　允、鈴木秀明[1]、岩崎　崇[2]、朝岡　愛[2]、河野悠介[1]、解野誠司、永野富郎[1]、○石橋　純[2]
（和歌山工技セ、[1]JITSUBO（株）、[2]農生資研）
Makoto Nakamura, Hideaki Suzuki[1], Takashi Iwasaki[2], Ai Asaoka[2], Yusuke Kohno[1], Seiji Tokino, Tomio Nagano[1] and ○Jun Ishibashi[2] (WINTEC, [1]JITSUBO Co LTD, [2]NIAS)

【目的】食品の安全、健康な生活の確保、感染症の予防は重要な課題であり、国民の清潔志向も非常に高いことから、抗菌性素材の使用は極めて一般化している。抗菌性素材の市場は年間８千億円と言われ、非常に多くの需要が見込まれる分野である。我々は、カブトムシディフェンシンを改変することにより、強い抗菌性を有する９残基の改変ペプチドを得ている。この優れた特性を活かし、抗菌性素材に対する高い需要に応えるため、改変ペプチドを有効成分とした新規抗菌性素材の開発を試みた。

【方法】綿布の水酸基をブロモ化し、リンカー分子を共有結合させた後に、綿布上でペプチド合成を行うことにより改変ペプチドが直接綿布上に共有結合した綿布を作製した。直接法では、加工が極めて煩雑であること、綿布上で合成反応を行うことから、使用する試薬による綿布へのダメージが懸念される。このため、簡便な加工法として、改変ペプチド・ポリマー複合体による繊維加工技術を開発した。ラジカル重合法によりポリマーを合成した後、改変ペプチドユニットを導入し、改変ペプチドーポリマー複合体を得た。この改変ペプチド･ポリマー複合体を綿布にコーティングすることにより、抗菌加工を行った。

【結果】得られた改変ペプチド加工綿布は、直接法、ポリマー加工法で作製した両者ともに強い抗菌活性を示し、この活性は繰り返しの洗浄、オートクレーブによる滅菌にも耐久性を示した。改変ペプチドによる抗菌加工が非常に有効であることが明らかになった。

本研究は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」により行われた。

antimicrobial peptide, antibacterial materials

講演番号：3C33p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ C校舎33会場

イネタンパク質由来ペプチドの生体防御に関する多機能性の解析

Multifunctional analysis relating to host defense of peptide from *Oryza sativa* protein

○谷口　正之[1,2]、松橋　嘉保[2]、菊地　理沙[1]、武井　教展[3]、落合　秋人[1,2]、田中　孝明[1,2]
（[1]新潟大・工、[2]新潟大院・自然科学系、[3]新潟大・人材育成セ）
○Masayuki Taniguchi[1,2], Yoshiyashu Matsuhashi[2], Risa Kikuchi[1], Norihiro Takei[3], Akihito Ochiai[1,2], Takaaki Tanaka[1,2]（[1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Dept. Mat. Sci. Technol., Niigata Univ., [3]CFIL, Niigata Univ.）

【目的】近年、従来の抗生物質に対して耐性を有する有害菌の増加に伴って、新しい治療薬として抗菌ペプチド(AMP: Antimicrobial Peptide) が関心を集めている。AMPは、抗菌作用ばかりでなく、創傷治癒効果やリポ多糖(LPS)に対する中和活性を有することが報告されている。そこで本研究では、既に歯周病菌に対する抗菌活性を確認している[1)]米由来ペプチドCL(14-25)について、(A) 歯周病菌*Porphyromonas gingivalis*に対する抗菌活性、(B) *P. gingivalis* が分泌する病原性プロテアーゼであるArg-gingipain (Rgp)に対する阻害活性、および(C) LPSへの結合活性をそれぞれ評価することによって、CL(14-25)の生体防御に関する多機能性を検証した。また、CL(14-25)およびその欠失体 (N端またはC末端の1残基または2残基の塩基性アミノ酸を欠失した変異体) のそれぞれの活性を比較することによって、構成アミノ酸の生体防御に関する活性に対する寄与を比較検討した。
【方法】*P. gingivalis* に対する抗菌活性は、生菌に由来するATP量に基づく発光強度を測定することによって評価した。Rgp阻害活性は、合成基質(Z-Phe-Arg-MCA：ペプチド研社製)がRgpによって分解される時に生じるAMCに由来する蛍光強度を測定することにより評価した。CLペプチドおよびその欠失体のLPS結合活性は、エンドトキシン検出のためのリムルステスト(生化学バイオビジネス社製)によって評価した。
【結果】CL(14-25)は*P. gingivalis* に対して濃度依存的に抗菌活性を示した。N末端のアルギニン(R)残基とC末端のリジン(K)残基をそれぞれ欠失したペプチドの抗菌活性は、CL(14-25)と比べて約50%程度に低下した。一方、N端またはC末端の2残基の塩基性アミノ酸を欠失したペプチドは、抗菌活性が大幅に低下した。また、CL(14-25)およびその欠失体のRgp阻害様式はいずれも混合型であった。N-末端の1ないし2残基のR残基を欠失したペプチドは、抗菌活性ばかりでなくRgp阻害活性も低下した。さらに、リムルステストにおいてCL(14-25)の添加濃度が増加するにつれて、エンドトキシンの活性が低下した。それぞれの欠失体のLPS結合活性については現在検討中である。これまでの結果から、CL(14-25)を構成するN端とC末端の塩基性アミノ酸の各活性に対する寄与は、同等ではなく異なることが示唆された。

１）松橋ら：平成23年度日本生物工学会大会(東京)、講演要旨集、p.148 (2011).

antimicrobial peptide, multifunction, host defense peptide

講演番号：3C33p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ C校舎33会場

ペプチド移植による抗体様RNA分解酵素の作製

Generation of an antibody-like ribonuclease by peptide grafting

○水巻　耕輔、北村　昌也、中西　猛　（阪市大・院工・化生）

○Kousuke Mizumaki, Masaya Kitamura, Takeshi Nakanishi (Dept. of Appl. Chem. and Bioeng., Grad. Sch. of Eng., Osaka City Univ.)

【目的】

細胞傷害活性を示すヒト由来 RNA 分解酵素(RNase)が研究開発され、がん治療薬としての応用が期待されている。しかしながら、RNase の細胞内への取り込みは、細胞表面との非特異的静電相互作用によって生じると考えられており、細胞傷害活性を誘導するためにはμM オーダーの RNase を必要とする。そこで本研究では、特異的かつ高い細胞傷害活性を示す RNase の創製を目的として、ヒト由来 RNase 1 に対して機能性人工ペプチドを導入し、機能評価を行った。

【方法】

ヒト由来 RNase 1 に対して、がん細胞に過剰発現している上皮増殖因子受容体(EGFR)に結合性を示す機能性人工ペプチドの導入を試みた。まず、結晶構造を基に RNA 分解活性に重要な 2 つのヒスチジン残基から離れた位置に存在するループ領域を選定した。次に、ホモロジーモデリング法を用いて構造モデルを構築し、ペプチド挿入箇所を決定した。オーバーラップ伸長 PCR 法を用いて、ペプチドを挿入した RNase 1 遺伝子を合成し、大腸菌発現ベクターを構築した。さらに N 末端側にペプチドを付加した RNase 1 の発現ベクターを構築した。作製した各 RNase 1 の発現ベクターを用いて、それぞれ得られた形質転換体を 37℃で培養した。菌体を超音波破砕した後、不溶性タンパク質をグアニジン塩酸で可溶化した。金属キレートアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製し、希釈法により巻き戻し操作を行った。調製した各 RNase 1 を用いて、活性染色及び tRNA に対する分解活性測定を行った。

【結果】

分泌発現系を用いて、可溶性 RNase 1 の調製を試みたが、宿主に対する細胞毒性のため、安定な発現系を構築できなかった。そこで、シグナルペプチドを除去し、不溶性タンパク質として RNase 1 を得た。希釈法を用いた巻き戻し操作により、可溶性 RNase 1 の調製系を構築できた。活性染色及び tRNA に対する分解活性測定の結果、機能性人工ペプチドを挿入した RNase 1 は RNA 分解活性を示したことから、酵素活性を保持した状態で機能性人工ペプチドを導入することに成功した。現在、EGFR に対する結合活性やがん細胞傷害活性などの検討を進めている。

ribonuclease, antibody, protein engineering

講演番号：3C33p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎33会場

酵母を用いたGタンパク質共役受容体アッセイと細胞膜提示ペプチドリガンドの開発

Assay system for G protein-coupled receptors and development of membrane-displayed peptide ligand in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*

○原 圭祐、黒田 浩一、植田 充美（京大院農・応用生命）
○Keisuke Hara, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda (Kyoto Univ. Div. Appl. Life Sci.)

【目的】G タンパク質共役受容体（GPCR）はヒトゲノムの中で最大の遺伝子ファミリーの１つを形成する七回膜貫通細胞膜受容体であり、製薬産業における最大の創薬ターゲットである。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた GPCR アッセイシステムは、受容体の薬理やシグナル伝達メカニズムを解析するための実験システムとして確立されてきたが、GPCR のペプチドリガンド探索のための新たな方法が求められている。そこで、本研究では酵母の細胞膜上に GPCR に対するペプチドリガンドを提示する「細胞膜提示ペプチドリガンド」の開発を行った。

【方法と結果】まず、シグナル応答を可視化・定量化するためにシグナル検出用プラスミドの構築を行い、シグナル感度を向上させるための遺伝子破壊を導入した酵母株を構築した。次に、細胞膜提示ペプチドリガンドのモデル系として、酵母接合因子応答経路の GPCR に対する内因性ペプチドリガンド（αファクター）を酵母細胞膜上に発現させる系を構築した。蛍光レポーター遺伝子アッセイ・蛍光顕微鏡観察・フローサイトメトリー分析・ウェスタンブロットなどの実験手法を用いた実験の結果、細胞膜上に提示した α ファクターが酵母の接合因子応答経路を機能的に活性化することが明らかとなった。[1] ヒト GPCR への応用展開として、ヒト GPCR を異種発現する酵母株の構築を行った。この際、共役する G タンパク質のαサブユニットをキメラ化することで、[2] ヒト GPCR と酵母シグナル伝達系が共役するように工夫した。アッセイの結果、複数のヒト GPCR に関して機能的に発現することが確認された。さらに、ヒト GPCR に対する細胞膜提示ペプチドリガンドの応用として、対応するペプチドリガンドを細胞膜提示させた酵母株を構築した。モデル系と同様の手法により、細胞膜提示ペプチドリガンドがヒト GPCR に関しても機能的にシグナル活性化を引き起こすことが明らかとなった。[3] 以上、本研究で新たに構築した細胞膜提示ペプチドリガンド技術は、ヒト GPCR を標的とした新たな創薬ツールとしての展開も期待される。

[1]Hara *et al.* submitted [2]Hara *et al.* in press [3]Hara *et al.* submitted

Yeast GPCR assay, Membrane-display ligand, Chimeric Gα subunit

講演番号：3C33p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎33会場

バイオミメティックゲル新素材“ドーパミルポリ-γ-グルタミン酸”の環境調和合成と機能分析

Environmentally-Friendly Synthesis and Functional Analysis of Dopamyl-Poly-γ-Glutamate, a Novel Biomimetic Gel-Material

○芦内 誠、大矢 遥那、山崎 紗千代（高知大・農）
○Makoto Ashiuchi, Haruna Oya, Sachiyo Yamasaki (Kochi Univ.)

【目的】接着は我々の身の回りで常に起こっている現象であり、事実、産業的に利用されている場面も少なくない。一方、近年の環境調和への関心の高まりを受け、生物の接着現象の応用にも注目が集まるようになってきた。我々は、貝類の水中接着器官がカテコール基に富むタンパク質で構成されていることに着目し、該分子構造を納豆等の粘着性高分子として知られるポリ-γ-グルタミン酸（ＰＧＡ）に導入したバイオミメティック新素材“ドーパミルＰＧＡ”を開発した。次いで、高吸水ゲルの特性を示すことを明らかにした[1)]。今回、環境負荷の低減と合成効率向上の双方の要請に応えることのできる画期的なドーパミルＰＧＡ合成法を確立したので報告する。ドーパミルＰＧＡに見いだされた新たな機能についてもあわせて触れる。**【方法と結果】**機能性高分子の合成や修飾（改質）に際し、重縮合反応の利用は重要な選択肢の一つとなる。その中で、従来の加熱法や酸クロリド法はエネルギーや環境の問題から縮小傾向を余儀なくされ、代わって化学触媒法が台頭しつつある。ただし、環境調和の面で優れた化学触媒法もコスト面や反応効率の問題が解消できず、産業技術化にはまだ時間がかかる。実際、ＷＳＣと呼ばれる重縮合触媒を投入しドーパミルＰＧＡの合成を図ったところ、使用したＰＧＡ量の１％程度しか変換できず、化学触媒法の弱点が浮き彫りになる結果となった。我々は既知の重縮合系とは明らかに異なる系の設計に成功し[2)]、本反応系を基礎とする新手法を“イオンコンプレックス縮合法”と名付けた。該反応は混合操作のみで開始できるため、簡便かつスケールアップの想定も容易な上、常温常圧／有害な化学薬剤不要／高価な化学触媒不要等、今日の環境調和合成に求められる基本的な条件も満たしていた。今回、本イオンコンプレックス縮合法を用いた場合、反応に用いたＰＧＡ分子の少なくとも７０％はドーパミルＰＧＡに変換されることが判明し、合成（変換）効率の面でも圧倒的に優れているとの結論に至った。次いで、ドーパミルＰＧＡゲルの機能・性能を調査した。結果、物理ゲルとしては異例、化学ゲルにも匹敵する高度な吸水性（自重量の１０００倍程度）を発揮するばかりか、レオロジー分析の結果からは自己修復ゲルである可能性まで示唆された。酸素応答性ゲル（色調変化や長寿命化の進行等）や金属応答性ゲル（金属イオン濃度に依存した体積（形状）変化等）の特徴と考えられる挙動も認められた。最後に、ドーパミルＰＧＡゲルに期待される新用途展開について考察する。

１）D. Yamashiro, H. Oya, Y. Minouchi, M. Ashiuchi, Biosynthesis and chemical reforming of water-soluble polyamide material, poly-γ-glutamate, The 3rd International Conference on Bio-based Polymers 2011 (Beijing, China), Preprint IL-18, pp.18
２）特願2011-064054 (2011)

Dopamyl PGA, Gel, Environmentally-friendly synthesis

講演番号：3C33p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎33会場

ROCK阻害剤Y-27632の添加が幹細胞の神経細胞への分化に及ぼす影響

Effect of Y-27632 addition on neuronal differentiation of stem cells

○上芝原 佑[1]、中村 麻衣[2]、清水 範夫[1,2]（[1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・生命科学）
○Yu Kamishibahara[1], Mai Nakamura[2], Norio Shimizu[1,2]（[1]Grad. Sch. of Life Sci., [2]Fac. of Life Sci., Toyo Univ.）

【目的】胚性幹細胞(embryonic stem cell ： ES細胞)や人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell ： iPS細胞)を再生医療や薬剤の効果・毒性試験等に適用することが考えられている。これらの幹細胞を分散培養すると、大部分の細胞がアポトーシスにより細胞死を起こすことが知られている。最近、分散培養により生じるアポトーシスはRhoキナーゼ(ROCK)の経路が関わっていることが明らかになり、ROCKの働きを阻害するY-27632を培養液に添加することにより、分散培養によって起こるアポトーシスを抑制できることが分かった。そこで、我々はROCK阻害剤を添加してiPS細胞を分散培養することにより、iPS細胞から神経細胞に効率よく分化誘導する方法と、ES細胞やiPS細胞から得られた細胞コロニーにROCK阻害剤を添加して、神経細胞に分化誘導する方法について検討した。
【方法】ROCK阻害剤の添加がマウスES細胞やマウスiPS細胞の分化に及ぼす影響を調べるために、ROCK阻害剤またはROCK阻害剤と一緒に神経成長因子(nerve growth factor ： NGF)を添加してiPS細胞の分散培養を行った。培養12日目にβⅢ-tubulin(神経細胞のマーカータンパク質)の抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、In Cell Analyzer 1000を用いて蛍光強度を測定し、神経細胞への分化割合を調べた。また、分化抑制因子(LIF)を添加した浮遊培養により直径200 μmの細胞コロニーを作製し、細胞コロニーにROCK阻害剤またはROCK阻害剤と一緒にNGFを添加して分化培養した。培養12日目に分散培養の場合と同様に抗βⅢ-tubulin抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、フルオロ・イメージアナライザーを用いて蛍光強度を測定し、神経細胞への分化割合を調べた。
【結果】分散培養によりiPS細胞を神経細胞に分化誘導させたところ、ROCK阻害剤と一緒にNGFを添加した場合に神経細胞への分化割合が最も高くなった。ROCK阻害剤を細胞コロニーに添加し分化培養を行った結果、ES細胞およびiPS細胞とも無添加の場合に比較して、神経細胞に分化した割合が高くなった。しかし、ROCK阻害剤を高濃度で添加した場合、神経細胞への分化割合が低下した。一方、ROCK阻害剤と一緒にNGFをiPS細胞コロニーに添加した場合、ROCK阻害剤を高濃度で添加した場合においても神経細胞に分化した割合が高くなった。
　以上の結果から、ROCK阻害剤を添加して幹細胞を分化誘導させることで神経細胞に効率的に分化誘導できることが明らかになった。

Y-27632 addition, Stem cell, Differentiation

講演番号：3C33p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎33会場

ナノ材料を用いたマウスES細胞の神経細胞への分化誘導

Differentiation of mouse embryonic stem cells into neurons by nanomaterials

○三浦　和典、Whitby Raymond[1]、清水　範夫、(東洋大院・生命科学、[1]ブライトン大学)
○Kazunori Miura, Raymond Whitby[1], Norio Shimizu (Grad. Sch. of Life Sci., Toyo Univ., [1]Univ. of Brighton)

【目的】マウス胚性幹細胞（ES 細胞）は多分化能を持つため、*in vitro* で特定の細胞に効率良く分化誘導する方法が検討されている。また、カーボンナノチューブ（CNT）は高い安定性や電気伝導性といった特異的性質を有することから、生命科学分野での応用が期待されている物質である。本研究では、ナノ材料である CNT、フラーレンまたはグラファイトを分化用培地に添加して、ES 細胞の神経細胞への分化誘導効果を検討した。
【方法】分化抑制因子である leukemia inhibitory factor（LIF）を含む培地でマウス ES 細胞を 7 日間浮遊培養して ES 細胞コロニーを形成させた後、CNT、フラーレン、グラファイトを添加した分化用培地で 12 日間培養して分化誘導させた。その後、免疫蛍光染色を行い、フルオロ・イメージアナライザー、インセル・アナライザー、フローサイトメーターを用いて神経細胞への分化誘導効果を検討した。また、CNT を添加して分化培養を開始した ES 細胞コロニーを回収し、ウエスタンブロット法を用いて CNT が ES 細胞のシグナル伝達系に及ぼす影響を検討した。さらに、CNT を FITC 修飾し、共焦点顕微鏡を用いて細胞内への取り込みを観察した。
【結果】CNT を培養液に添加し 12 日間分化培養した ES 細胞コロニーを免疫蛍光染色し、フルオロ・イメージアナライザーを用いて蛍光強度を測定した結果、CNT の低濃度では神経細胞への分化誘導効果があることがわかった。また、フローサイトメーターを用いて分化細胞の割合を測定したところ、CNT 無添加の場合の約 1.5 倍の分化誘導効果がみられた。さらに、フルオロ・イメージアナライザー及びインセル・アナライザーを用いて神経細胞の種類を検討したところ、主に運動神経に分化していることが観察された。また、炭素同素体であるフラーレン、グラファイトを添加し同様の実験を行った結果、フラーレンには CNT と同様の効果があるが、グラファイトには ES 細胞の神経細胞への分化誘導効果はないことがわかった。つぎに、分化誘導機構の検討のため、FITC 修飾 CNT を分化培養途中で添加し、共焦点顕微鏡を用いて局在を観察したところ、細胞内への取り込みが観察された。また、CNT 無添加または CNT を添加した ES 細胞コロニーを回収し、ウエスタンブロット法を用いて ERK のリン酸化を調べたところ、CNT の添加により ERK のリン酸化が促進されていることがわかった。以上の結果より、CNT は低濃度の添加において、ERK のリン酸化を促進することで、神経細胞への分化誘導効果を有することが示唆される。

Embryonic stem cell, Neuron, Carbon nanotube

講演番号:3C33p17
講演日時、会場:3月24日17:15～ C校舎33会場

生体分子によるカーボンナノチューブの水相分散

The Biomolecules-Assisted Dispersion of Carbon Nanotubes in an Aqueous Solution

○金眞熙[1], 金隆岩[2]、遠藤守信[2]、片岡正和[1,2]（[1]信州大院・工, [2]信州大・工）
○Jin Hee Kim[1], Yoong Ahm Kim[2], Morinobu Endo[2], Masakazu Kataoka[1,2]（[1]Interdisciplinary Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]Fac. Engn., Shinshu Univ.）

【目的】近年、カーボンナノチューブ(CNT)をバイオ分野に応用する研究が活発化している。ナノサイズのCNTは幾何学的に生体分子に類似しており、生体分子と反応できる大きな表面、優れた電気伝導性と熱安定性を有している。しかし、通常は強いファンデルワールス相互作用のため、多数のCNTが束のように凝集した構造で得られる。CNTが持っている本来の性質を充分利用するにはこの構造を解き、分散させる必要がある。現在、CNT分散剤として有機溶媒や界面活性剤が利用されているが、CNTをsp^2状態を完全に保持した状態で生体材料として利用するためには生体高分子でCNTを水相に分散させる必要がある。我々はCNTの分散剤として豊富なバイオマスであり、デジタル的応用も期待できるDNA、あるいは優れた接着性を持ち、医療用でも使用されているイガイタンパクを用いてCNTの水相分散と相互作用の解明を目的としている。
【方法】CNT は単層 CNT (SWCNT)と二層 CNT(DWCNT) を用いた。CNT の分散には断片化した一本鎖(ss)DNA と二本鎖(ds)の鰊精子 DNA、あるいはイガイタンパクを用いた。CNT の分散は、超音波と超遠心後にラマン散乱、紫外可視近赤外、あるいはフォトルミネッセンスマップを用いて確認した。CNT と DNA の分散状態は透過型電子顕微鏡で確認した。
【結果】単層 CNT(SWCNT)の孤立分散は ssDNA を用いた場合、dsDNA を用いた場合の両方で確認できたが､分散効率は ssDNA のほうが dsDNA より高かった｡分散した SWCNT を紫外可視近赤外やフォトルミネッセンスマップ法で調べたところ、代表的な分散剤である界面活性剤、SDBS で分散されている CNT と比べて長波長側への波長シフトが見られた。また透過型電子顕微鏡では CNT 表面に螺旋状に巻き付く ssDNA の様子が確認できた。さらに、dsDNA で分散した SWCNT にセルラーゼを固定化させ、高い酵素反応速度と高温及びアルカリ安定性を示す新しいセルラーゼを作り出した。
さらに、イガイタンパクも用いて DWCNT の水相分散を行った。まず、CNT をカルボキシル基で官能化させ、イガイタンパクの Dopamine の NH_2 と共有結合させた、その結果、イガイタンパクがチューブの表面に均一にコーティング（約 5nm）されているのが透過型電子顕微鏡観察で確認できた。
生体分子で修飾された CNT はバイオマーカー、ドラッグデリバリーシステム及び選択的な癌細胞キラー等へ応用できると考えられる。

Carbon nanotube, DNA, Mussel protein

講演番号:3C33p18
講演日時、会場:3月24日17:26～ C校舎33会場

糸状菌由来免疫回避機能性素材を用いた新規医療用ナノ粒子の開発

Development of imaging nano-particles coated with immune-response free fungal materials

高橋徹，村垣公英[1]，川上和義[2]，冨樫貴成[3]，高見誠一[3]，阿尻雅文[3]，福本学[4]，○阿部敬悦[1,]（東北大・未来研，[1]東北大院農，[2]東北大院医，[3]東北大・多元研，[4]東北大・加齢研究）

Toru Takahashi, Kimihide Muragaki[1], Kazuyoshi Kawakami[2], Takanari Togashi[3], Seiichi Takami[3], Masafumi Ajiri[3], Manabu Fukumoto[4], ○Keietsu Abe[1] (NICHe Tohoku Univ, [1]Grad Sch Agric Sci Tohoku Univ, [2]Grad Sch Med Tohoku Univ, [3]IMRAM Tohoku Univ, [4]IDAC Tohoku Univ)

【目的】医療用ナノ粒子は、蛍光イメージング、MRI、中性子捕捉療法、磁気温熱療法分野、薬物送達系(DDS) としての利用が期待されている。MRIやCTでは固体ナノ粒子がイメージング試薬として利用できるが、静脈内に投与したナノ粒子の殆どが肝臓や脾臓などの細網内皮系（網内系）に捕捉され（マクロファージの貪食）標的組織へ送達できないことが大きな課題となっている。一方、我々は産業糸状菌である麹菌の界面活性蛋白質hydrophobin-RolAがポリエステル表面に結合してポリエステラーゼをリクルートして分解を促進する研究、およびRolAの材料表面への吸着に関する研究を行っていた(1)。その後、ヒト感染性糸状菌*Aspergillus fumigatus*において胞子表層のhydrophobinがヒトの免疫応答回避(ステルス)機能を有することが明らかとなった(2)。そこで我々は、生体中で安定な金属酸化物ナノ粒子に、糸状菌由来の新規ステルス因子である界面活性蛋白質RolAを被覆し、ステルス機能と水溶性を賦与した新規のステルスナノ粒子の開発を行った。本研究では、RolA蛋白質およびRolA被覆酸化鉄粒子のステルス機能を樹状細胞およびマクロファージで評価したので報告する。

【方法】麹菌hydrophobin RolAは、麹菌遺伝子組み換え体を作製し、高発現させた後に、従来法に従って硫安沈殿、カラムクロマトグラフィー精製を行った(1)。更にRolAをポリミキシンビーズで処理しLPSを除去した。酸化鉄(Fe_3O_4)ナノ粒子(平均粒径200nm)は高温熱水反応により合成したものを用いた(3)。次いで酸化鉄ナノ粒子を緩衝液中でLPS-free RolAにて被覆した。精製LPS-free RolAおよびLPS-free RolA被覆酸化鉄ナノ粒子について、C57BL/6マウスより調製した骨髄樹状細胞でサイトカイン産生能を、またマクロファージRAW264.7細胞にLPS-free RolA被覆酸化鉄ナノ粒子を与えて、貪食能を観察した。

【結果】被覆飽和試験の結果、酸化鉄ナノ粒子685.125 mm^2/ 0.118 mgを完全に被覆するには、3 μgのLPS-free RoAが必要であった。この条件でLPS-free RolA完全被覆酸化鉄ナノ粒子を作製した。樹状細胞を用いてサイトカイン産性能を評価した結果、 LPS-free RolA単体およびLPS-free RolA被覆酸化鉄ナノ粒子は、樹状細胞でサイトカイン産生を誘起しなかった。さらにLPS-free RolA被覆酸化鉄ナノ粒子は、マクロファージの貪食回避が可能であった。以上の結果、LPS-free RolA被覆酸化鉄ナノ粒子は、医療用ナノ粒子に必要なステルス能を有すると考えられる。

(1) Takahashi T. et al. *Mol Microbiol* 57:1780,2005
(2) Aimanianda C. et al. *Nature* 460:1117,2009
(3) Togashi T. et al. *Dalton Trans* 40:1073, 2011,

nano particle, fungi, imaging

講演番号：3C34a01
講演日時、会場：3月24日09:00～ C校舎34会場

脂質二分子膜におけるアンホテリシン B チャネルを介したイオン透過

Electrochemical analysis of ion transports across membranes by Amphotericin B channel

○窪田慎太郎、籠橋宏樹、白井　理、加納健司（京大院農・応用生命）
○Shintaro Kubota, Hiroki Kagohashi, Osamu Shirai, Kenji Kano (Kyoto Univ.)

【目的】生物は呼吸や代謝・神経伝達などといった生体機能を、膜を介したイオン透過を制御することで実現しており、イオンチャネルはその制御に関わる重要な因子の1つである。イオンチャネルによるイオンの膜透過は、その透過選択性の発現機構や共存イオンなどによる阻害機構、電位依存性などに興味が持たれている。生体膜は様々な脂質やタンパク質から構成されており、個々のチャネルの反応解析は困難であるため、本研究では生体膜モデルの1つである平面脂質二分子膜を用いて、ステロール類と結合した多量体となってチャネルを形成することが知られているアンホテリシンBについてチャネル形成の解析及び透過特性の解明を行った。アンホテリシンBチャネル存在下で生じる膜透過電流に対して、水相のイオン組成や阻害剤が及ぼす影響について調べることで、このチャネルのイオン透過について検討を行った。
【方法】中央に正円の小孔 (~1 mm) を空けた厚さ200 μmのテフロンシートで隔てられた2室のあるアクリル製の電気化学セルを作成した。この2室に電解質（カリウム塩・塩化物塩）を含む緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.0) を満たした後、リン脂質（ホスファチジルコリン・ホスファチジルエタノールアミンなど）およびステロール類（コレステロール・エルゴステロールなど）を含む*n*-デカン溶液を小孔部分に塗りつける刷毛塗り法によって平面脂質二分子膜を作製した。なお、アンホテリシンBは脂質二分子膜作成溶液・2つの水相にあらかじめ所定濃度ずつ添加した。電気化学測定は、2水相に挿入した電位測定用電極（Ag|AgCl電極）を用いて2水相間に電位差を印加し、その際流れた膜透過電流を2水相に挿入した電流測定用電極（Pt電極）を用いて記録した。
【結果】アンホテリシン B チャネルが脂質二分子膜中に存在しているとき、2 水相間に一定の電位を印加すると、チャネル透過に特徴的なステップ状の電流が観察された。この透過電流のヒストグラムを波形解析することで、チャネル特性を示す単一チャネル電流（ステップ 1 つ分の大きさ）と開閉頻度を評価することができた。その結果から、電解質に 4 級アンモニウムイオンや有機酸イオンのようなカリウムイオンや塩化物イオンより大きなイオンを含む系では、チャネルの開閉頻度やコンダクタンスが低下することを明らかにした。また、このような大きなイオンを含む系では、チャネルが開状態である際の持続時間が短いことも判明した。当日は、様々な電解質・阻害剤を用いた結果から、詳細なアンホテリシン B によるイオン透過について、イオン半径や水和エネルギーとの関係を念頭に置いて解析結果を報告する予定である。

bilayer lipid membrane, ion channel, Amphotericin B

講演番号：3C34a02
講演日時、会場：3月24日09:11～ C校舎34会場

モデル生体膜系における膜結合型酵素 D-Fructose Dehydrogenase による電子移動に駆動されたイオン透過

Ion transport across the model biomembrane system driven by the electron transfer caused by the membrane bound enzyme, D-Fructose Dehydrogenase

七里 慧、○白井 理、加納 健司（京都大院・農）
Kei Hichiri, ○Osamu Shirai, Kenji Kano (Kyoto Univ.)

【目的】膜結合型酵素 D-Fructose Dehydrogenase (FDH, *Gluconobacter sp.* 由来) をモデル生体膜系に組み込み、電子伝達系を構成した。さらに、この電子移動によって駆動されるイオンの膜透過について、電気化学的な手法とリポソーム内外での物質透過挙動の評価より検討した。
【方法】脂質二分子膜 (BLM) は、直径 0.8 mm の小孔をあけたテフロンシートを二つのアクリルセルで挟み、セルの2室を電解質水溶液 (KCl) で満たした後に、小孔部分に lecithin、cholesterol の *n*-decane 溶液（脂質溶液）を刷毛で塗りつける刷毛塗り法で作製した。二つの水相 (W1, W2) に電位規制用 Ag|AgCl 電極と電流測定用 Pt 電極をそれぞれ挿入し、4 電極方式によって測定を行った。リポソームは、ナスフラスコの壁面に形成させた脂質フィルムを、緩衝溶液中で懸濁させ、さらにエクストルーダを用いて直径約 100 nm のリポソームを作製した。FDH を凍結融解法でリポソームに組み込んだ後、リポソームとリポソーム外液は Sephadex G-50 カラムを用いて分離した。
【結果】BLM を用いた実験系では、疎水性の電子伝達メディエータである 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ) を BLM 内に組み込んだ。W1 に FDH およびその基質である D-fructose を添加すると、FDH により還元された TCNQ の一電子還元体 ($TCNQ^{\bullet-}$) がキャリアとして働き、膜電位の印加に伴って水相の主に H^+ の移動が観察された。続いて、W2 に電子受容体である $K_3[Fe(CN)_6]$ を加えると、膜電位がゼロの状態で W1 の D-fructose から FDH, TCNQ を介して W2 の $K_3[Fe(CN)_6]$ へと一方向の電子移動が生じることによる電流が観察された。さらに、膜電位（W2を基準とした W1 の電位）を正方向に大きくしていくとこの電流は小さくなり、約 200 mV に達したところで電流が流れなくなった（ゼロ電流電位)。ゼロ電流電位においては、酸化還元電位差によって駆動される電子移動による負電流と、膜電位によって駆動される H^+ の移動による正電流が釣り合い、正味の電荷移動がなくなったと考えられる。また、リポソームやミトコンドリア内膜のような閉鎖小胞においては、電気的中性則を保持するように膜電位は常にゼロ電流電位にあると考えられる。そこで、FDH と D-fructose、緩衝溶液を封入した TCNQ を含むリポソーム溶液を調製した。リポソーム外液に $K_3[Fe(CN)_6]$ を添加し、H^+ のリポソーム外への流出挙動を調べた結果について報告する。

Bilayer lipid membrane, Fructose dehydrogenase, Coupling between electron transfer and ion transport

講演番号：3C34a03
講演日時、会場：3月24日09:22～ C校舎34会場

薄層リング電極を用いた電気化学測定による微生物活性の定量法

Quantitative determination of microbial activity by electrochemical measurement with thin-ring electrode

○野田　達夫、濱本　勝美、白井　理、加納　健司（京大院農・応用生命）
○Tatsuo Noda, Katsumi Hamamoto, Osamu Shirai, Kenji Kano (Kyoto University)

【目的】微生物は、食品や医薬品などの分野における有用物質生産の一翼を担っており、我々の豊かな生活を支えている。近年では、微生物を酵素の袋と捉え、酵素を単離することなく、そのままバイオ電池やバイオセンサへ利用した例も報告されており、微生物の産業利用への期待はますます高まってきている。これらの更なる発展を目指す上で、有用微生物の探索や反応条件の最適化などは重要であり、微生物の活性を評価するシステムの構築は必要不可欠である。しかしながら、微生物活性の速度パラメータを定量的に評価した報告例は数少ない。その理由の一つとしては、酵素活性測定に通常使用される分光法が、微生物をそのまま用いた懸濁系での測定に適さないことが挙げられる。そこで我々は、溶液の懸濁状態に左右されない電気化学測定法に注目し、電気化学測定法に基づく微生物活性の定量的評価法の構築を試みた。測定に使用する電極として、直径数mm、厚さ数百nmの薄層リング電極を独自に開発した。薄層リング電極では、測定時間に依存しない定常電流が得られ、μMレベルの濃度変化も十分に追跡可能な応答感度を有している。吸光光度法との比較を通じ、本測定法の妥当性を評価した上で、実際に微生物活性測定を行った。

【方法】薄層リング電極は、直径5 mmのエポキシロッドに、厚さ100 nmのAu薄膜をスパッタリング法で形成し、最後にエポキシ樹脂で被覆することで作製した。電気化学測定は、Ar雰囲気下で、薄層リング電極を作用極、白金を対極、Ag|AgCl電極を参照極とした三電極式で行った。また測定セルには、ウォータージャケットを備えたものを使用し、温度を30 °Cの一定に保った。

【結果】まず、酵素としてPQQ依存型グルコースデヒドロゲナーゼ（PQQ-GDH）を、電子受容体として2,6-ジクロロインドフェノール（DCIP）を用い、グルコース酸化に伴うDCIPの濃度変化を記録した。その結果は、吸光光度法で得られるものと良く一致したことから、薄層リング電極による測定法は、実際の活性測定に十分利用できることが明らかとなった。しかし、*p*-ベンゾキノン（*p*-BQ）を電子受容体として用いた測定系では、双方の結果は一致しなかった。吸光光度法では、*p*-BQと反応中間体による吸収が重なるためと考えられる。一方、薄層リング電極を用いた電気化学測定では、こうした反応中間体の影響を受けることなく測定でき、その利点を明らかにした。最後に、微生物の活性を測定すべく、大腸菌*E. coli* と、電子受容体として2,3-ジメトキシ-5-メチル-1,4-ベンゾキノン（Q_0）を用い、グルコース代謝速度に伴うQ_0の濃度変化を測定した。測定結果から、大腸菌の触媒活性をQ_0濃度に対してプロットしたところ、Michaelis-Menten型の曲線となった。酵素反応のPing-Pong機構と同等と仮定し、単位菌体当たりの反応速度定数$k_{cat} = 2.9 \times 10^{-18}$ mol s^{-1} cell^{-1}、およびQ_0に対するMichaelis定数$K_M = 1.8 \times 10^{-5}$ Mを算出した。

Microbial activity, Electrochemical measurement, Thin-ring electrode

講演番号：3C34a04
講演日時、会場：3月24日09:33～ C校舎34会場

水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法による正確なMICの測定

Determination of accurate MIC by microbial detection method using water-soluble tetrazolium salts.

○塚谷　忠之、末永　光、志賀　匡宣[1]、野口　克也[1]、松本　清[2]（福工技セ・生物食品研、[1]（株）同仁化学研、[2]崇城大・生物生命）

○ Tadayuki Tsukatani, Hikaru Suenaga, Masanobu Shiga[1], Katsuya Nouguchi[1], Kiyoshi Matsumoto[2] (Fukuoka Industrial Technology Center, [1]Dojindo Laboratories, [2]Sojo University)

【目的】薬剤感受性試験は抗生物質に対する微生物の感受性を調べる試験であり、その結果は感染症治療で有効な抗生物質を選択するための指標となる。CLSI（米国臨床検査標準委員会）で規定されている薬剤感受性試験（微量液体希釈法）では 24 時間以内の培養で微生物の発育の有無が目視判定される。しかし、菌種によっては培養時間が不十分なためにその耐性度が過小評価される場合がある。そこで、本研究では、水溶性テトラゾリウム塩 WST を用いた微生物検出法（本法）を微量液体希釈法へ適用することで正確な最小発育阻止濃度（MIC）測定法の確立を試みた。
【方法】(1)検出試薬：電子メディエータ2-methyl-1,4-naphthoquinone及び水溶性テトラゾリウム塩WST-8を10%DMSO水溶液に溶解し、検出試薬とした。
(2)従来法（CLSI法）によるMIC測定：96ウェルマイクロプレートにMueller-Hinton brothにより調製した２倍希釈系列濃度の抗生物質溶液95μLを分注し、これに微生物培養液（約10^7cfu/mL）5μLを加え、35℃で一定時間培養した。培養後、発育が認められないウェルを目視判定し、MIC値を測定した。
(3)本法による MIC 測定：(2)と同様にして 96 ウェルマイクロプレートで抗生物質と微生物を一定時間培養した。培養後、検出試薬 5μL を添加して２時間反応させ、460nm における吸光度測定に供した。ブランクと比較して吸光度変化が 0.05 以上のウェルを生育、以下のウェルを阻止と判定し、MIC 値を測定した。
【結果】代表的な標準菌株（QC strain、Type strain）と様々な抗生物質の組み合わせに対して、本法と従来法を用いて薬剤感受性試験を実施し、24時間で得られたMIC値を比較した。その結果、本法と比較して従来法では40.5%（47/116）の組み合わせにおいて低いMIC値を示した。過小評価された組み合わせには抗生物質に対して耐性を示す菌株が多いのが特徴であった。
　そこで、代表的な薬剤耐性菌（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、バンコマイシン耐性腸球菌、多剤耐性緑膿菌等）に対して同様の薬剤感受性試験を実施したところ、従来法（24時間）で得られたMIC値は本法（24時間）のMIC値より過小評価される傾向を示した。一方、従来法の培養時間を72あるいは96時間まで延長して得られたMIC値と本法（24時間）により得られたMIC値は良好に一致した。以上の結果から、本法を用いることで薬剤耐性菌を含む幅広い菌種に関して24時間以内に正確なMIC値を測定可能であることが示唆された。

drug-resistance, susceptibility testing, water-soluble tetrazolium salt

講演番号：3C34a05
講演日時、会場：3月24日09:44～ C校舎34会場

信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタによるＲＮＡ合成反応の検出

Detection of RNA synthesis reaction using a signal accumulation type of ion-sensitive field effect transistor

○西矢 芳昭、谷 敏夫[1]、山本 佳宏[2]（摂南大・理工・生命科学、[1](株)バイオエックス、[2]京都市産技研・バイオ）

○Yoshiaki Nishiya, Toshio Tani[1], Yoshihiro Yamamoto[2] (Setsunan Univ., [1]Bio-X, [2]KMIRI)

【目的】　医療や分析化学、食品工学などの分野では、電流検出タイプの酵素センサを用いた計測が盛んに実施されている。一方、われわれは信号累積型のイオン感応性電界効果トランジスタ（Ion-sensitive field effect transistor；ISFET）を用いた電位検出タイプのバイオセンサを検討している。ISFETセンサは、表面のイオン感応膜に溶液が接すると溶液中のイオン活量に応じて表面電位が発生するしくみを利用している。用途のひとつとして、ISFETは水素イオンに感応し、pHセンサになる。

ISFETは電流検出タイプと異なり、酸化還元酵素以外にも様々な酵素を利用でき、メディエーターが不要で、基本組成は酵素とバッファーのみ、集積回路の工程により小型化及び規格化、大量生産が容易という様々な利点がある。しかし、感度が低いという問題があり、電流検出タイプと比べると普及していない。われわれが検討している信号累積型ISFETは、電荷をセンサ内に蓄積できる。そして測定を瞬時に複数回繰り返し、信号を累積した後に取り出す機能を備えているために感度向上を可能としている。

われわれは、信号累積型ISFETを用いて核酸増幅反応をラベルフリー且つリアルタイムに検出することを目指し、今回その初期段階としてRNA合成反応の検出を検討したので報告する。

【方法】　RNA合成反応は、プラスミドの制限酵素切断断片を鋳型とし、T7RNAポリメラーゼ系にて行った。信号累積型ISFETはAMIS-001を、測定装置はAMIS-101をそれぞれ使用した（共に(株)バイオエックス製）。

【結果】　核酸合成では、DNA、RNAに関わらずピロリン酸が生成する。生成したピロリン酸は電離し、最終的にイオン活量が変化し水素イオン濃度が上昇する。したがって、原理的に信号累積型ISFETによる検出が可能と考えた。シグナル（水素イオン濃度の変化に伴う電荷）の累積回数を10回に設定し、5秒毎に数分間測定を行った。その結果、T7RNAポリメラーゼによるRNA合成反応をシグナル変化の直線的なタイムコースとして検出することができた。RNA合成反応の、ラベルフリー、リアルタイム検出は可能と考える。信号累積型ISFETの応用について、他の事例も含めて報告したい。

Biosensor, ISFET, RNA polymerase

講演番号：3C34a06
講演日時、会場：3月24日10:05～ C校舎34会場

質量分析に基づく定量的メタボロミクスに資する新規相対定量法の提案

Suggestion of the novel relative quantitation methodology for MS-based quantitative metabolomics

○竹林 宏祐、喜多村 美紀、馬場 健史、福崎 英一郎（阪大院工・生命先端工）
○Kosuke Takebayashi, Miki Kitamura, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki (Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

【目的】メタボロミクスにおいて，質量分析はもっとも重要な定性/定量法であるが，抽出，誘導体化，分析において対象とする生体サンプルに由来する夾雑物の影響を受け，時として定量性を損なう場合がある．また，入手困難な標品に関しては外部標準による検量，ならびに内部標準による各工程の標準化が事実上不可能となる．本研究では上記問題の解決のため，新規相対定量法を提案し，その原理確認を目的とした．
【原理】本方法論は標品を用いない．対照とする生体サンプル（コントロールサンプル）を規定し，当該サンプルの抽出物から調製した希釈系列サンプルをGC/MSあるいはLC/MS分析等に供し，検出された各代謝物ピークの擬似検量線を作製する．生体サンプル（実サンプル）の分析結果の各代謝物ピークエリア値，あるいは高さ値と同等量を示すコントロールサンプル重量をもって，当該代謝物の「コントロールサンプル当量」と規定する．本手法は，当然のことながら標品は必要なく，未知化合物の相対定量も可能である．また，コントロールサンプル当量という無次元のarbitrary unitで定量値のスケールが統一されるので，異なる機器分析結果との定量値互換も原理的に可能となる．さらに，擬似検量線を作製する過程において化合物ピークの絞り込みが達成されデータの信頼性が向上する．
【方法】以上の方法論を確立するため，今回はGC/MSを用いて緑茶サンプルを分析し従来法との比較を行った．
【結果】マススペクトルと保持時間から同定された代謝物ピークであっても，検量線作製に際して希釈系列に沿って増減しないピークもいくつか見つかった．また，従来の半定量値では他の代謝物に比べて大きな差がなくとも，本手法によって内生量比に大きな差がある代謝物ピークを選出することもできた．今回の実験では，本手法を用いることで信頼性の高い化合物ピークを選出し，より内生量比に即した相対定量値を得ることが可能であることが示された．
現在はイオンペアLC/MS/MSを用いた中央代謝関連化合物群の分析プラットフォームとの統合解析を行い，異なる機器分析結果間での互換性を検証している．

metabolomics, relative quantitation, mass spectrometry

講演番号：3C34a07
講演日時、会場：3月24日10:16～ C校舎34会場

超臨界流体クロマトグラフィータンデム質量分析を用いた単一観測システムによる残留農薬迅速一斉分析方法の開発

Development of high-throughput and multiple analytical method for pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry

○石橋愛実，松原惇起，内方崇人，酒井美穂[1]，安藤孝[1]，福崎英一郎，馬場健史
(阪大院・工・生命先端、[1]宮崎県総合農業試験場)
○Megumi Ishibashi, Atsuki Matsubara, Takato Uchikata, Miho Sakai[1], Takashi Ando[1], Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [1]Miyazaki Agri. Res. Inst.)

【目的】2003 年のポジティブリスト制度の導入により食品中に残留する農薬，動物用医薬品等の分析が必須になった．これまでの残留農薬分析システムは，対象成分の多様な物性に対応するため液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)およびガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)が併用されてきた．しかし，二つの分析手法を用いることはシステムの堅牢性のみならず，スループットやコスト面で問題となる．低粘性，高拡散性というクロマトグラフィーの移動相として好適な性質を有する超臨界流体を移動相とする超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)は，高流速分析においても高い分離能を保つ．また，超臨界流体二酸化炭素はヘキサン程度の低極性とされるが，極性溶媒の添加により移動相の溶出力を大幅に変化させることが可能であるため SFC はまさに，様々な極性と分子量をもつ農薬化合物群のハイスループット一斉分離に有用と考えられる．本研究では高選択，高感度のターゲット分析が可能な三連四重極型タンデム質量分析計(MS/MS)を検出器として採用し，残留農薬分析システムの構築を試みた．
【方法】オクタノール／水分配係数(log P=-4.6～7.05)，分子量(112～888)，化学構造(有機リン，カルバメート，ピレスロイド等)の異なる農薬標準品を20種選択し，MS/MS検出条件，SFC分離条件の最適化を行った．さらに標品混合物を用いたバリデーションテストおよび農作物の水/アセトン粗抽出液を用いた標品添加回収試験を行い，本分析システムの実用性を評価した．
【結果】20種類の農薬化合物について，Electron Spray Ionization(ESI)-MS/MSによるMRM条件を最適化した．これまでGC/MS(Electron Ionization，EI法)でのみ測定されていた化合物に関してもESIでイオン化できることが分かった．分離条件を検討した結果，極性基内包型逆相カラムであるODS-EPカラムを用いることで幅広い分子量，極性および化学構造をもつ20種類の農薬成分を10分以内に分離することができ，イオン性化合物のため一斉分析系に組み込むことができないジクワットも同時に分析可能であった．最適化した条件で感度を確認したところ，多くの化合物はpptオーダーで，感度の低かった化合物でもppbオーダーでの検出が可能であった．さらに，農作物粗抽出液への添加回収試験においては，一部の化合物はマトリックスによるイオン化阻害を受けたものの検出限界はいずれも残留基準値を下回った．以上より，SFC-MS/MSが残留農薬の迅速なスクリーニング分析に適用可能な有用分析手法であることが示された．

pesticides, supercritical fluid chromatography, mass spectrometry

講演番号：3C34a08
講演日時、会場：3月24日10:27～ C校舎34会場

GC-Q/MS 分析を用いた焙煎ルワークコーヒーとレギュラーコーヒーの品種と産地の判別

Discrimination of Roasted Kopi Luwak and Regular Coffee Based on Geographical Origins and Coffee Variety using Gas Chromatography Coupled with Quadrupole Mass Spectrometry

○ Jumhawan Udi、Putri Sastia Prama、Yusianto Yusianto[1]、Mawarni Erly[2]、馬場 健史、福崎英一郎（阪大院・工, [1]ICCRI, [2]ITB)

○Udi Jumhawan, Sastia Prama Putri, Yusianto Yusianto[1], Erly Mawarni[2], Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki (Grad.Sch.Eng.Osaka Univ., [1]ICCRI, [2]ITB)

[Introduction] Coffee is an important agricultural commodity that accounts for approximately 14 billion US dollar annually. World's most unique and expensive coffee is Indonesian palm civet coffee, Kopi Luwak (selling price is about 200 to 600 US dollar per pounds). Kopi Luwak is made from coffee cherries that have been eaten by a civet-like animal called luwak (*Paradoxurus hemaphroditus*). Despite its profitability, there is no reliable method for quality control or to discriminate and authenticate Kopi Luwak from other coffee. Therefore, there is an urgent need to develop a robust method for the discrimination of Kopi luwak to prevent adulteration and fraud in the market. By using techniques in metabolomics, rapid and robust discrimination of Kopi Luwak was performed.

[Materials and method] Gas chromatography coupled with quadrupole mass spectrometry (GC-Q/MS) was selected as an analytical method. To extract hydrophilic primary metabolites, solvent mixture of methanol, water and chloroform with a ratio of 2.5/1/1 (v/v/v), respectively, was used. Derivatization agents, methoxyamine and *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), were added to prevent loss of metabolites that are less volatile during GC analysis. Peak detection, baseline correction, peak alignment and metabolites annotation were performed prior to multivariate analysis. Twenty-four samples, consist of Kopi Luwak and regular coffee (3 varieties; Arabica, Robusta, Liberica) from 3 islands of Indonesia (Sumatra, Java, Bali), were analyzed.

[Results and discussion] Kopi Luwak and regular coffee were discriminated based on coffee variety and geographical origins using Principal Component Analysis (PCA). Identification of key marker constituents of Kopi Luwak was successfully achieved by Orthogonal Partial Least Square/Discriminant analysis (OPLS/DA)

Kopi Luwak, Metabolomics, GC-Q/MS

講演番号：3C34a09
講演日時、会場：3月24日10:38～ C校舎34会場

炭素同位体比分析を用いたチャの産地判別技術の確立

Clarifying green tea-growing area based on the carbon isotope analysis

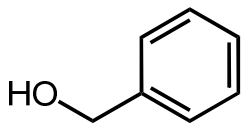
○村田　有明[1]、Uli Engelhardt[2]、山田　桂大[3]、吉田　尚弘[3]、渡辺　修治[1]（[1]静大院・創造、[2]ブラウンシュバイク工科大学・食品化学、[3]東工大理工・化学環境）

○Ariaki Murata[1], Uli Engelhardt[2], Keita Yamada[3], Naohiro Yoshida[3], Naoharu Watanabe[1] ([1]GSST, Shizuoka Univ., [2]TU Braunschweig food chem., [3]Tokyo Insti. Technol.Envir. Chem.)

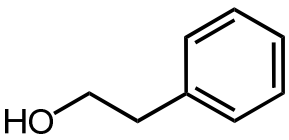
【目的】農産物の産地は植物・動物に関わらずブランド価値を有することが多いため、産地偽装や他産地混入などの違法行為が散見される。現在までに確立した産地判別技術はその精度や応用範囲において課題が見られる。最近、植物個体全体に含まれる無機元素・炭素・酸素・窒素の同位体比分析を用いた産地判別技術が多数報告されている。本研究では国内外各地で栽培されているチャを試料とし、そこに含まれる香気成分（有機分子）の炭素同位体分析を利用した新規産地判別技術の確立を目的としている。

【方法】日本五ヶ所、中国二ヶ所からチャ葉試料（荒茶）を集めた。10 g のチャ葉を液体窒素を用いて凍結粉砕した後、熱水抽出にて抽出液を得た。抽出液はHPLC を用いて精製し、香気成分 benzylalcohol, 2-phenylethanol, (*Z*)-3-hexenol の配糖体を単離した。各配糖体はそれぞれ配糖体糖加水分解酵素GHを用いた酵素加水分解に供し、アグリコンを遊離、回収した。得られた三種の香気成分をGC-IRMS (同位体比質量分析機) に供し、炭素同位体比($^{13}C/^{12}C$) を測定した。

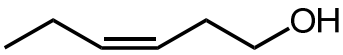
【結果】七ヶ所の産地から得たチャ葉中香気成分の炭素同位体比を得た。三種の香気成分のそれぞれの炭素同位体比はbenzylalcohol $\delta^{13}C$=-36.55～-34.10‰, 2-phenylethanol $\delta^{13}C$=-28.41～-25.07‰, (*Z*)-3-hexenol $\delta^{13}C$=-31.69～-27.49‰ であった。これらを基に統計的解析を行った結果、チャ葉中に含まれる二種以上の香気成分の炭素同位体比を比較することで、中国と日本間の区別だけでなく、日本国内産地間での区別が可能であることが示唆された。



Benzyl alcohol



2-Phenylethanol



(*Z*)-Hexenol

Keyword1 GC-IRMS, Keyword2 Carbon isotope ratio, Keyword3 Aroma compound

講演番号:3C34a10
講演日時、会場:3月24日10:49～ C校舎34会場

GCxGC-QMSを用いた植物中の代謝物分析

Analysis of metabolites in plants using GCxGC-QMS

○坂本 雄紀、川名 修一、中川 勝博、宮川 治彦（島津製作所）
○Yuki Sakamoto, Shuichi Kawana, Katsuhiro Nakagawa, Haruhiko Miyagawa
(SHIMADZU CORPORATION)

【目的】

GC-MSを用いた植物のメタボローム解析では、多数の代謝成分をきょう雑物から分離し同定するために、分離能と定性能力に優れた包括的2次元クロマトグラフ/マススペクトロメータ(GCxGC-MS)が有効であることが知られている。GCxGC-MSのMSには、GCxGCから溶出されるピークが鋭いため高速スキャンが可能なTOFMSが用いられてきた。しかしながら、植物の代謝物は成分ごとに濃度が大幅に異なるため、TOFよりさらに幅広い濃度範囲が測定できる四重極質量分析計(QMS) のGCxGCへの適用が求められていた。本発表では、我々が開発した高速スキャン(20,000 u/sec)が可能なQMSをGCxGC-QMSに用い植物の代謝成分分析へ適用し検討した。

【方法】

GCxGCのモジュレータには米国ZOEX社製を、GC/QMSには高速スキャン測定が可能なGCMS-QP2010 Ultra（島津製作所）を使用した。GCxGCの第一カラムにDB-5 30m x 0.25mm I.D. df=1.00μm (J&W)を、第二カラムに BPX-50 2.5m x 0.10mm I.D. df=0.10μm (SGE)を用いた。植物から代謝物を抽出し、BSTFAを用いトリメチルシリル化を行い、分析試料とした。分離された成分はライブラリサーチにより同定した。ライブラリサーチには、GC/MS代謝成分データベース（島津製作所）とNIST 2011年版を用いた。

【結果】

GCxGCから溶出される約300～400msのピーク幅の成分を測定した結果、スキャン速度10,000 u/secでは1ピークあたりの測定点数が5-6点と不十分であったが、20,000u/secでは1ピークあたり10点以上の測定が行え、正確なクロマトグラムを描画することができた。また、従来のQMSでは、高速スキャンによって高質量域で感度が著しく低下したが、我々が開発したAdvanced Scanning Speed Protocol(ASSP™)機能を適用することによって、感度低下やマススペクトルの劣化が認められなかった。さらに、感度低下が起こらないため、3桁のダイナミックレンジが得られた。以上の結果より、検討したQMSはGCxGCに適用可能であることが明らかとなった。

本システムを用いて、植物から抽出した代謝物をスキャン速度20,000u/secで測定した。その結果、1次元のクロマトグラフでは重なっていたピークが分離し、より濃度範囲が異なる多くのピークが検出された。また、重なったピークが分離されることによってライブラリサーチでの類似度が高くなりピーク同定の信頼性が改善した。以上の結果より、検討したGCxGC-QMSを用いた植物中の代謝物分析への適用が今後期待される。

GCxGC-MS, metabolome, QMS

講演番号：3C34a11
講演日時、会場：3月24日11:10～ C校舎34会場

ペプチドのMS/MSフラグメンテーションを改善する4-アミジノフェニル基のN末端選択的導入法

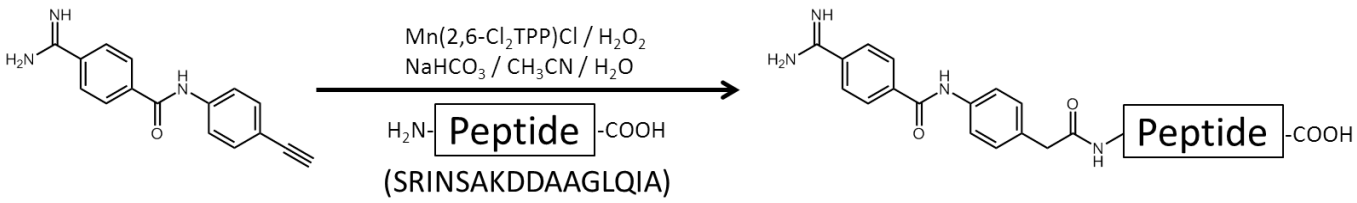
N-terminal selective derivatization with a 4-amidinophenyl group to improve peptide MS/MS fragmentation

○吉川 徹、宮下 正弘、宮川 恒（京大院農・応用生命）
○Toru Yoshikawa, Masahiro Miyashita, Hisashi Miyagawa (Kyoto Univ.)

【目的】*De novo*ペプチドシーケンシング法は、ペプチドのMS/MSスペクトルから直接アミノ酸配列を決定する方法であり、データベースに存在しない未知ペプチドの配列決定や翻訳後修飾されているペプチドの解析に有用な手法である。しかしこの手法では、配列決定に必要なフラグメントが十分に得られない場合があるだけでなく、N末端側とC末端側のフラグメントの判別が難しいこともあり、配列解析は容易ではない。我々はこれまでに、高プロトン親和性を持つ4-アミジノフェニル基をペプチドN末端に導入することにより、N末端側フラグメントの生成が強められ、フラグメンテーションの解釈が容易になることを明らかにした。しかしながら、4-アミジノフェニル基をペプチドに導入する方法としてスクシンイミド活性エステル法を用いる場合、N末端アミノ基だけでなく、Lys側鎖やTyr側鎖にも導入されてしまう問題があった。そこで本研究では、4-アミジノフェニル基のペプチドN末端への選択的導入を達成するため、N末端への選択的アシル化反応として報告されている、アルキンおよび金属ポルフィリン触媒を用いた酸化的アミド結合形成反応の利用を試みた。

【方法】4-アミジノ安息香酸と4-エチニルアニリンを出発原料として、アミジノフェニル基とアルキンを併せ持つようなアミド化合物を合成した。このアミド化合物を、Lys残基を含むペプチド(配列: SRINSAKDDAAGLQIA)に加え、さらに金属ポルフィリン触媒[Mn(2,6-Cl_2TPP)Cl]、過酸化水素、炭酸水素ナトリウムを加えて、室温で一晩反応させた。得られた誘導体化ペプチドを、LCMS-IT-TOF(島津製作所)によって分析した。

【結果】得られた生成物のLC/MS分析を行ったところ、4-アミジノフェニル基を含む修飾基が一つ導入されたペプチドが検出された。これをMS/MS分析に供したところ、N末端アミノ基にのみ導入され、Lys側鎖に導入されたペプチドは検出されなかった。このことから、本手法によって、4-アミジノフェニル基のN末端選択的な導入が可能であることが明らかとなった。



de novo peptide sequencing, N-terminal selective derivatization, mass spectrometry

講演番号:3C34a12
講演日時、会場:3月24日11:21～ C校舎34会場

化合物の分離と混合を同時に行う機能を有する薄層クロマトグラフィーの分析法の開発

Development of a new TLC method for simultaneous performance of separation and mixture

湯本 弘子、林 宣之[1]、市村 一雄、○中山 真義（農研機構・花き研、[1]農研機構・食総研）
Hiroko Shimizu-Yumoto, Nobuyuki Hayashi[1], Kazuo Ichimura, ○Masayoshi Nakayama (NIFS, [1]NFRI)

【目的】花の主要な色素であるアントシアニンの発色に影響を与える、無色あるいは淡色の化合物を補助色素という。一般的な補助色素は、フラボノイドに代表されるアントシアニンの生合成関連化合物であり、アントシアニンの発色を深色化および濃色化する作用を有している。クロマトグラフィーの本来の機能は化合物の分離であり、プレート型クロマトグラフィーである薄層クロマトグラフィー（TLC）は、アントシアニンやフラボノイドの分析方法として広く用いられている。補助色素の様な分子間相互作用を有する化合物を検出するためには、化合物を分離した後に混合する操作を必要とする。我々はTLC上で相反するこれらの操作を同時に行うことのできる方法を開発した。さらにこの方法の有効性を示すために、花に含まれる補助色素を分析した。
【方法】スィートピーのピンク色品種の花弁をメタノールを含む酢酸水で抽出し、新しく開発したTLC法によって分析した。検出された補助色素の候補化合物を精製し、質量分析とNMRによって構造を決定するとともに、補助色素としての機能を解析した。
【結果】TLCに、試料を線状に、斜めに交差させて展着する。各化合物は、上部の原点とそれぞれのRf値を結ぶ特有の角度を持つ線として展開し分離する。化合物の展開線は左右に対象的に存在し、各々の角度に対応して他の化合物の展開線と交差し混合する。アントシアニンの展開線は、補助色素の展開線と交差した点で色が変化する。スィートピーの花弁抽出液をこの方法で分析したところ、アントシアニンの展開線の中に濃色化および薄色化した点が検出された。それぞれの点は、紫外光吸収を示す化合物の展開線と重なっていた。それぞれの紫外光吸収物質を精製し、kaempferol 3-rhamnoside と 2-cyanoethyl-isoxazolin-5-one と同定した。Kaempferol 3-rhamnosideはフラボノイドであり、アントシアニンの発色を深色化および濃色化させる作用を持つ通常の補助色素であった。一方、2-cyanoethyl-isoxazolin-5-oneは従来の補助色素とは異なる基本構造を持つとともに、アントシアニンの発色を薄色化する新規な作用を有していた。構造と作用がともに新規な補助色素を検出したことで、この方法が補助色素の包括的な探索に有効であることが示された。上記TLCの原理を他のプレート型クロマトグラフィーにも適応することで、様々な化合物間の相互作用を検出するための有効な手法になると期待される。

本研究は生研センターの異分野融合研究支援事業の支援を受けて行った。

anthocyanin, copigment, thin-layer chromatography

講演番号:3C34a13
講演日時、会場:3月24日11:32～ C校舎34会場

亜鉛応答性のトランスファクターとシスエレメントの相互作用解析による牛乳とヨーグルト中の亜鉛濃度の測定

Measurement of available zinc in milk and yoghurt by analyzing interaction of the zinc-responsive *trans* factor and *cis* element

○シディキ モハマド ショヘル ラナ、上田 俊策[1]、前田 勇[1]（東京農工大・連合農、[1]宇大・農）
○Mohammad Shohel Rana Siddiki, Shunsaku Ueda[1], Isamu Maeda[1] (United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [1]Fac. Agric., Utsunomiya Univ.)

【目的】Available zinc is an essential nutrient for a healthy diet, but its deficiencies and/or excesses cause metabolic irregularities and pathological changes in human body. Cow milk and its products are very common and recognized as an important source of zinc in human diets. From the viewpoint, this study was conducted with the purpose of developing a simple, inexpensive method for detection of zinc in milk and yoghurt by quantifying interaction between a *trans* factor and a *cis* element *in vitro*.
【方法】*Staphylococcus aureus* CadC was used as the *trans* factor that binds to cadmium, lead or zinc. The green fluorescent protein (GFP)-tagged *trans* factor, CadC-GFP, associated with the *cis* element, P_{cad}-O_{cad}, and lost binding capability to it in its metal-binding conformational state.
【結果】The distribution of zinc and protein of cow's milk and yoghurt changed by lowering pH, and thus, zinc shifted from pellet (casein) to whey. The fluorescence intensities for CadC-GFP mixed with milk or yogurt without lowering pH were significantly decreased with increasing concentrations of Cd(II) or Pb(II) externally added while the decrease of fluorescence was smaller when Zn(II) was externally added. Therefore, different brands of milk and yoghurt bought from markets were partially digested by lowering pH below 4.6. Cell lysate containing CadC-GFP was pre-incubated with 100-times diluted whey of the digested milk or yoghurt, and the mixtures were loaded into microplate wells to allow CadC-GFP contact for 15 min with the surface where the *cis* element was immobilized. The Zn(II) contents determined in different brands of milk and yoghurt varied from 1.8 to 3.8 mg/l and 1.4 to 2.8 mg/l, respectively, by measuring fluorescence obtained as the result of interactions between P_{cad}-O_{cad} and CadC-GFP, and were highly correlated with ICP-AES data ($R = 0.812$). Therefore, sensitive GFP-tagged transcriptional regulators could be advantageous for simple measurement of zinc in milk and yoghurt compared to traditional analytical methods.

GFP, CadC, zinc

講演番号:3C34a14
講演日時、会場:3月24日11:43～ C校舎34会場

鶏卵抗体IgYのELISAへの利用に関する基盤研究

Application of Chicken Anti-human Midkine IgY Antibody to ELISA Measurement System

○山城 知佳, 坪田 庄真[1], 湯沢 由紀夫[2], 門松 健治[1], 池松 真也[3] (沖縄高専・創造システム工学, [1]名大院医・生化, [2]藤田保衛大院医・腎内科, [3]沖縄高専・生物資源工学)

○Chika Yamashiro, Shoma Tsubota[1], Yukio Yuzawa[2], Kenji Kadomatsu[1], Shinya Ikematsu[3] (Okinawa Kousen Advanced Cource, [1]Nagoya Univ., [2]Fujita Health Univ., [3]Okinawa Kousen)

【目的】研究や病気の診断において利用される抗体は，免疫動物の血液中から得た“IgG”がほとんどである．鳥類や両生類では卵の形成過程でIgGが卵黄中に移行することが知られており，“IgY”とよばれている．IgYは，動物を犠牲にすることなく同じ抗体価の抗体が継続的に生産可能であることから，技術の経済性と動物愛護の面から非常に有用であると考えられる．本研究では，ニワトリIgYを用いたELISA測定系の構築を，ミッドカイン(MK)をモデルとして行った．そこで本研究の目標を，(1) MK特異的なニワトリIgGおよびIgYをニワトリ血液と鶏卵からそれぞれ精製し，IgYの量的有用性を確認する，(2) IgGとIgYの反応性の差異についてサンプル測定値をもとに検討する，(3) サンドイッチELISAにおける固相－標識抗体の組み合わせを検討し，評価サンプルの測定に応用可能であることを確認することの3点に設定した．

【方法】まず，ニワトリの血液および卵黄から抗ヒトミッドカイン抗体を精製し，HRP標識を行った．その後ELISAのサンドイッチ法によって，精製抗体の抗体価の評価，固相抗体と標識抗体の組合せ評価，交叉性を評価し，検量線の傾きおよび相関係数などを考慮し，最適な固相抗体と標識抗体の組合せを比較検討した．また，IgGおよびIgYとミッドカインとの分子間相互作用を定量することを目的として，水晶発振子マイクロバランス法(QCM)により両者の結合係数を測定した．

【結果】精製の結果，ニワトリ1羽の血液中に含まれるMK特異的IgG抗体は，鶏卵5.5個から得られるMK特異的IgY抗体量と同程度であることが確認された．精製したニワトリIgGおよびIgYのMKに対する親和性を， QCMおよびELISAにより検討した結果，両者のMKに対する親和性に差異は見られず，MKと50%のアミノ酸相同性を有するプレイオトロフィン(PTN)との交叉反応は両者で認められなかったことから，IgGとIgYの抗原反応性がほぼ同等であることが示された．また，サンドイッチELISAにおける固相－標識抗体の組合せ評価では，ヤギIgGを固相し，ニワトリ抗体(IgG, IgY)を標識抗体として組み合わせたときの検量線が特に高感度であり，最適な組み合わせと考えられた．この抗体の組み合わせで評価サンプルとした培養細胞上清と母乳中のMK濃度を測定し，IgGとIgYでの測定結果を比較した．両者の測定値はほぼ一致し，IgYを用いたMK測定系は，従来のIgGを用いた場合と同様に利用できることが示唆された．

本研究の成果は，臨床サンプル中のMK濃度測定に応用可能な，IgYを用いたELISA測定系の構築に成功したことである．本測定系は従来のIgGを用いた系と同等の感度で測定でき，また卵黄中のIgYを用いるため抗体が継続的に得られ，長期間にわたり測定系を維持できる簡易測定系として有用である．

Immunoglobulin Yolk(IgY), Midkine, ELISA

講演番号:3C34a15
講演日時、会場:3月24日11:54～ C校舎34会場

メラミンおよびアトラジンの簡易かつ高感度測定法の開発

Simple and sensitive quantification of melamine and atrazine by a flow-based immunoassay.

○鈴木 勇輔、天野 郁香[1]、斉木 博[1]、鈴木 義規[1]（工科大院・バイオ、[1]工科大・応生）

○Yusuke Suzuki, Fumika Amano, Yoshinori Suzuki[1], Hiroshi Saiki[1] (Tokyo Univ. Technol. Grad. School ,[1]Tokyo Univ. Technol)

【目的】近年，海外から輸入された食品に様々な有害物質が含まれる事件が発生し，問題になっている．農薬のひとつであるアトラジンは除草剤として使用されている．このアトラジンの汚染が人体における最大許容濃度を上回ると，腎臓の損傷，癌等の悪影響を及ぼすことが知られている．また，メラミン混入粉ミルクによって，乳幼児の腎不全等が多発する事件が発生した．このため，厚生労働省では食品中に2.5 mg/kg以上のメラミンが検出された場合，輸入者に対して該当食品の自主回収等の措置を講じる指導をすることが決定されている．以上のことから，より簡便で高感度に測定ができる分析方法が求められている．本研究では,固相に抗原を固定化したビーズを用いるフロー式イムノアッセイによるメラミン及びアトラジンの検出法を検討した．

【方法】アトラジンをEAHセファロースビーズに固定化させるため，Marvinらの合成方法でジクロロアトラジンを合成し，カルボン酸をビーズに結合させる．一方，メラミンはNHS活性セファロースビーズと結合させる．そして，上記の各ビーズをそれぞれ固相としてKinExA3000のセル内に充填する．次に,化学物質（メラミンとアトラジン）と抗体を競合させ，段階的に化学物質の濃度を変化させたサンプル溶液を注入させる．サンプル中の結合しなかった抗体とビーズにコンジュゲートされた化学物質を結合させた後，Cy5で蛍光標識化された二次抗体を注入して蛍光強度を測定する．

【結果】アトラジンを固相と結合させるため，まず塩化シアヌルは塩基条件下でイソプロピルアミンと反応させ，ジクロロアトラジン（Ⅰ）（IR 3000cm^{-1}）を収率51%で合成した．（Ⅰ）は塩基条件下で6-アミノヘキサン酸と反応させ，アトラジンのカルボン酸誘導体（Ⅱ）を収率数%で得た（IR 1700cm^{-1}）．今後はカルボン酸（Ⅱ）をビーズに結合させ，アトラジンを測定する．メラミンはNHS活性化セファロースビーズと結合させることに成功し，メラミンのシグナルを得ることに成功した．シグナルテストでは，1 nM，500 pM，100 pM，10 pMの各濃度で0.9581 V，0.6909 V，0.5001 V，0.4602 V，0.5689 Vというシグナルを得られ，KinExA3000によってメラミンを検出できることがわかった．

Agrichemical, Immunoassay, Antigen-antibody complex reaction

講演番号：3C34p02
講演日時、会場：3月24日14:00～ C校舎34会場

タイトル　20merにおけるT_mとK_dの関係

Title　K_d change of oligonucleotid, with temperature

○安保　哲、斎木　博[1]、鈴木　義規[1]（工科大院・バイオ、[1]工科大・応生）

○Satoru Abo, Hiroshi Saiki[1], Yoshinori Suzuki[1]（Tokyo Univ. Technol. Grad. School, [1]Tokyo Univ. Technol）

【目的】ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction, PCR）の技術は分子生物学の研究の進歩に大きく関わってきた。今では分子生物学だけでなく遺伝子学や生理学、医療などさまざまな分野で重要な役割を担っている。

PCR に用いるプライマーを設計する際にはアニーリング温度が重要であり、そのアニーリング温度を設定するときに T_m（二本鎖 DNA の融解温度）を目安にする。T_mを算出する方法はいくつかあるが、それぞれの算出方法で導き出された値はわずかに異なる。この異なる数値が導き出されること、さらに算出方法の式には具体的な数値が使われていることから T_m は半経験的に算出されているものであって、理論的な裏づけはされていないと考えた。ハイブリダイゼーションの強さも K_d（結合定数）で表すことができ、T_mと K_dには相関があると考え、これについて検討した。

【測定原理】1本鎖のオリゴ DNA が固定化されているビーズを作製し固相として KinExA3000(flow type fluoresce accumulation assay)内のガラスセルに充填する。そこに FITC がラベル化されたオリゴ DNA と相補鎖のオリゴ DNA を混合し、FITC がラベル化されたオリゴ DNA を段階的に希釈したサンプル溶液を流す。サンプル中の1本鎖オリゴ DNA は互いに反応し、ガラスセルを通る間にガラスセルに充填されたビーズに接触する。ビーズにもあらかじめサンプル中の FITC がラベル化されたオリゴ DNA の相補鎖のオリゴ DNA が固定されているため、サンプル中で反応しなかった FITC がラベル化されたオリゴ DNA はここでビーズに捕捉される。捕捉された FITC がラベル化されたオリゴ DNA に励起光を当てることにより蛍光を発する。サンプル中の相補鎖のオリゴ DNA が少ない場合はビーズ上に捕捉される FITC ラベル化オリゴ DNA の量は増え、蛍光強度は大きくなる。一方、サンプル中の相補鎖のオリゴ DNA が多い場合はビーズ上に捕捉される FITC ラベル化オリゴ DNA の量は減り、蛍光強度は小さくなる。

【方法】NHS-activated Sepharose ビーズに Streptavidin from *Streptomyces avidinii* を固定させ、Biotin をラベル化したオリゴ DNA を結合させたものをビーズとして用いた。そこに FITC がラベル化されたオリゴ DNA の濃度を 10nM～200nM としたサンプルを流し、蛍光強度を測定した（シグナルテスト）。同様に FITC がラベル化されたオリゴ DNA の濃度を段階的に希釈したサンプルを流し、K_dカーブの濃度範囲を決めるための測定をした。測定で導き出された濃度範囲内のいくつかのサンプルを測定し、濃度に対して蛍光強度をプロットした K_dカーブを作成し、そこから K_dを算出した。

【結果】シグナルテストより FITC ラベル化オリゴ DNA の濃度を 20nM（1.1589V）に決定した。濃度範囲を決める測定の結果より 1 μ M～1nM 間での範囲で K_dカーブを作成する測定条件を決定した。K_d 測定結果より室温（24℃）での K_d＝324.8nM、％エラー＝1.44％が得られた。発表では 24℃以外での温度で算出した K_dも報告する。

K_d、hybridization、flow type fluoresce accumulation assay

講演番号：3C34p03
講演日時、会場：3月24日14:11～ C校舎34会場

タイトル　DNA核酸の結合定数の測定
Title　　measurement of binding constant of DNA
○渡部　翔、斎木　博[1]、鈴木　義規[1]（工科大院・バイオ、[1]工科大・応用）
○Sho Watanabe, Hirosi Saiki[1], Yoshinori Suzuki[1] (Tokyo Univ. Technol. Grad. School, [1]Tokyo Univ. Technol)

【目的】近年、遺伝子組み換え食品やヒトゲノム解析等といった遺伝子操作による研究の重要性が高まり、遺伝子（DNA）についての様々な実験が行われている。現在までに、オリゴマーのような長い塩基数での DNA 核酸の結合定数は調べられてきたが、1 塩基や 2 塩基のような短い塩基数での DNA 核酸では測定されて来なかった。

1 塩基の遺伝子の結合定数はクロロホルム中にて測定されている。グアニン（G）とシトシン（C）間の結合定数が 10^4～10^5 であり、また、アデニン（A）とウラシル（U）間の結合定数は 10^2 である。しかし、水溶液中での結合定数は求められていない。

そこで、高感度に物質と物質を結合させることで結合定数を測定することのできる、KinExA3000(flow type fluoresce accumulation assay)を用いて、アデニンとチミン(T)間、シトシンとグアニン間の結合定数の測定を行なった。本研究については、塩基数を 1 塩基、2 塩基、3 塩基と増やした場合、結合定数がどのように変化するのかを調べることを目的とした。

【測定原理】6-fam 蛍光ラベル化シトシンが一定濃度量入れてある溶液に、グアニンの濃度を段階的に変えた溶液を混合し、グアニンの濃度の濃いサンプル～薄いサンプルを作製する。グアニンに固定化したビーズを KinExA 内に溜め、調整したサンプルをそれぞれ流し込む。グアニンの濃度が低いサンプルは、ビーズに捕捉されるラベル化シトシンの量が増える。逆に、グアニンの濃度が濃いサンプルは、ビーズに捕捉されるラベル化シトシンの量が減る。そこに励起光を当てると 6-fam が蛍光を発する。その蛍光の強さから、縦軸に電圧(V)、横軸にグアニンの濃度(M)をプロットすると K_d(解離定数)カーブを作成することができ、そこから K_dを求めることができる(解離定数の逆数は結合定数)。

【方法】Epoxy-activated Sepharose™　6B（ビーズ）とグアニンを一晩室温で攪拌させ、グアニンをビーズに固定化した。固定化の確認を FT-IR（フーリエ変換赤外分光法）を用いて行った。KinExA 内の測定部位であるガラスセルに、合成したビーズを充填し、そこに、一定濃度の 6-fam シトシンと段階的に濃度希釈したグアニン含む液体を流し、そのサンプル内の遊離のラベル化シトシンとビーズ固定化グアニンをハイブリダイゼーションさせた。サンプルの蛍光強度による電位差を測定し、これをグアニン濃度に対してプロットし、K_dカーブを作成した。

【結果】グアニンを固定化したビーズを FT-IR で測定した結果、1670cm^{-1} でグアニン特有の波数を確認することができ、グアニンの固定化できた事がわかった。しかし、KinExA を用いた測定では 1 塩基レベルでグアニンとシトシンの結合を見ることができなかった。2 塩基レベルでは GG-CC の結合が確認でき、K_d測定に最適な 6-famCC 濃度は 50nM であった。また、アデニン、チミン間でも同様の実験を行なう予定である。発表ではそれぞれの K_dの値も発表する。

dna, binding constant, flow type fluorescence accumulation assay

講演番号：3C34p04
講演日時、会場：3月24日14:22～ C校舎34会場

メタミドホス結合ＤＮＡアプタマー取得の試み

In vitro selection of DNA aptamers binding methamidophos

○皆川 宏貴、秋冨 穣、古市 真木雄、和賀 巌（ＮＥＣソフト・ＶＴＣ）
○Hirotaka Minagawa, Joe Akitomi, Makio Furuichi, Iwao Waga (NEC Soft, Ltd.)

【目的】食品関連分野においては、残留農薬等の簡便な検出が重要な課題の一つとなっている。我々はアプタマーを用いた低分子化合物の検出技術の開発を行っており、有機リン系殺虫剤であるメタミドホスに結合するＤＮＡアプタマーの取得を試みた。
【方法と結果】リンカーを介してビオチン化したメタミドホスを標的分子としてストレプトアビジン固定化磁気ビーズに結合させ、ランダムＤＮＡプールを用いたＳＥＬＥＸ法（Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment）によりメタミドホス結合ＤＮＡのセレクションを行った。１０ラウンドのセレクションを行った結果、ビオチン化メタミドホス固定化磁気ビーズを用いたビーズアッセイおよび表面プラズモン共鳴(SPR)測定によりメタミドホスに結合すると思われるＤＮＡプールが取得できた。

aptamer, methamidophos, SELEX

講演番号：3C34p05
講演日時、会場：3月24日14:33～ C校舎34会場

リステリア・モノサイトゲネスに結合するＤＮＡアプタマーの取得と評価

Selection and characterization of DNA aptamers against *Listeria monocytogenes*

清水 かおり、○堀井 克紀、森下 直樹[1]、秋富 穣、古市 真木雄、松本 貴之[1]、和賀 巌（ＮＥＣソフト（株）、[1]日本ハム（株））

Kaori Shimizu, ○Katsunori Horii, Naoki Morishita[1], Joe Akitomi, Makio Furuichi, Takashi Matsumoto, Iwao Waga (NEC Soft, Ltd., [1]Nippon Meat Packers, Inc.)

【目的】リステリア菌は、土壌や河川など自然界に広く分布し８菌種に分類される。その中でモノサイトゲネス（*Ｌ．ｍｏｎｏ*）はヒトに対する病原性があり、稀に髄膜炎や敗血症の疾病を惹起する。*Ｌ．ｍｏｎｏ*は食品を介してヒトに感染し、特に欧米で集団食中毒事例が多数報告されている。最近では、*Ｌ．ｍｏｎｏ*に汚染されたメロンによる食中毒がアメリカのコロラドで発生し１５人の死者がでた。低温でも生育可能であり、冷蔵庫内などでも菌が増殖するため、公衆衛生上大きな問題となっている。我々は、この食中毒の原因菌である*Ｌ．ｍｏｎｏ*を簡易検査できるキットを開発するため、*Ｌ．ｍｏｎｏ*に結合するＤＮＡアプタマーの取得を行った。

【方法】*Ｌ．ｍｏｎｏ*の侵入関連表面蛋白質であるｐ６０は、リステリア属に共通して発現する膜蛋白質であるが、種間でアミノ酸配列が大きく異なるドメインが存在する。そこで、大腸菌で発現させた組換え体ｐ６０を磁気ビーズに固相化し、ＤＮＡアプタマーを取得するための標的分子とした。Ｎ３０のランダム配列をもつＤＮＡプールを合成で調製し、ＳＥＬＥＸ法でアプタマーをセレクションした。磁気ビーズそのものや*Ｌ．ｍｏｎｏ*以外のリステリア菌に結合するＤＮＡ分子を排除するため、セレクションの過程で、何も固相化していない磁気ビーズや非病原性リステリア菌の混合物を用いたネガティブセレクションも行った。

【結果】セレクションの一連の作業工程を１０回繰り返したところ、ｐ６０に結合するＤＮＡ分子（ＤＮＡアプタマー）が複数種濃縮された。これらの配列はいずれもＧリッチであり、結合するにはカリウムイオンが必須であったことから、Ｇカルテット構造を形成しｐ６０に結合していることが予想された。菌体とＤＮＡ分子の相互作用を調べるため、熱処理した*Ｌ．ｍｏｎｏ*をプレートに固相化し、それにビオチン修飾した各ＤＮＡ分子を加え、ＳＡ－ＨＲＰを用いて検出した。その結果、小型化したＤＮＡ分子も含め９種類が*Ｌ．ｍｏｎｏ*の死菌に結合した。最も良く結合したＤＮＡ分子について、生菌でも結合を調べたところ、死菌と同程度の結合がみられた。しかしながら、*Ｌ．ｍｏｎｏ*以外のすべてのリステリア菌にも結合することもわかり、ネガティブセレクションが完全に機能していないことが明らかになった。現在、ネガティブセレクションの方法を改良するとともに、標的分子も再考してＤＮＡアプタマーを取得している。

aptamer, Listeria monocytogenes, SELEX

講演番号:3C34p06
講演日時、会場:3月24日14:44～ C校舎34会場

タイトル グアイアコールを産生する*Alicyclobacillus* 属細菌の迅速検査
Title Rapid discrimination of guaiacol producing *Alicyclobacillus* sp.
○石原 武雄、高澄 耕次、大嶋 利幸、執行 達朗（サッポロビール価値創造フロンティア研究所）
○ Takeo Ishihara, Koji Takazumi, Toshiyuki Ohshima, Tatsurou Shigyou(Frontier Laboratories of Value Creation, SAPPORO BREWERIES LTD.)

【目的】*Alicyclobacillus* 属細菌は、好気的に高温・酸性下で増殖する芽胞形成細菌であり、土壌等から分離されている。*Alicyclobacillus* 属菌が果汁飲料等に混入した場合、製造工程で加熱殺菌が行われていたとしても、菌の耐熱性胞子が生存し、製品中で発芽・増殖して変敗事故を引き起こす可能性がある。*Alicyclobacillus* 属菌の中でも*A. acidoterrestris* (AAT)は果汁やペクチン等からの分離例が多く、増殖の際にグアイアコールを産生するため、特に品質上のリスクが高いと考えられている。このため、サッポログループでは㈱栄研化学と共同でAAT を対象としたLAMP法検出法を確立し[1)]、清涼飲料の原料検査等に利用している。

グアイアコールを産生する*Alicyclobacillus* 属として、AAT以外にも*A. acidiphilus* や*A. herbarius*、一部の*A. hesperidum* が報告されている。果汁等からの分離例は少ないもののこれらの菌種も清涼飲料中に混入した場合、異臭トラブルを発生する可能性があると考えられた。そこで、今回新たにAAT以外のグアイアコールを産生する*Alicyclobacillus* 属細菌を対象としたLAMP法による迅速検査法の開発、検討を行った。

【方法】*Alicylobacillus* 属細菌の16S及び23S rRNA遺伝子配列を比較し、グアイアコールを産生する*A. hesperidum* や*A. acidiphilus*、*A. herbarius* に特異的な配列を検索し、LAMP法のプライマーを設計した。

【結果】設計した*A. acidiphilus* 用のLAMP法は64℃ の等温条件下において、*A. acidiphilus* (NBRC100859) 300CFU/testに対し60 分以内に増幅反応を示し、*A. herbarius* 用のLAMP法は63℃の等温条件下において、*A. herbarius* (NBRC100860) 600CFU/testに対し60 分以内に迅速な増幅反応を示した。

一方、グアイアコールを産生する*A. hesperidum* 検出用LAMP法は、63℃の等温条件下において反応時間60 分で増幅を判定するには、*A. hesperidum* (DSM11985) 50,000CFU/testを要した。他のLAMP法と比較し増幅感度が劣っていたが、培地上に形成したコロニーの同定には十分な感度を有していると考えられた。

また、各々のLAMP法は85分以降に標的としていない一部の*Alicyclobacillus* 属細菌に対して交差性が認められたが、反応時間を80分とすることで実用上問題ないと判断した。

現在使用中のAAT検査用LAMP法に加えて、今回設計した3種類のLAMP法を活用することで、グアイアコールを産生する*Alicyclobacillus* 属細菌を漏れなく迅速かつ簡易に検出できると考えられた。

1) 島袋 千恵子, 他 : 日本農芸化学会2004 年度大会発表抄録集 (2004)

Alicyclobacillus sp., LAMP method, guaiacol

講演番号：3C34p07
講演日時、会場：3月24日15:05～ C校舎34会場

タイトル　未知遺伝子組換え作物の同定を目的とした塩基配列解析手法の検討

Title The strategy for nucleotide sequence analysis to identify unknown genetically modified crops

○真野 潤一、原田 美央子、布藤 聡[1]、近藤　一成[2]、穐山 浩[2]、手島 玲子[2]、高畠 令王奈、古井 聡、橘田 和美（農研機構・食総研、[1]ファスマック、[2]国立医薬品食品衛生研）

○Junichi Mano, Mioko Harada, Satoshi Futo[1], Kazunari Kondo, Hiroshi Akiyama, Reiko Teshima, Satoshi Furui, Reona Takabatake, Kazumi Kitta (National Food Research Institute NARO, [1]FASMAC, [2]National Institute of Health Sciences)

【目的】現在、我が国では安全性が未承認の遺伝子組換え(GM)作物の流通は認められておらず、混入の可能性が生じた未承認GM作物については行政機関等による検査が実施されている。しかし、組換えDNAの詳細な情報が明らかとならない限り検査体制の構築が図れない現状においては、未承認GM作物が国内で流通する可能性が残されており、食品の回収など社会的混乱を招く恐れもある。このため、本研究グループでは、未承認GM作物の混入を未然に防止することを目的として、組換えDNA情報が未知のものを含め未承認GM作物を見出す技術について研究を行っている。これまでに、プロモーター領域やターミネーター領域等、GM作物の作出に頻用されるDNA領域を一斉検知することで未知の組換え体の混入を推定する手法について報告を行っている（Mano *et al. J. Agric. Food Chem.* (2009) 57, 1, 26-37.)。本研究では、既知プロモーターやターミネーター領域の検出により未承認GM作物の混入が推定された際に、その領域を起点に組換えDNA全体の塩基配列を解析し、当該GM作物を同定する手法について検討を行った。特に、未承認GM作物の混入は低混入率で生じる可能性も高いため、低濃度試料にも適用可能な手法の選定を試みた。

【方法】既知DNA領域に隣接する未知DNA領域の塩基配列を解析する技術としてInverse PCR法、Randomly primed PCR (RP-PCR)法、Ligation Mediated Suppression PCR (LMS-PCR)法の3法を選定した。承認GMトウモロコシ及び非組換え体（Non-GM）試料からそれぞれゲノムDNAを抽出し、GM由来DNAを100%、10%及び1%の割合で混合した擬似混入試料を調製した。上記の3法をこれらの擬似混入試料に適用し、未知DNA領域の塩基配列解析が可能な混入率について調査を行った。

【結果】Inverse PCR法、RP-PCR法は、それぞれGM混入率100%、10%の混入試料まで未知DNA領域の塩基配列解析が可能であった。特にRP-PCR法では、プライマーの選択が検出感度に影響を及ぼすことが確認された。一方、LMS-PCR法では、GM混入率1%のDNA試料まで塩基配列解析が可能であり、3法の中で最も高感度な手法であることが示唆された。

Genetically modified organism, PCR, Detection

講演番号：3C34p08
講演日時、会場：3月24日15:16～ C校舎34会場

GM大豆使用納豆の超高感度遺伝子検査法の開発

Development of ultra-sensitive detection method for GM soybean of Natto

奥村 史朗、○執行 修司[1]、冨岡 寛治[1]（福岡県工技セ、[1]久留米工業高等専門学校）
Shiro Okumura, ○Shuji Shigyo[1] 、Kanji Tomioka (Fukuoka ITC, [1] KurumeNCT)

【目的】JAS公定法による遺伝子組換え判定は、原料遺伝子の組換え部分をPCR法によって増幅して判定するが、発酵食品である納豆においては判定できない場合が多いと報告されている。遺伝子組換え判定が困難になる原因として、納豆からのDNA抽出時に混入する納豆菌由来DNAによる阻害、加工する過程での加熱操作によるGM大豆DNAの損傷・分解、が考えられている。本研究の目的は、納豆菌由来DNAが多量に混入しGM大豆DNA濃度が薄い試料からでもGM大豆DNAのみを超高感度に検出できる遺伝子組換え検査法の開発である。本報では納豆菌由来DNAの混入が組換え判定に及ぼす影響と、特異的抽出法によるターゲット遺伝子の精製について報告する。
【方法】本研究では除草剤耐性のGM大豆を対象とし、その組換え判定には、大豆レクチンをコードする内在性遺伝子（Le1）と組換え領域のターミネーター部分（Nos-ter）を増幅するプライマーを用いた。テンプレートはLe1とNos-ter領域の両方を持つプラスミド（ポジコン）を、酵素はTakara EX Taqを使用し、94℃×1min、(95℃×30sec, 60℃×30sec, 72℃×30sec)×40cycles、72℃×7minの温度サイクルでPCR反応を行った。反応物は20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動（定電流15mA、1ｈ）で解析した。納豆菌由来DNAによるPCR反応の阻害は、テンプレートに納豆菌由来DNAを、段階的に濃度を変えて添加してPCRを行うことで検討した。また同じ条件でリアルタイムPCRを用いた解析についても行った。特異的抽出は、ターゲット遺伝子とハイブリダイズする塩基配列をプローブとし、末端にビオチンを付加して、アビジンビーズ（invitrogen社製DynabeadsRM270_streptavidin）に固定化したものを用いて行った。そして、ターゲットとするDNA断片と共存させると、ターゲットDNAとプローブとの結合力を増強する効果を持つハイブリダイズ強化ブロッカー（HEB、ターゲット領域上流・下流の数十bpの相補鎖）をプローブ付ビーズと組み合わせることにより組換え遺伝子を精製・濃縮した。それを確認するために、FITC修飾したターゲット遺伝子を作製し、フローサイトメトリーを用いて検討した。
【結果】納豆菌由来DNAを添加して、PCRによるターゲット遺伝子の検出を行ったところ、Le1においてもNos-terにおいても、その濃度が薄い状態では検出されていたバンドが、原液（18.6ng/μL）を加えたサンプルでは検出されなかった。これより納豆菌由来DNAが、ある一定濃度以上で存在していると、PCRによる遺伝子判定が阻害されることがわかった。この阻害についてはリアルタイムPCRにおいても同様の結果が得られ、納豆菌由来DNA濃度が濃いほどターゲット遺伝子の増幅が遅れる事がわかった。アビジンビーズで精製・濃縮を行った結果、Le1では目的遺伝子が一本鎖の場合には検出することができて、二本鎖ではできなかったが、Nos-terではどちらの場合でも検出できた。今後は、Le1の二本鎖での検出、ビーズから回収してPCRを行う条件、納豆菌由来DNA混入状態からの特異的抽出法による検出について検討する。

Natto, GM-soybean, PCR-detection

講演番号：3C34p09
講演日時、会場：3月24日15:27～ C校舎34会場

タイトル
zincフィンガーヌクレアーゼによるニワトリ胚体細胞における遺伝子 ターゲティングの試み
Title
An attempt of gene targeting in somatic cells of chick embryos with zinc finger nuclease

○石川 幸親、荒木 功人（岩手大・工・応化生命）
○Yukichika Ishikawa, Isato Araki (Dept Chem & Bioeng, Fac Eng, Iwate Univ)

【目的】以前は多細胞生物で特定の遺伝子を狙って破壊する遺伝子ター ゲティング技術は、マウスなど一部のモデル生物に限られていたが、近年の標的配列を狙って切断できる人工的なzincフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)やTALEヌクレアーゼの開発により、遺伝子 ターゲティングが可能な多細胞生物の範囲が拡大しつつある。本研究では、基礎研究におけるモデル動物として、あるいは畜産業、ワクチン産生において重要な家禽であるニワトリの体細胞において、ZFNを用いた遺伝子ターゲティングを試みた。
【方法】標的遺伝子として転写因子Engrailed2(En2)を選択した。5’-GNN-3’を認識する特異性が高いzincフィンガーが知られているので、En2のコード領域で5’-NNC NNC NNC NNN NNN GNN GNN GNN-3’配列を探索し、そのうち最もN末端に近い第 ８／９アミノ酸を中心とする配列5’-GGC CGC AGC CCC CGG GAG GAG GCG-3’を標的として選択した。Segalら(1999)やLiuら(2002)のデータに基づき、5’-GAG GAG GCG-3’および5’-GCT GCG GCC-3’を認識するzincフィンガー、ZFN1(En2)およびZFN2(En2)を作製した。また、Szczepekら(2007)によるとFokIヌクレアーゼド メイン中のD483をRに、R487をDに置換すると、ZFNホモ二量体の形成が抑制され、非特異的なDNA切断 が低下することが示されている。そこで、このような置換を導入したFokIヌクレアーゼドメインFokI(DD)およびFok(RR)を作製した。そして、核局在シグナルのC末端側にZFN1またはZFN2を、さらにC末端側にFokI(DD)またはFokI(RR)を持つZFN cDNAを作製し、これを発現ベクターpT2K-CAG- MCSに組込んだ。
【結果】作製したZFN発現コンストラクトをエレクトロポレーションによりEn2が発現している発生中のニワトリ胚中脳後脳領域に導入後、その効果を抗En2モノクローナル抗体4D9やEn2遺伝子DNAのシーケンシングにより評価中である。

chick embryos, electroporation, Engrailed2

講演番号：3C34p10
講演日時、会場：3月24日15:38～ C校舎34会場

バイオナノカプセルを用いた抗体整列化技術によるバイオセンサーの高感度化

Improvement of biosensors by using bio-nanocapsules as a scaffold of oriented immobilization of antibodies

○飯嶋　益巳、山本　実加子、黒田　俊一（名大院・生命農）
○Masumi Iijima, Mikako Yamamoto, Shun'ichi Kuroda (Grad. Sch. Biol. Agrc. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】

バイオセンサーの検出感度やリガンド特異性を高めるためには、センサー表面の検出用生体分子の方向性をナノレベルで制御する技術が必要である。我々は、B型肝炎ウイルス表面抗原Lタンパク質のPre-S領域の一部(51-159残基)を、Protein A由来IgG-Fc結合領域の二量体(ZZドメイン)に置換し、出芽酵母で発現して得た、約120分子のZZドメインを放射状に提示する直径約30 nmのバイオナノカプセル(ZZ-BNC)を用いて、各種バイオセンサーの高感度化を目指した。

【方法】

水晶発振子微量天秤法(QCM)および表面プラズモン共鳴法(SPR)のセンサー基板の表面に、未処理、Protein A処理、クロスリンカーで固定したProtein A処理、ZZ-BNC処理を行い、検出用抗体を固定化し、各イムノセンサーにおける抗原の検出感度及び結合能を検討した。さらに、抗体-ZZ-BNC複合体を用いて、ELISAおよびウェスタンブロット法における固相化抗原の検出感度への影響を検討した。

【結果】

QCMのイムノセンサーおいて、ZZ-BNCを用いることにより、抗原の検出感度(128倍)および結合能(250倍)が著しく上昇した。また、SPRのイムノセンサーにおいても、ZZ-BNCを用いることにより抗原結合親和力が著しく上昇したことから、ZZ-BNCを「足場」として抗体を固定化するだけで、従来型イムノセンサーの高感度化、高効率化を達成できることを見出した(飯嶋ら、*Biomaterials* 2011;32:1455–1464)。そこで、高速原子間力顕微鏡(Fast-scanning AFM)を用いて、一般的なバイオセンサー基板である金表面にZZ-BNCを固定し、その粒子上におけるmouse IgG3分子の動きを観察した結果、ZZ-BNC上を抗体のFc部分が固定されて、直径約26 nmの範囲でランダムに回転することを見出した(飯嶋ら、*in prep*)。また、ELISAおよびウェスタンブロット法の固相化抗原検出系において、抗体-ZZ-BNC複合体を液相に添加することにより、検出感度が著しく上昇することを見出した(飯嶋ら、*Anal Biochem* 2010;396:257–261)。さらに、同一動物種由来・同一サブクラスの複数の一次抗体を、それぞれ蛍光標識ZZ-BNC複合体に固定すると、高感度に複数抗原の同時検出が可能になり、本法をバイオイメージングプローブ「*IRODORI*」と命名した（飯嶋ら、*Biomaterials* 2011;32:9011–9020）。以上から、ZZ-BNCは、バイオセンシング分野における検出用抗体のクラスター化および整列化の「足場」として有用なバイオマテリアルと考えられた。

Bio-nanocapsule, Immunosensor, Bioimaging

講演番号：3C34p11
講演日時、会場：3月24日15:49～ C校舎34会場

ゾルゲル光導波路を用いた有機リン化合物の検出

Detection of organophosphorus compounds using sol-gel waveguide

○谷屋早紀、土屋圭司、里村武範、中根 幸治[1]、黒田 浩一[2]、植田 充美[2]、Ashok Mulchandani[3]、榎波 康文[4]、末 信一朗（福井大院・工・生応化、[1]福井大院・工・材開工、[2]京大院・農・応用生命、[3]Univ. California, Riverside、[4]広島大・ナノデバイス研）

○Saki Taniya, Keiji Tsuchiya, Takenori Satomura, Koji Nakane, Kouichi Kuroda[1], Mitsuyoshi Ueda[1], Ashok Mulchandani[2], Yasufumi Enami[3], Shin-ichiro Suye (Univ. Fukui, [1]Kyoto Univ., [2]Univ. California, [3]Hiroshima Univ.)

【目的】我々の研究グループでは有機リン蛍光センシングシステムの構築を進めてきた。これまでに有機リン加水分解酵素(OPH)と蛍光タンパク質(EGFP)を酵母細胞表層上に発現した共発現酵母を構築し、パラオキソン存在下において細胞表層上に提示したEGFPの消光を確認した。本研究では、ケイ酸とジルコニウムで作製したゾルゲル溶液を用いて光導波路のコア部分に共発現酵母を固定化した共発現酵母ドープゾルゲル光導波路を作製し、パラオキソンの検出感度及び操作の簡便性の向上を目指した。

【方法】ゾルゲル光導波路を作製後、共発現酵母とゾルゲル溶液の混合液を光導波路のクラッド上に滴下し、UV照射にて硬化させ共発現酵母ドープゾルゲル光導波路を作製した。その後、光導波路上にパラオキソン溶液を添加し、EGFPの蛍光強度変化を分光器にて測定した。

【結果】ゾルゲル光導波路上にパラオキソン溶液を滴下した結果、EGFPの蛍光強度減少を定量的に観測することに成功した。また、1 mMのパラオキソン溶液を滴下した場合、蛍光強度は1分間で50%低下することがわかった。今後、同じ有機リン化合物であるサリン等のさらに毒性の強い有機リン化合物検出への応用を検討してく予定である。

cell surface engineering, organophosphorus hydrolase, optical waveguide

講演番号：3C34p12
講演日時、会場：3月24日16:10～ C校舎34会場

量子ドットナノプローブを用いた香辛料からのアミロイドβ凝集阻害成分の網羅的スクリーニング

Comprehensive screening of inhibitory components for amyloid-β aggregation in spices using quantum-dot nanoprobes

赤間 弘昌、上井 幸司、○徳楽 清孝（室工大工・応化）
Hiromasa Akama, Koji Uwai, ○Kiyotaka Tokuraku (Murokoudai)

【目的】アルツハイマー病の発症にはアミロイドβ（Aβ）の凝集と蓄積が関与しているため、Aβの凝集を阻害する物質はアルツハイマー病の予防薬や治療薬の候補として期待されている。最近我々は量子ドットナノプローブを用いて、Aβの凝集を蛍光顕微鏡下でリアルタイムイメージングする手法を確立し、この手法を応用したAβ凝集阻害物質のマイクロスクリーニングシステムを提案した（Tokuraku et al., *PLos One*, 2009)。本研究では実際にこの手法を用い、香辛料に含まれるAβ凝集阻害成分の網羅的スクリーニングを行った。
【方法】54種類の香辛料（ハーブを含む）を用意し、それぞれ1 gに対して5 mlのエタノールを加え、室温にて1週間放置した。それぞれのサンプルを濾過して残渣を取り除いた後、ろ液中のエタノールをロータリーエバポレーターによって除去したものを香辛料抽出物とした。量子ドットとAβを架橋したQDAβは最近の報告（Tokuraku et al., *PLos One*, 2009）に従って作成した。未標識のAβ（最終濃度30 μM)、QDAβ（最終濃度30 nM)、および様々な濃度の香辛料抽出物を加えたサンプル溶液を用意し、10,000 x g、2 min、4 ℃にて遠心分離することで不溶物を取り除いた。サンプル溶液を5 μlずつ1536ウェルプレートの各ウェルに入れ、プレート遠心機にてスピンダウンすることで液面をウェル底面に対して水平にし、また気泡を除去した。ウェルプレートの上部を粘着テープで密閉後、37 ℃のインキュベーター中で一晩Aβを凝集させた。それぞれのウェルを蛍光顕微鏡にて観察し、蛍光画像からそれぞれの香辛料抽出物の凝集阻害効果を見積もった。
【結果】今回スクリーニングした54種類の香辛料のうち、29種類のものは1 mg/mlの抽出物の添加でAβ凝集阻害活性が確認された。近年、植物に含まれるポリフェノール類がAβ凝集阻害効果を示すことが報告されているが、この結果は多くの香辛料に何らかのAβ凝集阻害効果を示す物質が含まれていることを示唆した。さらに100 μg/mlの抽出物濃度で8種類、10 μg/mlの抽出物濃度でも3種類の香辛料にAβ凝集阻害効果がみられ、香辛料の種類によってその効果が大きく異なることが明らかになった。以上の結果より、量子ドットナノプローブを用いた本スクリーニング法はAβ凝集阻害成分のスクリーニングに十分活用できることが証明された。現在、特に阻害活性の高かった香辛料について、どの成分が活性に寄与しているのか同定を試みている。

Amyloid, Spice, Inhibitor

講演番号：3C34p13
講演日時、会場：3月24日16:21～ C校舎34会場

超微小領域の熱応力のクリープによる微生物死滅温度の直観的計測法の開発―ナノサーチ技術 nanoTA の利用

Development of the intuitive measuring method of the microbe extinction temperature by the creep of the heat stress of nano-scale—Use of the nanoTA - Nanosearch Technolgy.

○中西　弘一、小暮　亮雅[1]、藤井　岳直[2]、粉川　良平[2]、出内　桂二（キリンビバレッジコア技術研、[1]島津総合分析試験センター、[2]島津製作所分析計測事業部）
○Koichi Nakanishi[1], Akinori Kogure[1], Takenao Fujii[2], Ryohei Kokawa[2] & Keiji Deuchi[1]
（Kirin Beverage Co.Ltd., [1]Shimadzu Analytical & Measuring Centre, Inc.,[2]Shimadzu Corp.）

【目的】飲料、食品並びに医薬品などの製造では、汚染危害微生物の耐熱性を評価することは微生物制御において非常に重要である。現在その方法は対象微生物の単離、培養、加熱処理操作及び生残率を求めることを行っている。そのため非常に手間と時間を要し、製造現場への対応も充分にできないことが多い。本研究は、全ての微生物に対して迅速かつ簡便な革新的な技術としての耐熱性評価方法として開発を行った。
【方法】装置としてナノサーチ顕微鏡SFT-3500（島津製作所）にナノサーマルアナリシス（nanoTA、日本サーマルコンサルティング）を取り付けた。ナノサーチ顕微鏡の走査型プローブ顕微鏡（SPM）に超微小領域局所加熱型カンチレバーを装備させ、1個の微生物細胞に一定応力下、一定速度で100～400℃まで昇温を行なった。昇温加熱により発生する細胞の膨張や形状変化は熱応力のクリープであり、これから生じる微生物のZ 軸方向のひずみ距離の増加状態をモニターした。微生物の加熱死滅温度は、加熱による物性変化が生じるひずみ距離の増加状態の変曲点の温度であると定義した。評価対象微生物には、芽胞形成細菌として*Bacilus*属の芽胞、好熱性偏性嫌気性細菌*Thermoanaerobacter*属、*Moorella*属の芽胞、耐熱性カビの子嚢胞子、細菌の栄養細胞、酵母を選び評価を行った。
【結果】１．ひずみ距離の増加状態が変化する変曲点の温度は、加熱による微生物細胞の物性変化が発生する温度であり、これを微生物の加熱死滅温度と考えることにより、ほとんどの微生物の耐熱性を迅速に評価することが可能になった。
２．この加熱死滅温度は、微生物の従来のＤ値とＺ値などから理論的に推定したＤ値の温度と近似した。また、昇温速度を変えるとひずみの変化状態が変化する変曲点温度も変化し、単位時間当たりの死滅温度も変化した。各死滅温度とこれに対する時間の関係を利用してＤ値を推定することも可能と考えられた。

extinction temperature, SPM, nano-thermal analysis

講演番号：3C34p14
講演日時、会場：3月24日16:32～ C校舎34会場

Zeocin耐性遺伝子を用いた遺伝子スイッチの進化工学

Directed evolution of genetic switches using non-catalytic positive selectors

○池 紘平、福冨 浩樹、田代 洋平、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
○Kohei Ike, Hiroki Fukutomi, Yohei Tashiro, Kyoichi Saito, Daisuke Umeno
(Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.)

【目的】遺伝子発現の制御システム（遺伝子スイッチ）は，タンパク質の生物生産や代謝工学，合成生物学における基本ツールとして広く使われている。この遺伝子スイッチの誘導時における発現効率は，より精緻な遺伝子発現システムを構築する上で特に重要視されるチューニングポイントの１つである。一般に遺伝子スイッチの機能は，ネガティブ選択マーカーとポジティブ選択マーカーとを併用して進化工学的に改良することが可能であるが，誘導時の発現効率の改良に関しては一工夫必要である。従来の手法では，誘導条件におけるポジティブ選択において，発現効率がある閾値を超えれば宿主細胞が生き残る「足切り的」な選択法を用いるため，最低限の発現さえあれば，その発現効率の大小を問わず平等に選抜されてしまうのが常であった。そこで本研究では，誘導時の発現効率が高いものほど優先的に選抜される新たな遺伝子スイッチ選択法を開発した。

【方法・結果】我々は，抗生物質Zeocinに対する耐性タンパク質（BRP）の作用機構に着目した。この機構では，BRPがZeocinと1:1に結合することで，Zeocinの作用（鉄イオン依存的なDNA切断）から宿主細胞を守る。この耐性機構は化学量論的な反応であるため，細胞の生存率はBRPの発現効率に応じたものとなることが期待される。

まず，BRPをコードする遺伝子(Sh *ble*)をアシル化ホモセリンラクトン(AHL)によって誘導する遺伝子スイッチ：LuxR/P*lux*システムの制御下に配置した。AHL濃度を変えながら，Zeocinを作用させたところ，AHL濃度が高いほど（つまりはSh *ble*の発現効率が高いほど）宿主の生存率は高くなった。また，Zeocin濃度，あるいはZeocinとの接触時間を変えることによって，誘導時の発現効率に応じた生存率の序列を維持しつつ，選択圧を任意に調節できることが分かった。

この選択手法を用いて，LuxRの進化工学をおこなった。まず，変異PCRにより*lux*R遺伝子の全域にランダム変異を導入してライブラリ化し，上記と同様にそのライブラリの制御下にSh *ble*を配置した。AHL存在下，種々のZeocinの濃度でポジティブ選択を行った。その結果，野生型よりも高い誘導効率を示すLuxR変異体を数多く取得できた。本講演では，これらのLuxR変異体の遺伝型とスイッチ特性，誘導効率をあげるアミノ酸変異の作用機序についての研究結果も報告する。

genetic circuit, quorum sensing, synthetic biology

講演番号：3C34p15
講演日時、会場：3月24日16:43～ C校舎34会場

高効率なDNAクローニング法

Highly efficient DNA cloning method

後藤 健太、○永野 幸生（佐賀大）
Kenta Goto, ○Yukio Nagano (Saga Univ.)

DNA断片のプラスミドDNAへのクローニング法（DNAクローニング法）は生命科学の基盤となる研究手法である。DNAクローニング法は多くの研究室で日常的に行われているけれども、必ずしも効率が高い方法とは言えない。そこで、極めて高効率なDNAクローニング法を開発した。

酵母細胞を用いた*in vivo* DNAクローニング法は、非常に高効率であることが知られている。目的のDNA断片の両端にプラスミドDNAと相同な20 bp以上のDNA配列をPCR法で付加する。次に、このDNA断片を、二ヶ所の相同配列の間を切断することにより直鎖状にしたプラスミドDNAと共に、酵母細胞に形質転換する。すると、酵母細胞の高い相同組換え能力によって相同なDNA配列同士が連結し、目的DNA断片がプラスミドDNAへクローニングされる。しかし、日常的に使われている多くのプラスミドDNAは酵母細胞内複製開始点をもっていないため、この方法を適用することはできない。

まず、多くのプラスミドDNAがAmp^r配列をもつことを活用して、これらプラスミドDNAに酵母細胞内複製開始点をもたせることが可能な変換カセットを構築した。この変換カセットは直鎖状のDNA断片で、順にAmp^rのコード配列、酵母細胞内複製開始点、酵母選択マーカー、およびAmp^rのターミネーターから構成されている。

次に、この変換カセットを、目的のDNA断片および直鎖状プラスミドDNAと共に、酵母細胞に形質転換する。すると、酵母細胞の高い相同組換え能力によって相同なDNA配列同士が連結し、目的DNA断片がプラスミドDNAへクローニングされる。これと同時に、相同なDNA配列同士が組換わることで、プラスミドDNAのAmp^rのコード配列とAmp^rのターミネーターの間に、酵母細胞内複製開始点と酵母選択マーカーが挿入される。なお、目的のDNA、酵母細胞内複製開始点、および酵母選択マーカーが挿入されたプラスミドDNA（目的産物）以外に、非相同末端結合により環状化した変換カセットを酵母細胞は保持できる。目的DNA断片そのもの、プラスミドDNAそのもの、および目的DNA断片がプラスミドDNAへクローニングされただけのものを、酵母細胞は保持できない。

最後に、酵母細胞から回収したプラスミドDNAを大腸菌に形質転換する。ここで、目的のDNA、酵母細胞内複製開始点、および酵母選択マーカーが挿入されたプラスミドDNAを大腸菌細胞は保持できる。一方、非相同末端結合により環状化した変換カセットを大腸菌細胞は保持できない。

この原理により、極めて高効率なDNAクローニング法を開発することができたので、具体的な実験結果を本発表で報告する。

DNA cloning, *E. coli*, Yeast

講演番号：3C34p16
講演日時、会場：3月24日16:54～ C校舎34会場

タイトル ヌクレオシドキナーゼを用いた微生物ゲノムの連続改変

Title High-throughput modification of bacterial genome using a nucleoside kinase as a selection marker

○冨永 将大、田代 洋平、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）

○Masahiro Tominaga,Yohei Tashiro, Kyoichi Saito, Daisuke Umeno （Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.）

［目的］ バイオ燃料や医薬品などの生物生産性を高めるために，微生物ゲノムを繰り返しかつ大規模に改変する必要性が高まっている。微生物ゲノムの改変は，相同組換えという頻度の低い機構を利用するため，ゲノムが改変された細胞（組換え体）を，大多数を占める非組換え体から効率よく単離する手法が不可欠である。通常，組換え体は：（１）「選択カセット」をゲノムの標的部位に導入し，選択カセットにコードされた薬剤耐性遺伝子の機能を用いて，標的部位が選択カセットに置換された株を単離し（ポジティブ選択），（２）次に，この選択カセットを最終的に導入したい配列と置換し，未置換のものを同じく選択カセットにコードされた薬剤感受性遺伝子の機能によって排除する（ネガティブ選択）方法で得られる。既法では，細胞増殖中に，選択カセット内の薬剤感受性遺伝子が変異によって失活した細胞が濃縮され，2段階目の操作で必要な薬剤感受性遺伝子が失活しやすいという問題があった。そのため，1段階目と2段階目の操作間で，正しく機能する選択カセットを持つ組換え体を寒天培地上で単離する操作が必要であった。

［方法と結果］ 本研究では，薬剤感受性遺伝子としてヒトヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ（HSV*tk*）遺伝子を利用したネガティブ選択法（Tashiro *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **39**, e12(2010)）に注目した。HSVTKは，6-(β-D-2-deoxyribofuranosyl)-3,4-dihydro-8H-pyrimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-one（dP）という変異原性ヌクレオシドの存在下でのみ，細胞に対して致死性を示す。HSVTKの発現自体は細胞毒性を示さないことから，ネガティブ選択前にHSV*tk*遺伝子に遺伝子変異が顕著に蓄積することはないものと期待される。まず，HSV*tk*遺伝子とクロラムフェニコール耐性遺伝子(*cat*遺伝子)からなるHSV*tk-cat*カセットを作製し，相同組換えを利用して大腸菌の*lacZ*部位に導入した。クロラムフェニコールを含む液体培地で培養したところ，細胞のほぼ100%がdP感受性を有しており，それぞれのゲノム上にHSV*tk-cat*カセットが確認できた。そこで，これら組換え体を寒天培地上に単離せずそのまま2段階目の組換え操作を行った。すなわち，HSV*tk-cat*カセットの導入部位に，相同組換えによって*gfp*遺伝子などを導入した。形質転換物を，dP含有培地で培養したところ，最大54%が目的の配列をもつ組換え体であった。操作の全工程を液体操作のみで行う本手法は，微生物ゲノム編集のハイスループット化と自動化に大いに貢献すると期待される。本講演では，本手法を用いて試みた，並列／多段階な遺伝子組換え実験の結果についても紹介する。

Keyword1 genome engineering, Keyword2 selection marker, Keyword3 thymidine kinase

講演番号:3C34p17
講演日時、会場:3月24日17:15～ C校舎34会場

組換え大腸菌の長期保存技術の評価

Evaluation of long term preservation technology of recombinant *Echerichia coli*

大久保将人、久次米夕佳里、岸川昭太郎、中出浩司、○村田武英、小幡裕一（理研・BRC・遺伝子材料開発室）

Masato Ohkubo, Yukari Kujime, Shotaro Kishikawa, Koji Nakade, ○Takehide Murata, Yuichi Obata (Gene Engineering Division, RIKEN BRC)

遺伝子組換え技術により構築されたプラスミドやバクテリア人工染色体（BAC）は、通常、組換え大腸菌として－80℃で保存される。 －80℃フリーザーはそれ自身が高消費電力である上、冷房設備を必要とし、停電時には貴重な試料を失う危険性を常に含んでいる。 一方、液体窒素を用いて1バイアルずつ冷凍保存することにより電力コストを抑えることは可能であるが、ナショナルプロジェクトで作出される多検体の組換え大腸菌を一度に保存するには適していない。

我々は、省電力化と保存スペースの集約化のために組換え大腸菌の3種類の保存方法を検討している。 本保存技術は大震災から貴重な生物遺伝資源を安全に保管する観点からも重要である。(1) 384穴プレートの密封方法を開発し、その性能を評価したところ、液体窒素気相下でも密閉性を失うことがなく、ウェル間のコンタミネーションを防ぐことが確認できた。 液体窒素気相下に93 日間保存した組換え大腸菌の生存率は、94%であった。 (2) 添加剤としてグリセロールを加え、－30℃で凍結保存した組換え大腸菌の生存率を計測したところ、120 日後では76%、273 日後でも57%であった。 (3) スクリューキャップで密栓した2 mlプラスチックバイアルのアガースタブ中に保存した組換え大腸菌の生存菌数をフローサイトメーター法で測定したところ、4℃冷蔵で30 日間では86%、472 日後でも57%の菌体が生存していることが明らかとなった。 これらの保存技術のうち (1) と (2) は、ゲノムネットワークプロジェクト（文部科学省）ヒトcDNAクローン並びに理研BRCで樹立したC57BL/6N（B6N）マウスBACクローンの保存に応用している。

本開発研究は文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）基盤技術整備プログラム（平成19年～平成21年）として実施した。

recombinant E.coli, bioresource, preservation

講演番号:3C34p18
講演日時、会場:3月24日17:26～ C校舎34会場

自然界の海藻類に由来する生体分子複雑系の異種計測データマイニング

Data mining across heterogeneous measurements for biochemical complexities from diverse seaweeds

○伊達 康博[1,2]、坂田 研二[2]、伊藤 研悟[2]、菊地 淳[1,2,3,4]（[1]理研PSC，[2]横市院生命，[3]名大院生命農，[4]理研BMEP）

○Yasuhiro Date[1,2], Kenji Sakata[2], Kengo Ito[2], Jun Kikuchi[1,2,3,4]（[1]RIKEN PSC, [2]Grad. Sch. NanoBioSci. Yokohama City Univ., [3]Grad. Sch. Biol. Agri. Sci., Nagoya Univ., [4]RIKEN BMEP）

【目的】日本は世界第6位の海域面積を有し、国土の周囲を多種多様な海産資源に囲まれており有用資源の宝庫である。とりわけ、沿岸域には多様性豊かな海藻類が繁茂し、生態系を支える「ゆりかご」として重要な役割を担っているのみならず、海藻類自身に含まれるアルギン酸やフコイダンなどの海藻類バイオマスは、そのごく一部の構成成分から工業製品や医薬品等、産業界において幅広く利用されており工業的価値は極めて高い。しかしながら地球環境に多様に存在する海藻類バイオマスは、その効能について評価されていないものも多数存在し、手つかずのまま取り残されているのが現状である。このような「未利用資源の宝庫」から埋もれた情報を発掘（データマイニング）するためには、理解が十分とは言えない生体分子複雑系を、複雑系のまま網羅的に解析し、有益な情報をマイニングすることが重要であり、こういった従来の要素還元的な手法によらない網羅的解析技術の開発は、バイオイノベーションに通じる基幹技術として大いに期待できる。そこで本研究では、海藻類バイオマス資源発掘に向けた新規異種計測データマイニング法について報告する。

【方法】自然界の天然海藻サンプルは神奈川県横須賀市沿岸域より採取した。得られたサンプルは、各種破砕装置を用いて微粉化処理を施し、溶媒や抽出プロセス等を変え、各種計測法を利用したNMR測定を行うことで、海藻類に含まれる複雑な生体分子のキャラクタリゼーションを行った。同時に、FT-IRやICP-OES装置等を用いて海藻類バイオマスに含まれるバイオマス組成やイオンプロファイル等を評価した。それぞれの計測法により得られた多変量データは数値化・マトリクス化し、各種計測データを多変量解析により特徴づけるとともに、異種計測データ間の多変量相関解析を行うことで統計学的にデータマイニングを行った。

【結果】初めに、海藻類バイオマスにおける生体分子複雑系の抽出方法について、溶媒や抽出プロセス等の条件を検討することにより、各種NMR計測による海藻類のバイオマスプロファイリング法を構築した。次に、構築したNMRプロファイリング法およびFT-IR等の各種測定手法を用いて海藻類のバイオマス成分を計測しデータマイニングを行うことで、各海藻グループに特徴的な情報抽出に成功した。さらに、異種計測データ間の多変量相関解析を行うことにより、水溶性成分と不溶性成分との関係性や、バイオマス組成と金属元素との関係性等に関する情報が発掘可能であることを見出した。従って、本研究において構築した新規異種計測データマイニング法を用いることで、生体分子複雑系から埋もれた情報を発掘可能であることが示唆された。

NMR-based metabolomics, integrated analysis, multivariate statistical analysis

講演番号：3C34p19
講演日時、会場：3月24日17:37～ C校舎34会場

「適正飲酒啓発のためのアルコール体質チェック」有害な飲酒を低減するための取組み

Predictive genetic test of alcohol intolerance for moderate and responsible drinking; Activities for reducing harmful drinking

○太田 豊、加藤 史佳、加藤 直樹、佐見 学、小林 いずみ[1]、鈴木 哲史[2]、北川 泰
（アサヒグループHD（株）食の基盤研、[1]国立がん研・学際的研究支援室、
[2]湘南鎌倉総合病院ゲノム室）

○Yutaka Ohta, Fumika Kato, Naoki Kato, Manabu Sami, Izumi Kobayashi[1], Satoshi Suzuki[2], Yasushi Kitagawa (Res Lab for Fundamental Tech, Asahi Group HD, [1]MRS Office, National Cancer Center, [2]Genome office, Shonan Kamakura General Hospital)

【目的】アルコールの不適切な使用による健康被害は年々深刻化しており、世界的な公衆衛生上の問題となっている(1)。このため、有害な飲酒を低減するための取組みが強く求められる。
【方法】アルデヒド脱水素酵素の一つをコードするALDH2遺伝子上の多型Glu504Lys；rs671は、著しい酵素活性低下をもたらし飲酒行動に大きく影響するとして知られるとともに、飲酒による消化器がん等の罹患リスク上昇に関与するとも報告されている。我々はこの遺伝子型判別を簡便にかつ個人遺伝情報を取得しない仕組みで実施する方法を構築した。そしてアルコールの有害使用低減を目指した取組みの一環として、希望者が無償で体験できるセミナーを行った。
【結果】適正飲酒教育セミナーに「自身のアルコールに対する体質」を知ることを組み合わせたことにより、セミナー全体に対する高い関心を持って聴講いただけた。このセミナーは試験的に不定期開催しており、参加者より良好な感想を得られている。なお、本啓発活動は一般から募った希望者に対し食品成分感受性関連遺伝子型解析を活用するという前例に乏しい試みであり、適切な開催を行うべく医学有識者の協力のもと検討を重ねた。これらの内容に関してもあわせて報告する。

(1)；“Global strategy to reduce the harmful use of alcohol” WHO.

alcohol intolerance、genotyping、CSR

講演番号:4C01a01
講演日時、会場:3月25日09:00～ C校舎01会場

タイトル　根毛形成促進ペプチド（RHPP）の植物への取り込み解析

Title　Analysis of peptide uptake and location of root hair-promoting peptide accumulation in plant roots

〇松宮芳樹、谷口力哉、久保田謙三、久保幹（立命館大生命・生物工）

〇Yoshiki Matsumiya, Rikiya Taniguchi, Kenzo Kubota, Motoki Kubo (Ritsumeikan University)

【背景・目的】

大豆タンパク質を*Bacillus circulans* HA12株の産生するアルカリプロテアーゼにより分解したペプチド群（DSP）が根毛形成促進、不定根形成促進などの生理活性効果を示すことを見出してきた。これらDSPの植物に対する生理活性効果は、既知の植物ホルモンとは効果が異なることが示唆されている。

一方、DSPに含まれる根毛形成促進ペプチドを同定したところ、12残基からなるペプチド（Root hair promoting peptide; RHPP）が植物の生重量増加・根毛形成・不定根形成を促進することを見出してきた。これまでに、外因性の植物生理活性ペプチドや根毛形成を促すペプチドは知られていない。本研究では、RHPPの根毛形成促進メカニズムに関する知見を得るため、RHPPの植物根への取り込みの解析を行った。

【方法・結果】

DSPに含まれるペプチドの植物への取り込みを解析するため、DSP溶液にコマツナ（*Brassica rapa*）およびトマト（*Solanum lycopersicum*）の根を浸し、経時的にペプチド濃度の減少を解析した。その結果、いずれの植物においても、DSP溶液のペプチド濃度は減少した。また、逆相クロマトグラフィーによりDSP中に含まれるペプチドの減少を解析したところ、いくつかのピークが特異的に減少していた。このことから、DSPに含まれるペプチドの種類によって、植物に取り込まれていることが示唆された。

RHPPの植物根への取り込み解析を目指し、FAMで蛍光標識したFAM-RHPPを化学合成した。5 μMのFAM-RHPP溶液にコマツナ葉および根を1～24時間浸し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてペプチドの取り込みを解析した。その結果、1時間処理した場合は、根毛および根毛形成細胞で強い蛍光が確認された。また、経時的に非根毛形成細胞でも蛍光が確認されるようになった。このことから、RHPPは、最初に根毛・根毛形成細胞から取り込まれ、その後非根毛形成細胞に移行し、根毛形成などの生理活性を示すことが示唆された。

さらに、RHPPが直接植物内に取り込まれたのかどうかを解析するため、RHPPを植物根に取り込ませたのちに、根を破砕し、抽出液を逆相クロマトグラフィーにて解析した。その結果、根抽出液中には分解を受けていないRHPPが確認されたことから、RHPPは分解を受けずに植物根に取り込まれていることが明らかとなった。

bioactive peptide, root hair, plant growth

講演番号：4C01a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ C校舎01会場

土壌肥沃度指標（SOFIX）に基づく農地土壌データベースの構築

Construction of database of agricultural soil analyzed by SOFIX

○堀井　幸江、松野　敏英、久保田　謙三、松宮　芳樹、久保　幹（立命館大生命・生物工）
○Sachie Horii, Toshihide Matsuno, Kenzo Kubota, Yoshiki Matsumiya, Motoki Kubo (Ritsumeikan Univ.)

[目的]

これまでに、堆肥や有機物資材を用いた作物栽培で特に重要となる物質循環の活性を定量的に評価する土壌肥沃度指標（Soil Fertile Index, SOFIX）に基づく土壌分析法 を構築してきた。本研究では、SOFIX に基づいて様々な土壌を分析し、土壌環境の改善に資する土壌データベースを作成するために、分析データの解析を行った。

[方法]

土壌の総細菌数は、slow stirring method による eDNA 法で測定した。土壌の総細菌数、アンモニア酸化活性、亜硝酸酸化活性を評価し、その評価値から作成したレーダーチャートの面積の相対値から窒素循環活性を測定した。フィチン酸から水溶性リン酸への変換量をリン循環活性として評価した。栽培に用いた肥料や栽培植物、および農法は特定せず、数多くの農地土壌を評価対象にした。物質循環に関する項目と、土壌中の肥料成分を測定し、土壌環境を総合的に評価する SOFIX に基づく土壌分析を行い、農地土壌のデータベースを作成した。

[結果]

農地土壌 210 サンプルを分析した。総細菌数は平均 7.5 億 cells/g-soil で、全炭素量(TC) は、3,600 mg/kg から 85,600 mg/kg で土壌によって値が大きく異なった。総細菌数と TC には正の相関が認められた。

窒素循環活性は平均 32 点であり、アンモニア酸化活性が亜硝酸酸化活性より低い土壌が多くみられた。よって、農地の硝化はアンモニア酸化が律速になっていることが示唆された。また、土壌中の窒素循環には、2 億 cells/g-soil 以上の細菌の存在が必要であった。リン循環活性は平均 47 点で、土壌によってさまざまな値を示し、総細菌数とリン循環活性には、相関が認められなかった。

畑土壌と水田土壌を比較すると、水田土壌の方が、アンモニア酸化活性がより低い傾向が認められた。

講演番号:4C01a03
講演日時、会場:3月25日09:22～ C校舎01会場

フィターゼ遺伝子を用いたリン循環に関与する微生物の定量

Quantitative determination by phytases gene of bacteria involved in phosphorus circulation

○松野敏英、堀井幸江、田篭純太、久保田謙三、松宮芳樹、久保幹（立命館大・生命・生工）
○Toshihide Matsuno, Sachie Horii, Junta Tagomori, Kenzo Kubota, Yoshiki Matsumiya, Motoki Kubo (Dept. Biotechnology, Ritsumeikan University)

【目的】

リンは生物にとって核酸、リン脂質およびATPなどの合成に必須な元素である。土壌中のリン循環は、土壌中に存在する有機態リン酸（有機態リン酸の多くがフィチン酸である）が土壌微生物によって無機態リン酸や可給態リン酸に変換され、植物体内に取り込まれる。我々はこれまでに、農地土壌のリン循環活性の測定方法およびデータベースを構築し、さらに、リン循環に関与するフィチン酸分解菌を単離・同定した。本研究では、より詳細に土壌中でのリン循環を明らかにするために、土壌中のフィチン酸分解菌数の定量方法を構築することを目的とした。

【方法】

フィチン酸分解菌は*Pseudomonas rhodesiae* 8-3株および*Flavobacterium johnsoniae* 110-1株を用いた。土壌のリン循環活性は、土壌にフィチン酸溶液（pH 7.0）を終濃度3.9 mg-P/g-soilとなるように添加し、土壌の含水率を最大保水容量の60%に調整後、室温で静置し、1日目および4日目の水溶性リン酸の変化量から測定した。土壌中のフィチン酸分解菌数の定量方法を構築するために、Real-Time PCR（KAPA SYBR qPCR Master Mix）を用いた。Real-Time PCRの検量線の作成は、LB液体培地で振とう培養（30℃、300 rpm、24 h）した8-3株を用いた。新たに構築したフィチン酸分解菌の定量方法を用いて、20種類の農地土壌のフィチン酸分解菌数を定量した。さらに、農地土壌のリン循環活性を高めるために、土壌にフィチン酸分解菌（8-3株または110-1株）を投与し、これらの土壌のリン循環活性を解析した。

【結果】

土壌中のリン循環に関与するフィチン酸分解菌数を定量するために、β-propeller phytases (BPP)遺伝子を増幅するためのプライマー（BPP-F: 5’- GACGC AGCCG AYGAY CCNGC NITNT GG -3’、BPP-R: 5’- CAGGS CGCAN RTCIA CRTTR TT -3’）を設計し、Real-Time PCRを用いた定量方法の構築を試みた。その結果、土壌に添加したフィチン酸分解菌数が1.0×10^{6} ～ 1.0×10^{9} cells/g-soilの範囲においてReal-Time PCR の検量線が$R^2 = 0.99$となり、フィチン酸分解菌数の定量方法が構築できた。本方法を用いて20種類の農地土壌を解析した結果、フィチン酸分解菌数および総細菌数は、1.0×10^{6} ～ 1.0×10^{7} cells/g-soilおよび1.0×10^{8} ～ 1.0×10^{9} cells/g-soilであり、フィチン酸分解菌数は総細菌数の1%程度であった。さらに、農地土壌のリン循環活性を高めるために、8-3株または110-1株を土壌に投与（終菌数：1.0×10^{7} cells/g-soil）したところ、未投与区と比較して、リン循環活性がそれぞれ8倍または5倍の増加を示した。これらの結果から農地土壌中のフィチン酸分解菌数がリン循環に密接に関与していることが示唆された。

Phosphorus circulation, Phytic acid, Phytases,

講演番号：4C01a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎01会場

オイルパーム幹の維管束の偏光顕微鏡を用いた検出

Detection of vascular bundle in oil palm trunk by polarization microscopy

○村田善則[1]、久保智史[2]、小杉昭彦[1]、森隆[1]、安部久[2]（[1]国際農研、[2]森林総研）
○Yoshinori Murata[1], Satoshi Kubo[2], Akihiko Kosugi[1], Yutaka Mori[1], Hisashi Abe[2]([1]JIRCAS, [2]FFPRI)

【目的】
オイルパーム(*Elaeis guineensis*)の幹(トランク)は主に柔組織と維管束組織という性質の異なる組織で構成され、樹皮に近い外層部には維管束が多く分布し、内層部では柔組織が増加する。柔組織にはでんぷんなどの炭水化物が含まれることからバイオエタノールの原料として有望であるとともに、強い吸水性を示すことから調湿性素材としての利用も期待できる。しかしながら維管束が混在した柔組織を糖化する際には、維管束組織に酵素が吸着するため、柔組織の糖化効率が低下する。また、吸水性素材としての研究開発には柔組織の物性について調べることが必要であり、そのためには高純度の柔組織を分別することが必要である。しかし、分別された柔組織にどれだけ維管束組織が混在しているか、柔組織の純度について迅速かつ正確に判別する方法はない。我々は維管束組織に偏光による複屈折性があることを見出し、この性質を用いて柔組織の純度判試みた。またセルロースなど成分組成の違いによる判定も試みた。
【方法】
マレーシアにて伐採したオイルパームトランクより採取した木部組織を粉砕、乾燥後、篩を用いて維管束と柔組織に予備的に分離した後、手作業により、維管束および柔組織の相互の混入が無いように分離し、純度の高い柔組織および維管束組織を調製後、標準サンプルとした。分離した維管束および柔組織はカッティングミルにより細かく破砕した後、偏光顕微鏡を用いて直交ニコル下での複屈折性をもとに維管束の検出を行った。一方、抽出成分、クラソンリグニン、ホロセルロース、αセルロースは、乾燥した柔組織および維管束粉末を用いて定法に従い定量した。
【結果】
オイルパームトランクより分離した柔組織および維管束を偏光顕微鏡で観測したところ、維管束は偏光を屈折する性質を有するが、柔組織には複屈折の性質は見られなかった。柔組織と維管束を一定の割合で混合したサンプルでは、維管束の量に比例して偏光の複屈折強度が変化した。これより、偏光による複屈折性を用いた維管束の検出及び定量が可能であることが考えられた。従来の化学分析によるサンプル中の構成成分について測定したところ、デンプンおよびαセルロースの分布が維管束および柔組織において大きく異なったことから、これらの成分についても柔組織と維管束の純度判定の指標として用いることができると考えられた。

Oil palm, vascular bundle, polarization

講演番号：4C01a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎01会場

地球に優しい天然素材サーファクチンナトリウムの有用性

Potential of sustainable natural sodium surfactin

○泉田　将司、柳澤　恵広、上山　昇（㈱カネカ・ＱＯＬ事業部）
○Masashi Izumida, Satohiro Yanagisawa, Noboru Ueyama (Kaneka QOL Div.)

【目的】微生物が発酵生産するバイオサーファクタントは、天然由来ならではの安心感があり、乳化能をはじめとする多様な機能を示すことが知られている。その一種であるサーファクチンは、安全性が高いことや納豆に含まれることが知られ、強力な乳化能等を活用して化粧品や医薬部外品等の原料として利用されている。近年の環境意識の高まりに起因する天然素材への期待を背景に、本素材の由来に加え、環境やヒト、即ち地球に及ぼす影響について新たな知見を取得した。

【方法と結果】発酵生産により得たサーファクチンナトリウムについて、放射性炭素（Ｃ１４）濃度比の測定によりバイオベースド起源炭素比率を確認した。その結果、分子を構成する炭素の１００％がバイオ起源で化石燃料由来を含まないことが確認され、本素材が天然由来であることを科学的に証明できた。また、環境から採取した海水や河川水を用いたモデル系での生分解性試験で容易に分解されることを確認し、環境に及ぼす影響は小さいと推測された。更に、ニキビの原因となるアクネ菌に対して生育阻害活性を有することを把握し、ヒトへ好影響を与える可能性が示唆された。

Sodium surfactin, sustainable, natural

講演番号：4C01a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎01会場

カキ果実のクチクラ膜のバイオメカニクス特性に関わるワックスの効果

The effects of wax on biomechanical properties of cuticular membranes of *Diospyros kaki* Thunb. L. cv. *Fuyu*

○椿 俊太郎、杉村 和紀[1]、寺本 好邦[1]、尾崎 嘉彦[2]、東 順一[3]（高知大・総研セ、[1]京大院農・森林科学、[2]農研機構・果樹研、[3]京大院農・地域環境）

○Shuntaro Tsubaki, Kazuki Sugimura[1], Yoshikuni Teramoto[1], Jun-ichi Azuma[1] (Science Research Center, Kochi University, [1]Divisionn of Forest and Biomaterial Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]National Institute of Fruit Tree Science, National Agriculture and Food Research Organization, [3]Division of Environmental Science and Technology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】植物は乾燥、病原菌や害虫、植物体内を保護するためにクチクラ膜と呼ばれる脂質性の膜を発達させている。また、クチクラ膜は果実の棚もちや見栄えなどの品質の維持に重要である。クチクラ膜は大まかにワックス、クチン、多糖、クタンの四種類の成分で構成されている。本研究ではクチクラ膜がしなやかな機械的特性を呈するメカニズムを明らかにするためにカキ果実の果皮を試料として用い、果実表面を覆うクチクラ膜の化学組成や物理的特性について調べた。

【方法】2010年に京都市内で栽培された富有柿（大枝柿）を用いた。ペクチナーゼとセルラーゼ処理により果皮からクチクラ膜を調製した。クチクラ膜組成は重量分析、クチン組成およびワックス組成はGC/MS分析、糖組成についてはHPAEC分析を用いて調べた。また、クチクラ膜の機械的特性については引張試験により評価した。

【結果】富有柿のクチクラ膜はワックス、クチン、多糖およびクタンがそれぞれ576 $\mu g/cm^2$ (34.7%)、803 $\mu g/cm^2$ (48.4%)、45 $\mu g/cm^2$ (2.7%)、34 $\mu g/cm^2$ (2.0%)の割合で構成されていた。カキの特徴はワックスの多さにあり、その含有量はリンゴの皮に似ていたが、ワックス含量が非常に低く多糖に富むトマトなどの果皮とは大きく異なった。ワックス組成はウルソル酸(62.5%)やオレアノール酸(19.9%)といった5環系トリテルペノイドが多く、また、クチン組成はC16やC18のヒドロキシ脂肪酸が構成単位となっていた。クチクラ膜内の多糖はグルコース(55.5%)が主要構成単糖であることから、セルロースが多く含まれると示唆されるが、さらにキシランやペクチンも少量含まれていることを見出した。これらの結果は、富有柿のクチクラ膜には脂質のポリマーに低分子のワックス成分が混じり込んでおり、さらに少量の多糖の繊維が入り込んだ複合材料であることを示している。さらに、機械的特性に対するクチンとワックスの相互作用について詳しく調べたところ、ワックスが存在することにより最大強度、最大伸度、弾性係数のすべての値が大きく改善された。ワックスはフィラーとしてクチクラ膜の機械的特性の向上に寄与していることが示唆された。

Diospyros kaki, cuticular membrane, mechanical property

講演番号:4C01a07
講演日時、会場:3月25日10:16～ C校舎01会場

好熱菌発酵産物が植物体内のアミノ酸代謝に与える影響

Effects of thermophile-fermented compost on the metabolism of amino acids in the plant.

○宮本 浩邦[1,2,3]、石川 一人[1]、井藤 俊行[4]、申 美來[1]、長尾 雅音[1]、宮本 久[3]、児玉 浩明[5]（[1]千葉大院・園芸、[2]日環科学、[3]三六九、[4]京葉プラント、[5]千葉大院・融合科学）

○Hirokuni MIYAMOTO[1,2,3], Kazuto ISHIKAWA[1], Toshiyuki ITOH[4], Mire SHIN[1], Masane NAGAO[1], Hisashi MIYAMOTO[3], Hiroaki KODAMA[5]（[1]Hort. Chiba Univ., [2]JE, [3]MIROKU, [4]KPE, [5]Integr. Chiba Univ.）

我々は、*Bacillaceae*を主体とした好熱菌群によって海産資源を75℃前後で発酵した産物が植物の性質に与える影響を解析している。近年、当該発酵産物を土壌に添加することによって植物体内の硝酸態窒素含量が低下し、その反応が土壌微生物系の影響の下に制御されていることを明らかにした（2007ー2011年・日本農芸化学会）。本研究では、植物体内の窒素代謝に関わる反応系の中で、有機態窒素であるアミノ酸の挙動に着目し、当該発酵産物の影響を解析した。アラビドプシスをモデル植物として検討した結果、発酵産物を添加した試験区では、植物体内の硝酸トランスポーターの一部は発現量が増したが、硝酸態窒素含量は低減しており、その一方でグルタミン酸、グルタミン、アルギニンが増加する傾向が確認された。一方、栽培土壌の含水率が１０％程度低下した条件下では、特にプロリンが増加する傾向が確認された。このような傾向は、土壌の含水率の低下に依存して植物体内のプロリンがグルタミン酸から生合成される反応と矛盾しなかった。以上の結果から、当該発酵産物の土壌への施用は、栽培条件に応じて植物体内の遊離アミノ酸組成を変化させる可能性があることが期待された。

thermophile, plant, amino acid

講演番号：4C01a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ C校舎01会場

マンガン酸化系を構成する2種の細菌の分離と相互作用解析

Cultivation and characterization of bacterial manganese oxidation system

○小野　博史，田村　隆，高田　潤，稲垣賢二（岡山大学大学院・自然科学）
○Hirohumi Ono, Takashi Tamura, Jun Takada, Kenji Inagaki (Grad. Sch. Nat. Sci. Tech, Okayama Univ.)

【目的】自然界において生物がある金属を酸化して構築物を形成する現象をバイオミネラリゼーションという。マンガンを酸化するマンガン酸化細菌は，海洋，河川，沼地あるいはパイプラインなど様々な場所に生息している。鉄酸化能を有する独立栄養細菌は詳細な研究が行われてきたが，マンガン酸化活性を示す細菌の報告は少ない。本研究では，静岡県の河川から集積培養されたマンガン酸化活性を有する微生物群から，マンガン酸化系を構成する２種類の細菌を分離した。

【方法・結果】

鉄の酸化とは異なりMn^{2+}の酸化はエネルギーを要求する反応なので，従属栄養型の微生物が関与すると考えられた。そこで集積培地の培養条件を検討した結果，炭素源としてグルコース，窒素源として硫安を添加した培地による培養法を確立した。マンガンの酸化は過ヨウ素酸カリウム比色法によって培養液中の２価マンガンの減少を定量してアッセイした。マンガンの酸化はグルコースの添加に依存することが示された。またマンガン酸化活性の最適温度は30℃であった。

集積培養したマンガン酸化菌叢から，寒天平板培地への線引きを繰り返すことにより，マンガン酸化物を蓄積する菌の単離を進めて，マンガン酸化に関わる2種類の菌を単離した。片方のコロニーは白色で，もう一方は赤色のコロニーを形成する。黒色のマンガン酸化物は赤色のコロニーを形成する細菌において形成されるが，これは赤コロニーの細菌単独では形成されず，白色の細菌のコロニーが近傍にあるときにのみ，マンガン酸化物が蓄積した。

そこで赤，白の両コロニーの距離をあけて寒天平板培地で培養したところ，寒天中を拡散する成分が赤コロニーから供給されたときに白コロニーがマンガン酸化物を蓄積することが示された。

manganese, oxidation, biomineralizaion

講演番号:4C01a09
講演日時、会場:3月25日10:38～ C校舎01会場

河口環境代謝プロファイリング技術による底生物流システム評価法構築の試み

Metabolic profiling for evaluation of benthic cycles in estuarine ecosystems

○朝倉　大河[1]、葭田　征司[1]、伊達　康博[1,2]、菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横市院生命、[2]理研PSC、[3]理研BMEP、[4]名大院生命農）

○Taiga　Asakura[1], Seiji Yoshida[1], Yasuhiro Date[1, 2], Jun Kikuchi[1, 2, 3, 4]（[1]YCU, [2]RIKEN　PSC, [3]RIKEN　BMEP, [4]Nagoya　Univ.）

【目的】河口環境は生物多様性に優れ、その生態系サービスには人類も大きく恩恵を受けている。しかし河口域は複雑な水環境システムで成り立っており、生態系サービスの保全・再生・開発等に資する知見の収集やその恩恵を持続的に享受するための技術開発には、既存の要素還元的な分析方法では複雑な水環境システム全体の相互作用や持続可能性等の総体的な評価を行うことが難しく、網羅的な評価法の開発が嘱望されている。そこで我々は食物連鎖などにより環境情報が濃縮されていく底生生物を指標とし、核磁気共鳴(NMR)メタボロミクスによる代謝プロファイリング技術を基軸とした底生物流システム評価法の構築を試みた。

【方法】本研究では鶴見川、相模川、多摩川、荒川等の各河川を対象に、代謝プロファイリング技術を用いて底生環境における物流システム評価法の構築を試みた。底生環境を評価するため、その環境に存在する底泥や水を採取するとともに、環境情報が濃縮されている指標生物としてハゼ科魚類を採集した。採集したハゼ科魚類は筋肉、内臓および腸内容物にわけ、凍結乾燥を行い、物理破砕装置を用いて粉末化し、各種溶媒を用いて代謝物を抽出した。抽出した代謝物はNMRにより計測し、得られたスペクトルをBin化処理により数値化し、マトリクス化した後、フリーソフトウェアRを用いて主成分分析法(PCA)等の多変量解析を行った。また、各サンプルはICP装置を用いて金属イオンプロファイルを得るとともに、分子生物学的手法を用いて魚類腸内微生物叢を解析した。底泥や水については、各種栄養塩類の測定を行うとともに、溶存有機物や粒子状有機物の評価も試みた。

【結果】はじめに鶴見川、相模川、多摩川、荒川の四河川に生息するハゼ科魚類を対象とし、本研究で考案する代謝プロファイリング技術を用いることで、各河川において特徴的な環境情報の抽出が可能かどうかを試みた。その結果、ハゼ科魚類の筋肉および内蔵における代謝プロファイルを統計学的に比較・解析することで、各河川の生息環境を反映した代謝情報を抽出することに成功し、特に、鶴見川、荒川、多摩川のグループと相模川のグループにおけるハゼ科魚類の代謝プロファイルに大きな違いがあることを明らかにした。次に、得られた代謝プロファイルと環境情報の関係性を見出すため、ICP-OES装置を用いて水や底泥等の周辺環境に存在する金属元素を網羅的に計測し、得られたデータを代謝プロファイリングと同様に多変量解析を行うことで、特徴的な金属イオンプロファイルを取得するとともに、ハゼ科魚類の腸内微生物叢プロファイルについても同様に解析を進めており、これら全てのプロファイルから多変量相関解析によりデータマイニングした最新の結果についても本会で議論したい。

Keyword1 NMR-based metabolomics, Keyword2 multivariate statistical analysis, Keyword3 goby

講演番号：4C01a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ C校舎01会場

排水処理汚泥の細菌叢解析による硫化水素発生プロセスとその影響因子に関する研究

*DsrB*Gene-Based DGGE Analysis of the Inhibitory Effect of Nitrate on the Sulfate-reducing Bacterial Community Dynamics in a Laboratory-scale Wastewater Reactor

森下由唯[1]、水野康平[1]、○安東晶子[2]、平田舞[3]、田中賢二[3]（[1]北九州高専、[2]九州電力・総研、[3]近大・産理工）

Yui Morishita[1], Kouhei Mizuno[1], ○Akiko ANDO[2], Mai Hirata[3], Kenji Tanaka[3] (Kitakyushu National College of Technology[1], Kyushu Electric Power Co. Inc.[2], Kinki University[3])

【目的】産業活動区域での突発的硫化水素発生は深刻な問題である。主な原因は硫酸還元代謝とされるが、細菌叢中での硫酸還元菌優勢化条件は不明である。本研究では、実排水の解析により突発的硫化水素発生を細菌学的に検討する。その検討法として、亜硫酸還元酵素遺伝子(*dsrB*)をターゲットとし、硫酸還元菌の詳細な動態検出を試みた。この手法で、硫酸還元代謝を抑える硝酸イオンを添加した排水の嫌気状態移行時の硫酸還元菌の菌叢変化を検討した。

【方法】排水処理施設の活性汚泥法窒素処理槽の排水を用いた。各排水にKNO_3を添加、未添加のもの計4種類の排水を嫌気状態で、1週間～1ヶ月培養、サンプリングを行った。排水由来DNA抽出物をサンプルとし、16S rDNA、*dsrB*をターゲットにPCR-DGGE解析を行った。

【結果】16S rDNA では検出できなかった硫酸還元菌の動態の詳細を検出した。硝酸イオン未添加系において、硫化水素発生の主な原因菌は *Desulfovibrio* 属であり、硝酸イオン添加によって、*Desulfovibrio* 属が選択的に抑制される可能性が示唆された。また、嫌気状態へ移行した培養初期、終期を比較すると、各期間に特有の菌叢が現れることも分かった。

Keyword1, *dsrB*, Keyword2, sulfate reducing bacteria, Keyword3, bacterial community

講演番号：4C01a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ C校舎01会場

*Phanerochaete chrysosporium*自然突然変異株由来のカルボキシン耐性遺伝子

Carboxin resistance genes from spontaneous mutants of *Phanerochaete chrysosporium*

○熊野 翔太、田村 美理、小篠 貴臣、泉津 弘佑、阪本 鷹行、北浦 博法、鈴木 一実、入江 俊一（滋賀県大・環）

○Syota Kumano, Miri Tamura, Takaomi Ozasa, Kosuke Izumitsu, Takaiku Sakamoto, Hironori Kitaura, Kazumi Suzuki, Toshikazu Irie (Shigakendai)

【目的】*Phanerochaete chrysosporium* は世界で最も広く研究されている白色腐朽菌であり、形質転換系開発に関する報告もいくつか存在する。しかし、多様な逆遺伝学的手法を適用するためには、より多くの選択マーカー遺伝子が求められる。*P. chrysosporium* は10 μg/mlカルボキシン（Cbx）を添加したポテトデキストロース寒天（PDA）培地上で成育が阻害されるが、Cbx耐性株が自然発生することが我々の観察によって明らかとなった。Cbxはcomplex IIの機能を阻害するのだが、complex IIのサブユニットであるiron-sulfur protein (Ip) サブユニット（SDHB）が一アミノ酸置換した変異遺伝子がCbx耐性を付与する選択マーカー遺伝子として、*Ustilago maydis*や*Pleurotus ostreatus*（ヒラタケ）などの形質転換系で利用されている。本研究では、Cbx耐性*P. chrysosporium*株の性質を調べると同時に、*sdh*Bにおける変異の有無を確認し、新たな選択マーカー遺伝子としての利用性を評価することを目的とした。

【方法および結果】Cbx耐性突然変異株が出現する頻度を確認するため、10 μg/ml Cbx添加PDA培地（直径9 cm）に分生胞子を1～5×10^7個ずつスプレッダーで広げ、暗所、37ºCで1週間培養を行った。その結果、約1.3株/1×10^7分生胞子の頻度でCbx耐性株が自然発生することが明らかとなった。得られたCbx耐性株群は50 μg/ml Cbx添加PDA培地上においても生育可能であった。次に、9株を選抜し、*sdh*B全長配列をクローン化して、塩基配列を決定した。その結果、9株中2株について、iron-sulfur redox centerの一つを形成するS-3クラスターのHis残基がAsn、またはTyr残基に置換されていた。これは、*U. maydis*や*P. ostreatus*由来のCbx耐性遺伝子と同様の変異であり、これら2株のCbx耐性は当該の変異によるものと示唆される。それ以外の領域、また、残りの7株の*sdh*B配列全領域に変異は見られなかった。他のcomplex IIサブユニットである2種の膜アンカータンパク質遺伝子の変異によってもCbx耐性が付与されることが知られているが、これらの7株についても*sdh*B以外の変異によりCbx耐性を獲得したものと思われる。取得された変異*sdh*B（*Phcbx*^{R}）は他の担子菌類と同様に、遺伝子導入系の選択マーカー遺伝子として使用可能であると考えられる。現在、*Phcbx*^{R}と選択マーカーとしての（*P. chrysosporium sdh*Bプロモーターで制御された）ハイグロマイシンB耐性遺伝子をT-DNA領域に持つバイナリベクターを作製し、これを用いたアグロバクテリウム法による野生株への*Phcbx*^{R}の導入を試みているところである。得られた形質転換株についてCbx耐性を確認した上で、改めて*Phcbx*^{R}を選択マーカー遺伝子とした形質転換を行う予定である。

transformaion, carboxin, basidiomycete

講演番号:4C01a12
講演日時、会場:3月25日11:21～ C校舎01会場

脂肪酸塩の*Fusarium*及び*Cladosporium*に対する抗カビ効果

Antifungal effect of fatty acid salts against *Fusarium* and *Cladosporium*

○鷲巣　孝、惠良真理子[1]、二宮純子[1]、川原貴佳[2]、完山陽秀[2]、森田　洋[1]
(北九大院・国際環境工、[1]北九大・国際環境工、[2]シャボン玉石けん(株))
○Takashi Washisu, Mariko Era[1], Junko Ninomiya[1] ,Takayoshi Kawahara[2]、Takahide Kanyama[2]、Hiroshi Morita[1]
(Grad.Sch.Env.Eng.Kitakyushu, [1]Fac.Env.Eng.Kitakyushu, [2]Shabondama Soap.Co.,Ltd.)

【目的】

糸状菌類は自然界に広く生息し、食品や野菜、果実において繁殖し、変質・変敗・劣化を引き起こす。さらに、エアコンフィルター、タタミ、じゅうたん、浴室といった住環境においても繁殖し、変質や劣化を引き起こすだけでなく、感染症、中毒、アレルギー性疾患などの健康被害をもたらすことも明らかとなっている。このような背景から、抗カビ効果が高く、持続性を有し、かつ安全性の高い防カビ剤の創出が求められている。そこで本研究では脂肪酸塩の*Fusarium oxysporum*及び*Cladosporium cladosporioides*に対する抗カビ効果について検討を行った。

【方法】

脂肪酸塩にはカプリル酸カリウム(C8)、カプリン酸カリウム(C10)、ラウリン酸カリウム(C12)、ミリスチン酸カリウム(C14)、オレイン酸カリウム(C18;1)、pH調整水(pH=10.5)を用いた。抗カビ試験は、植物病原菌として*Fusarium oxysporum* NBRC 31631、住環境において繁殖しやすいカビとして*Cladosporium cladosporioides* NBRC 30314を用い、胞子懸濁液とサンプルを混合させた後、撹拌を行いながら、10分・60分・180分後にサンプリングを行い、ポテトデキストロース寒天培地（日水製薬株式会社製）に塗布し、*Fusarium oxysporum*は30℃で10日間、*Cladosporium cladosporioides*は30℃で8日間培養を行った。結果は寒天培地上に現れたコロニー数を計測することで、残存する生菌数（CFU/ml）を算出した。

【結果】

抗カビ試験の結果、*Fusarium oxysporum*では培養2日の時点で、C8とC10が高い抗カビ効果を示した。C8の抗カビ効果は静菌的であり、胞子懸濁液と脂肪酸塩とを接触後にポテトデキストロース寒天培地上に3日間以上培養することで、コロニーの出現が認められた。また、*Cladosporium cladosporioides*では、C8、C10、C12、C14において高い抗カビ効果が認められたが、C8は脂肪酸塩との接触後に5日以上寒天培地上で培養することにより，コロニーの出現が認められた。以上の結果より、*Fusarium oxysporum*ではC10が、*Cladosporium cladosporioides*ではC10、C12、C14が高い抗カビ効果を示し、かつ効果の持続性が確認された。

Fatty acid salts、 *Fusarium oxysporum, Cladosporium cladosporioides*

講演番号：4C02a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ C校舎02会場

安定化次亜塩素酸水を基盤とする畜産分野を指向した衛生管理および防疫対策

Management of Hygienic Status and Prevention of Epidemics Countermeasure Toward Stock-Raising Industry Based on the Aqueous of Stabilization Hypochlorous Acid

○田村　健治、神戸　英昭[1]、大石　智哉[1]（首都大産技高専・品川、[1]（株）マッキンリー）
○Kenji Tamura, Hideaki Godo[1], Tomoya Oishi[1] (Tokyo Metr. Coll. Ind. Tech., [1]Mckinley Co., Ltd.)

【目的】近年、養鶏・養豚・牧畜・酪農などの畜産分野において、高病原性鳥インフルエンザや狂牛病などをはじめとする感染症が大きな環境問題となっている。特に養鶏分野において、病原性の高さ・感染の広域化抑止・人畜共通感染対策などの観点から、殺処分・焼埋却、移動制限区域の設定などの防疫措置が講じられている。これらの家畜伝染病予防対策の一環として、安定化次亜塩素酸水[1]の利活用を基盤とした衛生管理ならびに防疫対策の実践モデルを検討し、具体的な方法論を構築するため研究を行った。さらに本品は、食肉加工工程や洗卵工程における衛生管理などにも応用可能であり併せて報告する。

【方法】次亜塩素酸 HClO は強力な酸化作用を有するために殺菌・消臭効果を発現することが従来から知られており残留性が少ない殺菌剤である。特に、白血球の好中球において体内合成される物質であり人畜無害である。しかしながら、塩素ガス Cl_2 の使用や発生を伴う従来法（式１）により調製される HClO は、副生する塩酸 HCl が共存するため強酸性で腐食性を有し、さらに HClO が活性（不安定）なため存在寿命が非常に短く、調製後直ちに使用することが必要で保存や流通が不可能であった。一方、著者らが開発した安定化次亜塩素酸水は、殺菌・消臭効果や安全性はそのままに毒性の塩素ガスの使用・発生を伴わず、HCl が共存しないため弱酸性で腐食性を有さない環境負荷の小さい HClO を連続的に調製する装置[2]を開発した。本装置により調製される本品は、有効塩素濃度および水素イオン指数 pH を任意の設定値に高精度制御されて調製されるため、存在寿命が非常に長く、保存や流通も可能である（式２）。

従来法：$Cl_2 + H_2O \rightleftarrows HClO + H^+ + Cl^-$　（１）

[水中への Cl_2 バブリングまたは電気化学的な Cl_2 の発生による水−塩素の溶解平衡の応用]

本　法：$NaClO + H^+ + Cl^- \rightarrow HClO + Na^+ + Cl^-$　（２）

[次亜塩素酸ナトリウムと希塩酸による中和反応：高精度・連続的な流体制御技術を駆使]

【参考文献】[1] (a) Tamura, K., *et al*., *56th Ann. Meet. Jpn. Water Works Ass*., 4-113, Yonago, (2005). (b) Tamura, K., *et al*., *57th Ann. Meet. Jpn. Water Works Ass*., 4-81, Nagasaki, (2006). (c) Tamura, K., *et al*., *58th Ann. Meet. Jpn. Water Works Ass*., 4-84, Kushiro, (2007). (d) Tamura, K., *59th Ann. Meet. Jpn. Water Works Ass*., 4-53, Sendai, (2008). (e) Tamura, K., *Water Envir. Tec. Conf. 2010 (WET2010)*, 25-1A-01, Yokohama, (2010). [2] (a) Henmi, H., *et al*., *Japan Kokai Tokkyo Koho*, JP2002-273452, (2002). (b) Henmi, H., *et al*., *Japan Tokkyo Koho*, JP3438880, (2003). (c) Yamamoto, Y., *Japan Kokai Tokkyo Koho*, JP 4413983, (2010).

chemical water treatment technology, pasteurization effect, deodorization effect

講演番号:4C02a02
講演日時、会場:3月25日09:11～ C校舎02会場

ビスフェノール類に走性を示す細菌の集積応答特性

characterization of chemotactic response of *S. maltophilia* to bisphenols.

○荷方　稔之、近藤　孝拓、柿井一男（宇都宮大院工･物質環境）
○Toshiyuki Nikata, Takahiro Kondo, Kazuo Kakii (Utsunomiya Univ.)

【目的】　運動性を有する細菌は特定の化学物質の濃度勾配を感知し，その化学物質に対して集積したり忌避したりするといった性質を示す。この走化性と呼ばれる性質は細菌にとっては自然界で生き残るために有利に働くと考えられるが，この性質を細菌による化学物質認識能力ととらえ，例えば新規化学物質検出システムやより効率的なバイオレメディエーションへの適用など工学的な応用を目指している。一方ビスフェノールA（BPA）に代表される化学物質はプラスチックの原料など工業的に大量に利用されているが難分解性でかつ内分泌撹乱性も疑われており，環境への影響が懸念されている。我々が活性汚泥から分離した細菌*Stenotrophomonas maltophilia* PNT1株は，ビスフェノールAをはじめ様々な芳香族化合物に走性を示す細菌であり，その応答特性についてこれまで報告してきた。本発表では，ビスフェノールAの類似化合物であるビスフェノールF（BPF）およびビスフェノールS（BPS）に対して走性応答を調査したので報告する。
【方法】　使用菌株は活性汚泥から分離された*S. maltophilia* PNT1株および標準菌株であるJCM1975株を用いた。走化性の試験物質にはBPA、BPF、BPSを使用した。走化性の測定では、内径35 μmのキャピラリーに試験物質を吸入し、それを細菌懸濁液に挿入することで、キャピラリーの開口付近に細菌が集積する映像を2分間録画後、画像処理ソフトウェアNIH Imageを用いて静止画を二値化し、経時的に細胞数が増加するときの集積初速度(cells/sec)を、細菌懸濁液の濁度(OD_{660})で補正した比集積初速度(cells/sec・OD_{660})を用いて評価した。
【結果】　*S. maltophilia* PNT1株はBPA(1.0mM)に対して集積応答（34.9 cells/sec・OD_{660}）を示す。本細菌は，BPAの類似物質であるBPF(1.0mM)に対しても集積応答を示した（24.2 cells/sec・OD_{660}）が、BPSには走性を示さなかった。そこでBPAおよびBPFに対する濃度依存性試験を行なった結果、BPAでは 0.01 mM、BPFでは0.1mMまでを限界濃度とした走化性測定が可能であった。BPAに比べてBPFの走性応答が弱い理由として，BPAにのみ存在する２つのメチル基の関与が考えられるが，PNT1株はメチル基のみを持つトルエンには応答しない。しかしながらメチル基を有するフェノール系化合物である*p*-クレゾールやビスフェノールＡに対する応答は、メチル基を有していないフェノールやビスフェノールFに対する応答と比べ比較的強いことから、メチル基単独ではなく，フェノールを含む分子構造として感知し応答していると考えられた。

chemotaxis, bisphenol, bacteria

講演番号：4C02a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ C校舎02会場

塩素化エチレン類汚染環境の好気的生物修復の環境影響評価

Environmental assessment of bioaugmentation of chlorinated ethylene-contaminated soil and groundwater under aerobic condition

○俵 陵輔[1]、沼田 充[1]、山副 敦司[2]、細山 明[2]、黄地 祥子[2]、山崎 秀司[2]、野田 尚宏[3]、関口 勇地[3]、下村 有美[4]、早津 雅仁[4]、高畑 陽[5]、山根 久和[1]、野尻 秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ、[2]NITE、[3]産総研、[4]農環研、[5]大成建設）

○Ryosuke Tawara[1], Mitsuru Numata[1], Atsushi Yamazoe[2], Akira Hosoyama[2], Shoko Ohji[2], Shuji Yamazaki[2], Naohiro Noda[3], Yuji Sekiguchi[3], Yumi Shimomura[4], Masahito Hayatsu[4], Yo Takahata[5], Hisakazu Yamane[1], Hideaki Nojiri[1] ([1]Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [2]National Institute of Technology and Evaluation, [3]National Institute of Advanced industrial science and Technology, [4]National Institute for Agro-Environmental Sciences, [5]Taisei Corporation)

【背景と目的】塩素化エチレン類は優れた有機溶剤として広く使用されてきたが、近年発がん性や中枢神経の麻痺などの問題点が指摘されている。これらの不適切な処理による土壌や地下水汚染が問題となっているため、これら汚染を低コストで浄化可能なバイオレメディエーションのニーズが高まっている。嫌気・好気処理を組み合わせた効率的、かつ実用化可能なバイオレメディエーション技術の確立を目指して、本研究では好気処理の環境への影響を評価した。
【方法】酸素で飽和させた地下水と地下土壌を混合したスラリー系を作成し、トリクロロエチレン（TCE）、*cis*-ジクロロエチレン（*cis*-DCE）により人工的に汚染させた。好気的塩素化エチレン分解菌として、ジメチルスルフィド（ジメチルスルフォキシド、DMSO）分解菌*Acinetobacter* sp. 20B株を用いた。栄養源のみ添加（バイオスティミュレーション）、栄養源と20B添加（バイオオーグメンテーション）の各条件による溶存酸素濃度、ATP濃度、有機酸濃度、TCE/*cis*-DCE残存量、pH、全菌数をそれぞれ測定することで、系内の微生物の生育、栄養源・代謝物の増減、塩素化エチレン類の分解などを継時的に追究した。さらに、DNAを試料から直接抽出し次世代シーケンサーによるメタ16S解析を行うことで、微生物叢変化や既知分解菌／病原性微生物の存在をモニタリングした。
【結果】バイオスティミュレーション、バイオオーグメンテーション両実験において、酸素と有機酸の消費に伴うATP濃度の上昇、pHの上昇、全菌数の増加、TCE/*cis*-DCEの減少がみられた。さらに、この傾向はバイオオーグメンテーション実験においてより顕著であった。メタ16S解析によりバイオスティミュレーション実験における菌叢内の優占種はβプロテオバクテリアとγプロテオバクテリアであり、その存在比が継時的に変化していくことを見出した。また、バイオオーグメンテーション実験においては、最初は添加した*Acinetobacter*属がほぼ独占的に存在したが、次第にその存在割合が低下し*Pseudomonas*属に取って代わられていく様を観察することができた。さらに、好気および嫌気的な既知分解菌の存在も確認することができた。

chloroethylene, bioremediation, bioaugmentation

講演番号：4C02a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎02会場

タイトル　*Xanthobacter autotrophicus* による好気的ジクロロメタン分解条件の検討
Title　Aerobic degradation of dichloromethane by *Xanthobacter autotrophicus*
○細田　晃文，竹内　一貴，堀田　雄大，田村　廣人（名城大・農）
○Akifumi Hosoda, Kazutaka Takeuchi, Yudai Hotta, Hiroto Tamura (Meijodai)

【目的】現在，有機溶剤を含む排水処理は，焼却処理や触媒による化学分解等のエネルギー消費型である。さらに，法改正により浄化対象物質はオンサイト浄化が求められるようになっている。このことからも微生物を利用した浄化プロセスの構築は重要である。そこで，本報告では，ジクロロメタン（DCM）排水の浄化に関わる細菌のDCM分解能を向上する培養条件の検討を試みた。
【方法】供試菌株には好気性塩素化アルカン類分解細菌と報告がある *Xanthobacter autotrophicus* GJ10株（ATCC 43050）を用いた。GJ10株のDCM分解試験は最小無機塩培地あるいは1/10NB培地 5 mLにDCM（終濃度1.7～7.1 mM）を添加した液体培地で27℃，7日間振とう培養した。また，GJ10株のDCM分解能を促進するために酢酸（終濃度 1～10 mM）添加区を設けた。GJ10株の増殖は$OD_{660\ nm}$の経時的測定から判断し，各分解試験は各3連で行い，ブチルゴムとアルミキャップで密栓した試験管を用いた。GJ10株によるDCM分解はDCMのヘキサン抽出およびその抽出物について，電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフィー（GC2014-ECD；Shimadzu）分析により確認した。また，DCM分解に伴う塩化物イオンはイオン分析計（IA-300；TOA-DKK）により測定した。さらにDCM分解に伴う酢酸濃度の変化を電気伝導度検出器付き高速液体クロマトグラフィー（有機酸分析システム；Shimadzu）により分析した。
【結果および考察】GJ10株は7日間の培養で0.47 mM～1.7 mMのDCMを分解する能力を有していた。また，分解したDCM（約2 mM）から生成した塩化物イオンは約4 mMであり，DCMは生物的脱塩素化により分解されたことが明らかとなった。酢酸添加に伴い，DCM分解率は0.12 mmol/L/dayから0.20 mmol/L/dayに向上した。これらの結果から好気性DCM分解細菌である *X. autotrophicus* GJ10株は酢酸の添加によりDCM分解率が促進されることが明らかとなった。すなわち，DCMを対象とした浄化プロセスにおいて，GJ10株と酢酸の添加による好気的バイオリアクター構築の可能性が示された。今後は，GJ10株をDCMの環境浄化に適用するため酢酸を供給することができる浄化促進剤の探索とその最適な利用条件を検討する予定である。

dichloromethane, Bioremediation, acetate

講演番号：4C02a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎02会場

Sphingomonas bisphenolicum AO1株の芳香族環境汚染物質分解に関わる内在性プラスミドの重要性

Involvement of the endogenous plasmid in degradation of aromatic pollutants by *Sphingomonas bisphenolicum* AO1.

○上村真央[1]、前川睦乃[1]、奥野将司[1]、小田佳孝[1]、松村吉信[1,2]（[1]関西大・化学生命工、[2]関西大・ORDIST）

○Mao Uemura, Chikano Maekawa, Masashi Okuno, Yoshitaka Oda, Yoshinobu Matsumura（Kansai Univ.）

【目的】内分泌撹乱化学物質の一つであるビスフェノールA（BPA）は、ポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂に原料として多量に使用され、人体に悪影響を及ぼすと示唆されている。2010年にはカナダでBPAが有害物質に指定され、工場から環境へのBPA排出量が規制されている。このようなことから、BPAの無毒化や分解処理技術の必要性が高まっている。当研究室で単離した*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株はBPAを完全分解できる。これまでに、本株のBPA分解活性とその代謝経路を解析し、フェレドキシン（Fd_{bisd}）とフェレドキシン還元酵素（Red_{bisd}）を含むcytochrome P450（$P450_{bisd}$）モノオキシゲナーゼシステムがBPA代謝の初期反応であるBPAの水酸化を触媒することを明らかにした。細菌型のcytochrome P450モノオキシゲナーゼの中には極めて広い基質特異性を持つ種類も存在している。本研究では、AO1株が持つ環境汚染物質分解能の詳細な調査とこの分解能に必要となる内在性プラスミドpBAR1の働きについて検討した。

【方法と結果】環境汚染物質を添加したL培地でAO1株を30℃で培養し、培地中の環境汚染物質の経時変化をHPLCおよびGC分析で追跡調査した。環境汚染物質には、1,1-bis(4-hydroxyphenyl)ethane、2,2-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane、1,1-bis(4-hydroxyphenyl)cyclohexane、bis(4-hydroxy)methane、4,4-dihydroxydiphenylsulfone、2-hydroxybiphenyl、4,4'-dihydroxy- biphenyl、biphenyl、4-tert-butylphenol、4-nonylphenol、4-chlorobenzaldehyde、1-naphtholを初発濃度 0.05 - 0.5 mM で使用した。それぞれの分解速度はBPA分解よりも遅く、化合物によっても大きく異なっていたが、ビスフェノール類化合物、ビフェニル類化合物、ナフタレン類化合物など、BPA以外の化合物でも明らかな分解が観察された。一部の環境汚染物質分解では分解産物も検出され、これら分解産物をLC-MS-MS分析やGC-MS分析で同定すると、水酸基の付加が認められ、BPA分解以外の環境汚染物質分解にも$P450_{bisd}$ モノオキシゲナーゼシステムの関与が示唆された。さらに、内在性プラスミドpBAR1の一部を欠失してBPA分解能を失った変異株、AO1L株では、ほとんどの環境汚染物質分解能が消失していた。この結果はpBAR1にコードされた$P450_{bisd}$ モノオキシゲナーゼが環境汚染物質分解に重要であることを示していた。現在、pBAR1の全塩基配列決定と$P450_{bisd}$ モノオキシゲナーゼ以外の環境汚染物質分解に関与する酵素の特定を行っている。

environmental pollutant, cytochrome P450 monooxygenase, bioremediation

講演番号:4C02a06
講演日時、会場:3月25日10:05～ C校舎02会場

Burkholdelia sp. KU-46株の2,4-ジニトロフェノール分解系遺伝子群の取得

Characterization of 2,4-dinitrophenol-degrading genes from *Burkholdelia* sp. strain KU-46.

○高田 健吾、岩木 宏明、長谷川 喜衛（関西大・化学生命工）
○Kengo Takada, Hiroaki Iwaki,Yoshie Hasegawa (Kansai University)

【目的】

2,4-ジニトロフェノール（2,4-DNP）の微生物分解については、グラム陽性細菌で報告されているが、グラム陰性細菌での分解は、当研究室で分離した*Burkholderia* sp. KU-46株が最初の報告である。これまでの研究で、KU-46株は、4-ニトロフェノール（4-NP）を経由する新規経路で2,4-DNPを分解することが明らかとなっている。

今回は、KU-46株による2,4-DNPの分解に関与する遺伝子の解明を目的として、KU-46株の分解経路上に存在する4-NP分解系遺伝子群の取得・解析を試みた。

【方法】

NPMO 遺伝子とその周辺領域の取得： ニトロフェノールモノオキシゲナーゼ（NPMO）を含む置換芳香族化合物水酸化酵素のアミノ酸保存領域よりプライマーを作製し、PCR により NPMO 様遺伝子の増幅を試みた。また、NPMO 様遺伝子の周辺領域の取得は、インバース PCR により行った。

NPMO 様遺伝子の機能解析：NPMO 様遺伝子の機能解析は、相同組み換え法を用いて NPMO 様遺伝子破壊株を造成し、その生育挙動を観察することによって行った。

【結果】

作成したプライマーを用いた PCR により得られた約 500bp の断片は、グラム陽性細菌である *Arthrobacter* sp. JS443 株の 4-NPMO を含む置換芳香族化合物水酸化酵素と相同性を示した。取得した遺伝子が 4-NP の分解に関与していることを確かめるため、相同組み換え法で遺伝子破壊株を造成し、2,4-DNP あるいは 4-NP に対する生育挙動について検討した。遺伝子破壊株を 4-NP を唯一の窒素源とした培地で培養したところ、4-NP は分解されないことがわかった。さらに、2,4-DNP を唯一の窒素源とした培地で培養したところ、4-NP の蓄積が確認された。これらの結果から、取得した遺伝子は、2,4-DNP 及び 4-NP の分解に関与していることが明らかとなった。そこで、NPMO 遺伝子の周辺領域の解析を行うため、約 13.2kb の DNA 領域を取得し、塩基配列を決定した。BLAST X program を用いて、取得した配列中の *orf* を検索したところ、合計 14 個の *orf* の存在が明らかになり、それらの一部は、2,4,6-トリクロロフェノールモノオキシゲナーゼなどの *Cupriavidus necator* JMP134 株の 2,4,6-トリクロロフェノール分解系遺伝子群と高い相同性を示した。現在、これらの遺伝子の機能解析を進めている。

2,4-Dinitrophenol, 4-Nitrophenol,Biodegradation

講演番号：4C02a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ C校舎02会場

嫌気集積培養菌液における*cis*-DCE分解および有機酸生成に及ぼす高濃度水素の影響

Effect of high hydrogen concentration on *cis*-DCE degradation and organic acid production in anaerobic enrichment culture

○宮村 尚明、長谷川 直美、相澤 朋子、岩淵 範之、 安齋 寛[1]、砂入 道夫、矢木 修身[2]（日大・生資科、[1]日大・短生、[2]日大・生産工）

○Naoaki Miyamura, Naomi Hasegawa, Tomoko Aizawa, Noriyuki Iwabuchi, Hirosi Anzai[1], Michio Sunairi, Osami Yagi[2]（Dept. Appl. Bio Sci., Nihon Univ. [1]Bio sci. Jun., Nihon Univ. [2]Dept. Appl. Mole Chem., Nihon Univ.）

【目的】全国各地でクロロエチレン類による地下水・土壌汚染が深刻な問題となっており、コストが低くかつ安全であるバイオレメディエーション技術の開発が注目されている。*Dehalococcoides*属細菌はクロロエチレン類をエチレンにまで完全分解できる唯一の嫌気性微生物として知られているが、完全合成培地での培養が困難であった。我々は、ガラスビーズを添加することにより、乳酸1 mM、L-システインおよびビタミンB_{12}を添加した完全合成培地に、水素100,000 ppmを加えた条件下でシス-1,2-ジクロロエチレン（*cis*-DCE）20 ppmを約2週間でエチレンにまで完全分解できる嫌気集積培養菌液を構築した。しかしながら、この完全合成培地に乳酸 1 mMを添加しない場合においても、水素を高濃度添加することにより*cis*-DCEの完全分解が可能となった。今回は、高濃度水素添加による*cis*-DCE分解のメカニズムを明らかにするため、*cis*-DCE添加および無添加条件下における有機酸の生成、*Dehalococcoides*属細菌の計数、および微生物の群集構造について検討を行った。

【方法】155 ml 容バイアル瓶に MM 改変完全合成培地 81 ml、ガラスビーズを添加し、ブチルゴム栓およびアルミキャップで蓋をして窒素パージを行った後オートクレープ滅菌し、水素 400,000 ppm、集積培養菌液 8 ml を加え、28℃嫌気条件下で静置培養を行った。培養は *cis*-DCE20 ppm を添加した系と添加しない系で行った。*cis*-DCE の分解、有機酸の生成および菌数測定はそれぞれガスクロマトグラフィー、HPLC、Real-time PCR を使用し、菌叢解析は PCR-DGGE 法を用いた。

【結果】*cis*-DCEの分解は14日まで緩やかに分解が進行し、その後急激に分解が促進され、28日目にエチレンへの完全分解が確認された。28日目には水素は、約205,000 ppm消費されており、*cis*-DCEを添加しなかった場合と比べ約40,000 ppm多く消費された。酢酸の蓄積は、*cis*-DCEの添加の有無に関わらず7日目には約35 μmol/bottle蓄積され、それ以降はあまり変化がみられなかった。ギ酸の蓄積は、7日目までに*cis*-DCEの添加の有無に関わらず約10 μmol/bottle蓄積したが、*cis*-DCEを添加した場合は7日目以降にそれ以上のギ酸の蓄積は確認されず、添加しなかった場合は蓄積が継続し28日目に約20 μmol/bottleとなった。クロロエチレンの急激な分解が始まった14日以降にギ酸の蓄積量に変化が認められた。

Dehalococcoides, *cis*-DCE, anaerobic enrichment culture

講演番号：4C02a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ C校舎02会場

ズッキーニによるダイオキシン類の取り込みに係わる遺伝子の同定

Identification of genes related to uptake of dioxins and dioxin-like compounds in zucchini

○乾　秀之[1,2,3]、廣田　又士[2]、山﨑　清志[3]（[1]神戸大・遺伝子、[2]神戸大・農、[3]神戸大院・農）
○Hideyuki Inui[1,2,3], Matashi Hirota[2], Kiyoshi Yamazaki[3]（[1]Res. Ctr. Environ. Genomics, [2]Fac. Agric., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ.）

【目的】ダイオキシン類を含む高脂溶性汚染物質は、低濃度で環境を汚染しているものの、極めて水に溶けにくく微生物による分解を受けにくいため、食物連鎖を通じて上位の動物に高濃度に蓄積され、しかも、地球全体に汚染が拡大することから、世界的な問題となっている。従って、これら低濃度の化学物質による環境汚染を浄化することは極めて重要である。近年、植物を利用した環境浄化法であるファイトレメディエーションが、光エネルギーを利用できることから安価に、しかも広範囲に広がる低濃度の汚染物質を浄化できる方法として注目を浴びている。しかし、植物は一般に高脂溶性の化学物質を、根を介して取り込む効率が低いため、これら汚染物質の浄化には向いていない。一方、ウリ科植物は高脂溶性汚染物質をその他植物種より効率よく取り込むことから、ファイトレメディエーション用植物として有望である。より効率的なファイトレメディエーションを行うために、本研究はダイオキシン類の取り込みに係る遺伝子をウリ科植物の中でも最も取り込み効率の高いズッキーニから取得することを目的とした。
【方法】*Cucurbita pepo* subsp. *ovifera* cv. Patty Green（PG、ダイオキシン類低蓄積品種）、*C. pepo* subsp. *pepo* cv. Black Beauty（BB、ダイオキシン類高蓄積品種）、*C. pepo* subsp. *pepo* cv. Gold Rush（GR、ダイオキシン類高蓄積品種）を４０日間土壌栽培した。根から総RNAを抽出し、cDNAサブトラクション法により低蓄積品種PGと高蓄積品種BBとGRの間でそれぞれ発現量の異なる遺伝子を取得した。RT-PCRによりこれら遺伝子の発現レベルを確認後、発現量の差が大きかった遺伝子のクローニングを試みた。本遺伝子の機能解析のため、ダイオキシン類と結合するアリルハイドロカーボン受容体（AhR）遺伝子とレポーターであるβ－グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子を持ち、ダイオキシン処理によりGUS活性が誘導する形質転換タバコ植物に過剰発現した。AhRのリガンドで、ダイオキシン類の一種であるポリ塩化ビフェニル（PCB）を含む寒天培地において本形質転換タバコ植物を培養し、地上部のGUS活性を測定した。
【結果】cDNAサブトラクションの結果、成熟したメロン果実で発現している遺伝子と類似した遺伝子が高蓄積品種BBとGRに共通して高発現していることが判明した。この遺伝子をクローニングしたところ、ジンクフィンガーモチーフを持つ転写因子であると推測された。本遺伝子をAhRとGUSを持つ形質転換タバコ植物に発現し、PCBを添加した寒天培地で培養した。ベクターコントロール植物に比べ過剰発現体は、葉におけるGUS誘導倍率が有意に高くなった。この結果から、本転写因子はズッキーニによる高脂溶性汚染物質の効率のよい取り込みに係っており、その他の植物に過剰発現することによりその取り込み性能を向上させることができるツールとして利用可能であることを強く示唆している。

zucchini, polychlorinated biphenyls, uptake

講演番号：4C02a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ C校舎02会場

タイトル：塩素化ダイオキシン分解菌*Geobacillus* sp. UZO3株の機能解析
Title：Functional analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin degrading bacteria *Geobacillus* sp. UZO3

○鈴木 悠造、中村 雅哉[1]、大塚 祐一郎[1]、川上 健志[2]、佐藤 かんな、梶田 真也、菱山 正二郎[1]、高橋 惇[2]、片山 義博[3]（東農工大・BASE、[1]森林総研、[2]高砂熱学工業株式会社、[3]日大生資科・森資科）
○Yuzo Suzuki, Masaya Nakamura[1], Yuichiro Otsuka[1], Takeshi Kawakami[2], Kanna Sato, Shinya Kajita, Shojiro Hishiyama[1], Atsushi Takahashi[2], Yoshihiro Katayama[3] (Tokyo University of Agriculture & Technology, [1]Forestry and Forest Products Research Institute, [2]Takasago Thermal Engineering Co. Ltd., [3]Nihon University)

【目的】*Geobacillus* sp. UZO 3株は、最も毒性値の高い2,3,7,8-TCDDを含む複数のダイオキシン異性体を網羅的に汚染土壌中から減少させることが報告された好気高温菌である。本菌の機能解析により、ダイオキシン汚染浄化システムの開発が期待される。近年、我々は、*Geobacillus* sp. UZO 3株の培養細胞から調製したcell free extractが、2,7-DCDDのdiaryl ether結合を順次還元的に開裂する事を明らかにした。検出された分解中間体の構造から、2,7-DCDDのdiaryl ether結合を還元的に開裂する酵素が、これまでに例のない新規のダイオキシン分解酵素であり、glutathione-S-transferaseに類似した還元開裂酵素の一種であることが示唆された(Suzuki et al., *Chemosphere*, 2011)。今回、我々は、*Geobacillus* sp. UZO 3株のcell free extractによる2,3,7,8-TCDDに対する分解能を解析した。

【方法】*Geobacillus* sp. UZO 3株の培養細胞から調製したcell free extractに2,3,7,8-TCDD、または放射性同位体である[U-^{14}C]2,3,7,8-TCDDを加え、65℃で一晩反応し、酵素反応物を酢酸エチルで抽出した。2,3,7,8-TCDD酵素反応物はGC-MS分析により、[U-^{14}C]2,3,7,8-TCDD酵素反応物はTLCで分離後、オートラジオグラフィーにより分解産物の解析を行った。

【結果】2,3,7,8-TCDD分解反応においては、2,7-DCDD分解反応機構と類似した還元型の分解中間体を検出し、化学合成した標品と比較することにより構造を同定した。[U-^{14}C]2,3,7,8-TCDD分解反応においては、放射性の分解産物を複数検出し、化学合成した標品のTLC分析と比較した。

dioxin, 2,3,7,8-TCDD, microbial degradation

講演番号：4C02a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ C校舎02会場

セレン酸還元菌を用いた発電所排水中のセレン処理

Treatment of selenium oxyanions from wastewater in power plant by using a selenate-reducing bacterium

○森田 仁彦、庄司 仁、植本　弘明（電中研）
○Masahiko Morita, Tadashi Shoji, Hiroaki Uemoto (CRIEPI)

【目的】排水中に含まれるセレン化合物の処理を目指し、安価な電子供与体を利用して微生物を用いたセレン処理を検討している。本研究では、セレン酸還元菌を高密度に保持させるためにロックウールを担体として用い、人工排水中でのセレン酸から亜セレン酸への還元処理に関してまず検討を行った。次に、亜セレン酸の吸着能を保有する吸着剤をロックウールに混合して、これにセレン酸還元菌を保持させることで、人工排水からのセレン処理を検討した。さらに、このロックウール充填カラムを用いて、石炭火力発電所の脱硫排水中のセレン処理を試みた。
【方法】容積１Lの円筒形カラムにロックウール100mlを充填し、凝集剤を用いてセレン酸還元菌 *Pseudomonas* sp. 4C-C株をロックウールに付着させた。ポリエチレン袋内に充填したエタノールを徐放させることで、微生物に対する電子供与体の供給を行った。水理学的滞留時間（HRT）10時間で通水を上向きに行い、人工排水中のセレン酸濃度20mg-Se/Lで実験を始めた後、途中で10mg-Se/Lに濃度を下げた。次に、容積150mlの円筒形カラムに亜セレン酸の処理を目的として吸着剤を混合したロックウールを充填し、これにセレン酸還元菌を付着させて、上向流（HRT3.8時間）で通水を行い、セレン酸濃度5mg-Se/Lの人工排水中のセレン処理を検討した。最後に、本システムの実排水への適用性を調べるために、石炭火力発電所の脱硫排水（本システムの処理能力を調べるために、実排水に1mg-Se/L程度となるようにセレン酸を添加）を用いて検討を行った。
【結果】凝集させた微生物懸濁液を円筒形カラムに通水することで、ロックウールに微生物を適切に付着させることが可能となった。セレン酸濃度20mg-Se/Lにおいて、流入セレン酸のほぼ全量が亜セレン酸に還元された。長期安定性を調べるためにセレン酸濃度10mg-Se/Lとして連続運転を行った結果、空調管理の不備による温度制御が不十分だった時を除いて、100日以上の間、流入セレン酸のほぼ全量が安定して亜セレン酸まで還元された。次に、吸着剤を混合したロックウールカラムを用いて検討を行った結果、HRT3.8時間という極めて厳しい条件にもかかわらず、流入したセレン酸は亜セレン酸の蓄積無しに処理され、本システムの高いセレン処理能力を示すことができた。最後に、石炭火力発電所の脱硫排水を用いて本システムの実適用性を評価したところ、実排水中においても流入したセレン酸は亜セレン酸の蓄積無しに良好に処理されており、本システムを実際の排水処理システムに適用できる可能性が示唆された。
【謝辞】ロックウールをご提供してくださった大石徹氏（日鉄環境エンジニアリング株式会社）に深く感謝の意を表します。

wastewater, selenium, power plant

講演番号：4C02a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ C校舎02会場

Al 耐性菌 *Pullulanibacillus* 属細菌 CA42 株の生産する Al 吸着性多糖の機能・構造

Structure and functions of polysaccharide produced by an aluminum-tolerant bacterium, *Pullulanibacillus* sp. CA42

○佐藤准貴，相澤朋子，浦井誠，砂入道夫（日大生資科・応生科）
○Junki Sato, Tomoko Aizawa, Makoto Urai, and Michio Sunairi（College of Bioresource Sciences, Nihon Univ.）

【背景と目的】

東南アジアを中心に広がる酸性硫酸塩土壌(ASS)は、土壌および水圏の pH が 2～4 の強酸性を示す。これにより土壌中のアルミニウムイオンや重金属イオンが溶出して植物に重大な生育阻害を引き起こしている。これまでに我々は ASS においても生育している植物を確認しており、それらは微生物との共生により ASS で適応している可能性がある。

そこで、ASS に適応するカヤツリグサ科植物 *Eleocharis dulcis* からアルミニウムイオン耐性、pH 上昇能、インドール酢酸生産能を有している *Pullulanibacillus* 属細菌 CA42 株を単離した。この CA42 株を酸感受性イネ(IR36)の根に接種し、pH 3.5 で $AlCl_3$ を添加した条件で栽培実験を行ったところ、CA42 株を接種したイネは生育が促進された。この際に、イネの根にバイオフィルム状の物質が見られ、このバイオフィルム状物質がアルミニウムイオンからイネの根を保護している可能性が考えられた。そこで、CA42 株が培地上で生産する多糖(CA42-PS)を菌体から剥離し、$AlCl_3$ 溶液と反応させた結果、多糖を反応させた溶液は溶液中に残存するアルミニウムイオン濃度の減少が見られた。これにより多糖にアルミニウムイオン吸着能がある事が示唆された。

これらを受けて本研究では、CA42 株の生産する多糖の構造の決定を行った。また、CA42-PS のアルミニウムやその他酸性土壌で問題となる重金属の吸着能についても検討を行った。

【方法】

CA42-PSは、菌体を生理食塩水に回収・振盪して多糖を剥離させた後、DNase、RNase処理、フェノール・クロロホルム処理後、透析、凍結乾燥をして精製した。HPLC、NMRおよびメチル化分析により組成分析、構造解析を行った。CA42-PSの金属吸着はICPにより測定した。

【結果】

CA42-PSの組成についてHPLCで調べたところ、糖の構成成分としてGlcのみが検出された。また、メチル化分析・NMRを用いて構造解析をしたところ、主鎖にα1-4結合を持ち、グルコース残基が約10個ごとにα1-6結合を介した側鎖を持つ構造を持つグリコーゲンである事が示唆された。

acid sulfate soil, polysaccharide, aluminum

講演番号：4C02a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ C校舎02会場

芽胞形成水銀還元細菌*Bacillus megaterium* MB1株を用いた固定化微生物による無機水銀溶液からの水銀除去と回収

Mercury Removal and Recovery from Inorganic Mercury Solution by Immobilized Sporulating Mercury Volatilizing Bacterium, *Bacillus megaterium* MB1

○簡　梅芳、今野純平、宮内啓介、遠藤銀朗（東北学院大・工）
○ Mei-Fang Chien, Junpei Konno, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo (Faculty of Engineering, Tohoku-Gakuin University)

【目的】本研究室では環境微生物の持つ汚染浄化能を解明し、その浄化能を利用した汚染環境浄化技術の開発に関する研究を進めてきている。水銀及び水銀化合物は様々な産業において使われてきたが、その高い生物毒性は、環境中の残留や生態系での生物濃縮などの作用を通して、世界的に大変深刻な健康被害及び環境公害問題を引き起こしてきている。既存の水銀による水質汚染に対する効果的で経済的かつ安全な除去・回収技術の開発と適用が必要とされる。環境中には、水銀化合物を分解し毒性の低い金属水銀に変換しかつ除去する微生物（水銀還元細菌）が存在している。本研究では、そのような水銀還元細菌を固定化することにより、水銀汚染水処理に適用できる有効な生物学的水銀除去・回収システムの開発を目的とした。
【方法】試供菌株は、以前水銀に汚染されていた水俣湾の底泥から当研究室で単離した芽胞形成水銀還元細菌*Bacillus megaterium* MB1とした。固定化菌株は、ゲルによる包括固定化法を用いて作成したが、ゲル化材としてアルギン酸カルシウムおよびゲランガムを使用し、それぞれの固定化条件を検討した。固定化菌株による第二塩化水銀を含む溶液からの水銀還元・除去能を、フレームレス原子吸光光度計を用いて評価した。また、反応系における固定化担体の水銀含量の変動を調べ、固定化微生物により水銀汚染水から水銀を回収する可能性を検討した。
【結果】固定化MB1株の第二塩化水銀溶液に対する水銀除去特性を調べた結果、水銀溶液（反応液）の成分および固定化材によって、水銀除去能が異なることがわかった。24時間において、アルギン酸カルシウム固定化MB1株を用いた場合は最大81%、ゲランガム固定化MB1株を用いた場合は最大92%の水銀が40 μMの水銀溶液から除去されたことが確認できた。また、アルギン酸カルシウムゲルの場合、除去された水銀の約50%はゲルに留まっていることが明らかになった。一方、ゲランガム内に留まった水銀はわずか1%以下であり、除去された水銀のほとんどが気化され、放出されたと考えられた。このような固定化水銀還元細菌による水銀除去・回収に関する基礎的知見は、微生物を用いて水銀汚染水を処理する目的と用途に合わせて適切な固定化材を選択するうえで有用と考えられる。本発表では固定化菌体の水銀除去活性の持続性および安定性を長時間にわたって評価した結果も含めて報告したい。

mercury removal, mercury recovery, immobilized bacteria

講演番号：4C02a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ C校舎02会場

高い重金属吸着能を有する環境由来菌の単離

Isolation of microorganisms which can adsorb high heavy metal from the natural environment

○伊東達郎、森　美穂、坂上吉一（近畿大院・農）
○Tatsuro Ito, Miho Mori ,Yoshikazu Sakagami（Kinki University）

【目的】　重金属などの汚染物質除去方法として、低コストで環境に優しい微生物を用いたバイオレメディエーションが注目されている。汚染現場での活用を考えた場合、対象汚染域から汚染物質除去能を有する微生物を効率よく単離できることが望まれる。そこで本研究では様々な培養条件を用いて、河川水中から効率よく重金属吸着能を有する菌を得るための有効な方法を検討した。
【方法】　河川水は大和川 3 か所（上流・中流・下流）から採取し、重金属（Zn、Cd あるいは Pb）添加または無添加の R2A 寒天培地で培養した。終濃度が 10 ppm になるように各重金属を添加した反応系で、単離した菌株の重金属吸着試験を行った。重金属添加直後（0 日後）、3 日後、1 週間後に採取した各試料を遠心分離し、得られた上澄み液中の重金属濃度を原子吸光光度計で測定した。
【結果】　10 ppm の重金属添加培地からの菌株と無添加培地からの菌株の重金属吸着率を比較した場合、無添加培地からの菌株の方が高い吸着率を示した。無添加培地から、50%以上の重金属吸着率を示した菌株が 5 菌株単離され、現在これらの菌株について 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた同定を行っている。

Key words: Bioremediation, heavy metal, microorganisms in the river
講演分類項目：1010　環境保全、浄化技術工学、バイオレメディエーション
　　1020　環境汚染物質

講演番号：4C02a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ C校舎02会場

コーヒー抽出滓を用いたキノコ栽培について

Cultivation of Mushrooms using Coffee Extracted Residues

○渡邉　悟[1,2]、髙橋智美[3]、中村友幸[3]、藤井繁佳[4]　（[1]東京聖栄大、[2]（社）食医同源之会、[3]（株）ハイファ研究所、[4]味の素ゼネラルフーヅ（株））

○Satoru Watanabe[1,2], Tomomi Takahashi[3], Tomoyuki Nakamura[3], Shigeyoshi Fujii[4] ([1]Tokyo Seiei College、[2]Shokuidougen-no-kai、[3]Hypha Institute Co., Ltd.、[4]Ajinomoto General Foods, Inc.)

【目的】コーヒー抽出滓は産業廃棄物であり、従来からその有効利用が望まれている。演者らは今回、カフェインとクロロゲン酸がわずかに残存するコーヒー抽出滓を用いて、キノコ栽培が可能であるとともに、キノコの生産する有用物質の製造が可能であることの検討を目的とした。

【方法】培地基材として、コーヒー豆、コーヒー抽出滓、そしてコナラやアカマツのオガクズを用いた。一般成分は常法により、カフェインとクロロゲン酸の含有量はＨＰＬＣで測定した。キノコとしては、マンネンタケ（*Ganoderma lucidum*）、シイタケ(*Lentinula edodes*)、ヒラタケ(*Pleulotus ostreatus*)、ブナシメジ(*Hypsizigus marmoreus*)、エリンギ(*Pleulotus eryngii*)、サナギタケ(*Cordyceps militaris*)などを対象とした。各種培地基材を湿熱殺菌後、各キノコ種菌を接種して各キノコの生育至適温度で静地培養し、１０日目の菌糸の生育状態を５段階評価した。生育力が強かったマンネンタケにおいては、子実体形成（６ヶ月）まで追跡し、エルゴステロールとガノデリン酸Ａの消長をＬＣ－ＭＳで測定した。

【結果】試したいずれのキノコもカフェイン（89.6 mg%）とクロロゲン酸(5.6 mg%)がわずかに残るコーヒー抽出滓で生育がみられ、米ぬか10%の添加でさらに良い生育がみられた。特にマンネンタケとヒラタケで良い生育がみられ、次いでシイタケ、エリンギが良かった。コナラやアカマツのオガクズよりも生育の良いものもあった。ブナシメジとサナギタケは最も低い生育を示した。コーヒー豆（カフェイン1.45%）では生育が皆無であった。生育がみられたコーヒー抽出滓には灰分が1.1%含まれており、キノコの利用しうる栄養素が残存していたと考えられた。したがって、本実験で用いたコーヒー抽出滓はある種のキノコ栽培の培養基材になり、コーヒー抽出滓の有効利用が考えられた。

さらにマンネンタケにおいては、米ぬか無添加でのコーヒー抽出滓を培養基材として６ヶ月までの長期培養をおこない、子実体形成が観察された。１、２、３ヶ月と生育とともに菌糸体中にエルゴステロール（分子量396）量が多くなり、６ヶ月の子実体中にはガノデリン酸Ａ（分子量516）を含むガノデリン酸類が生成していることを確認した。このことは、コーヒー抽出滓を用いて薬用キノコであるマンネンタケを栽培でき、薬理作用のあるガノデリン酸Ａを含むガノデリン酸類の製造が可能であることを示した。

Keyword：coffee extracted residues, mushrooms, ganoderic acid A

講演番号：4B03a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ B校舎03会場

タイトル　*Candida guilliermondii*の*CGUG_05859*がコードするグルコース耐性キシロースト ランスポーターの性質

Title　Characterization of glucose-tolerant xylose transporterencoded by *CGUC_05859* gene from *Candida guilliermondii*.

○大西裕子[1]、井筒千賀[1]、小笠勇馬[2,1]、香村彰利[2,1]、入江祐司[1]、北田雄祐[1]、古道紗斗里[1]、鈴木秀之[1]（[1]京都工繊大院・工科・応生、[2]京大院・生命・統生）

○ Hiroko Ohnishi [1], Chika Izutsu [1], Yuma Ogasa[2,1], Akitoshi Komura [2,1], Yuji Irie [1], Yusuke Kitada[1], Satori Furumichi[1], Hideyuki Suzuki[1] ([1]KIT, [2]Kyoto Univ.)

【目的】木質や稲わらを加水分解して得た糖液のようにキシロースを多く含む材料から効率的にエタノール生産を行うために、キシロース代謝酵素の遺伝子(*xyl1, xyl2*)を他の酵母から導入した*Saccharomyces cerevisiae* 株が育種されたが、キシロース発酵能は不十分である。原因の一つは、*S. cerevisiae* はグルコーストランスポーターによってキシロースを取り込むので、グルコースによりその取り込みが阻害されるためである。演者らは、*Candida guilliermondii* からグルコース阻害を受けない（あるいは阻害を受けにくい）キシローストランスポーターをクローニングし、*S. cerevisiae* で発現させることができた。今回、このキシローストランスポーターの性質について検討した。

【方法】*Candida guilliermondii* の*CGUG_05859* 遺伝子をクローニングし、*Pichia stipitIis* の *xyl1, xyl2* の導入と*xks1* 遺伝子の発現増強によりキシロース代謝が可能となった*S. cerevisiae*株と、*S. cerevisiae*が持つ全てのヘキソーストランスポーター遺伝子欠失させた株に導入した。^{14}Cで標識したキシロースを用いてトランスポートアッセイを行った。

【結果】上の遺伝子がキシロースの50倍濃度のグルコースを混在させた時でもその取り込み能力を50%以上残すグルコースによる阻害の受けにくいキシローストランスポーターをコードしていることを示した。また、キシロースに対するKm値を求めた。

Keyword :　Bioethanol, Xylose, Pentose metabolism

講演番号:4B03a02
講演日時、会場:3月25日09:11～ B校舎03会場

エタノール発酵性大腸菌KO11株の*pstG*遺伝子と*manXYZ*オペロンを破壊した菌株の発酵特性

Disruption of *ptsG* gene and *manXYZ* operon of ethanol-producing *Escherichia coli* KO11: effects on glucose and xylose utilization and ethanol production

○太田 一良、浜砂 裕則、塚本 淳二、脇山 元気、泉 可也[1]、原田 佳子[1]（宮崎大農・応生科、[1]BITS）

○Kazuyoshi Ohta, Hironori Hamasuna, Junji Tsukamoto, Motoki Wakiyama, Yoshiya Izumi[1], Keiko Harada[1] (Univ. Miyazaki, [1]BITS)

【目的】大腸菌の*pstG*遺伝子の破壊は、カタボライト抑制を緩和することが知られている。本報では、リグノセルロース系バイオマスからのエタノール発酵に適した組換え大腸菌KO11株について、ヘキソースとペントースを同時に利用する菌株の育種を目的として、グルコースの取り込みに関与する*pstG*遺伝子と*manXYZ*オペロンの破壊株を構築し、グルコースとキシロースが共存する培地での発酵特性を検討した。

【方法】大腸菌KO11株を親株して遺伝子破壊株Δ*pstG*、Δ*manXYZ*およびそれらの二重破壊株Δ*ptsG/manXYZ* をRed/ET recombinationにより構築した。これらの菌株をグルコース6.0%(w/v)およびキシロース4.0%(w/v)を炭素源し、カザミノ酸0.25%(w/v)を補充したM9培地に植菌し、30℃で発酵試験を実施した。経時的に発酵液中のエタノール濃度をガスクロマトグラフィー、糖濃度を液体クロマトグラフィーで測定した。また、同条件下で発酵48時間後の破壊株の菌体について関連遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで測定し、KO11株と比較した。

【結果】親株KO11は72時間で初発グルコース濃度の99%とキシロースの13%を消費し、グルコースを優先的に利用した。KO11株による混合糖の発酵は72時間で停止し、主としてグルコースから3.2%(w/v)のエタノールを生成した。一方、破壊株Δ*pstG*、Δ*manXYZ*、Δ*ptsG/manXYZ*は72時間でグルコース消費が42, 78, 35%にそれぞれ減少し、キシロース消費は50, 32, 32% にそれぞれ増大した。大腸菌におけるキシロース代謝はグルコース代謝に比べて遅いため、グルコースとキシロースを同時に発酵するこれらの破壊株Δ*pstG*、Δ*manXYZ*、Δ*ptsG/manXYZ*は、120時間で3.1、 3.4、2.5%(w/v)のエタノールをそれぞれ生成した。本条件下での消費糖に基づくエタノール収率は、親株および破壊株で91%以上であった。遺伝子の破壊に伴いΔ*pstG*株では*manX*、*malX*、*glk*、*xylA*遺伝子の転写量はKO11株の2.83、2.76、2.49、2.70倍にそれぞれ増大した。このΔ*pstG*株におけるキシロースイソメラーゼ遺伝子*xylA*の高い転写量は、キシロースの速い消費速度を反映しているものと考察された。一方、Δ*manXYZ*株では*pstG*遺伝子の転写量は1.26倍と大きく増大しなかった。このことからΔ*manXYZ*株ではKO11株と同様にグルコースは主としてPtsGにより取り込まれるものと推察された。Δ*ptsG/manXYZ*株では*glk*遺伝子の転写量が1.91倍を示し、グルコースの取り込みにグルコキナーゼ(Glk)の関与が示唆された。

Escherichia coli KO11, *manXYZ*, *ptsG*

講演番号：4B03a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ B校舎03会場

ユビキチン欠損*Saccharomyces cerevisiae*変異株によるD-乳酸からのエタノール生産

Ethanol production from D-lactic acid by ubiquitin-deletion mutants of *Saccharomyces cerevisiae*

○若松　誠、田口久貴、木田建次[1]、赤松　隆（崇城大・生物生命、[1]熊大院・自然科学）
○Makoto Wakamatsu, Hisataka Taguchi, Kenji Kida,[1] Takashi Akamatsu (Sojo Univ., [1]Kumamoto Univ.)

【目的】本研究室で使用している実用酵母NAM34-4C株は耐熱性、耐酸性であり、低pHの条件でD-乳酸からエタノール生産できる酵母である。これまでの実験で、解離型乳酸輸送タンパクであるJEN1を構成化させると顕著なエタノールを生産し、野生株の約2倍のエタノール生産を示した。一方、JEN1を欠損させると、野生株の生産されるエタノール量の約4分の1量に低下することがわかっている。そこで本実験ではJEN1分解に関わっていると思われるユビキチンをそれぞれ欠損させ、エタノール生産への影響について調べた。
【方法】D-乳酸定量は、メガザイム社製DL-乳酸定量キットにより行った。エタノール定量はガスクロマトグラフィーで行い、分析カラムは、TSG-1（Shincarbone 60/80）を用いた。酵母の形質転換には酢酸リチウム法を用いた。
【結果】まず、ユビキチン遺伝子（*UBI1, UBI2, UBI3, UBI4,*）破壊株の構築を行った。G418耐性遺伝子（*Kanmx*）を、各ユビキチン遺伝子の開始コドンと終止コドンを含む40塩基の相同配列を付与したプライマーでPCR増幅した。各断片をNAM34-4C株に移入し、相同組換えさせ、*UBI1*欠損のG418耐性株が9株，*UBI2*欠損の418耐性株が23株，*UBI3*欠損の418耐性株が1株，*UBI4*欠損の418耐性株が30株得られた。そのG418耐性株の遺伝子構成をPCRとシーケンスによって調べると、設計通りに構築できた株は*UBI1*欠損株と*UBI4*欠損株だった。再度*UBI3*欠損株の構築を開始コドンより500bp上流のプライマーに換えて形質転換を行い、G418耐性株が40株得られ、PCRとシーケンスで設計通りに構築できたことを確かめた。*UBI2*欠損株については今、遺伝子構成について調べている最中なので*UBI2*欠損株を除く欠損株と野生株を比較するため発酵試験を行った。増殖は野生株と比べ、*UBI1*欠損株と*UBI3*欠損株の増殖の立ち上がりが遅く、*UBI4*欠損株はOD660 nmの12から増殖が停止した。乳酸消費では、野生株と比べ、*UBI4*欠損株の乳酸消費度は速いが乳酸を約8割消費すると乳酸消費しなくなった。*UBI1*欠損株と*UBI3*欠損株の乳酸消費は野生株と比べて乳酸消費速度の遅れが認められた。エタノール生産では野生株と比べて*UBI1*欠損株と*UBI4*欠損株のエタノール量が多く、一番エタノール生産された*UBI4*欠損は野生株のエタノール量の約1.7倍多いエタノール生産が認められた。*UBI3*欠損株は野生株と比べてエタノール量が減り、約2分の1に減少した。この結果より、一番エタノール生産に影響があった株は*UBI4*欠損株だった。そこで現在、*UBI4*欠損株とJEN1構成化させた株を掛け合わせによって作成し、発酵試験によりエタノール生産が増加するかを確かめている。

Bioethanol, Ubiquitin, D-lactate

講演番号：4B03a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ B校舎03会場

エタノール生産性 *Sphingomonas* sp. A1 株によるアルギン酸からのバイオエタノール生産過程

Process of the ethanol production from alginate by ethanologenic *Sphingomonas* sp. A1

○藤井麻理、柳澤満則、河井重幸、村田幸作（京大院農・食品生物）
○Mari Fujii, Mitsunori Yanagisawa, Shigeyuki Kawai, Kousaku Murata (Grad. School of Agric., Kyoto Univ.)

【背景】藻体量が豊富で顕著な成長速度を示す褐藻類は、有望な海洋バイオマスである。狭隘な国土面積しか持たぬ一方で広大な排他的経済水域に恵まれた我が国においては、海洋バイオマス、とりわけ褐藻類主要成分（アルギン酸やマンニトールなど）のバイオエタノールなど有用物質への変換技術の確立が急務である。しかし、褐藻類の主要成分、就中アルギン酸の有用物質への変換が困難と見なされており、褐藻類利用の大きな律速となっていた。最近、当分野により、エタノール生産性 *Sphingomonas* sp. A1 株 (エタノール生産性 A1 株) による 5 % (w/v) アルギン酸からの 1.3 % (w/v) バイオエタノールの生産が達成され [1)]、褐藻類からのバイオエタノール生産の実用化が現実味を帯びてきた。本研究では、さらに高濃度のバイオエタノール生産を目指し、エタノール生産性 A1 株によるアルギン酸からのエタノール生産過程を詳細に調べた。

【結果】エタノール生産性 A1 株は、A1 株に *Zymonomas mobilis* 由来ピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) 遺伝子およびアルコール脱水素酵素 (ADH) 遺伝子を導入した株である [1)]。本株は通常、培養 1 日目から 2 日目にかけて増殖しつつ著量のエタノールを生産し、培養 3～4 日目で増殖とエタノールの生産を停止する [1)]。まず、本株のエタノール生産過程における生菌数を追跡したところ、発酵 3 日目以降に生菌数が急激に低下することが分かった。さらにこの生菌数の低下は、導入した PDC および ADH 遺伝子に起因した。一方、褐藻類主要成分からのエタノール生産を想定し、5 % (w/v) マンニトール存在下におけるアルギン酸からのエタノール生産を追跡したところ、マンニトールが生菌数の急激な低下を抑制することが分かった。しかし、マンニトール存在下において、生菌数ならびに PDC および ADH 活性が維持されていたにも拘わらず、エタノール生産性は上昇しなかった。また、発酵 3 日目の培養液上澄み液は、A1 株の生育を阻害したが、透析した同培養液上澄みは阻害しなかった。以上の結果から、アルギン酸からのエタノール生産過程において、エタノール生産に阻害的に作用する何かが培地中に分泌される可能性が考えられた。本研究は、最先端・次世代研究開発支援プログラムの助成により行われた。

[1)] Takeda *et al. Energy & Environ. Sci.*, **4**:2575-2581 (2011).

alginate, bioethanol, *Sphingomonas*

講演番号：4B03a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ B校舎03会場

出芽酵母のマンニトール資化能とフロキュレーション能の自然獲得

Natural acquisition of both abilities to utilize mannitol and exhibit flocculation by budding yeast

○河井重幸、太田安里、柳澤満則、村田幸作（京大院農・食品生物）
○Shigeyuki Kawai, Anri Ota, Mitsunori Yanagisawa, Kousaku Murata (Grad. School of Agric., Kyoto Univ.)

【背景】海洋バイオマスからのエタノールの生産法を実用化するには、褐藻類主要成分マンニトールからのエタノール生産技術の確立が望まれる。酵母は優れたエタノール生産系であるが、酵母によるマンニトールの代謝やエタノール生産に関しては、未だ不明点が多い。少なくとも世界中で頻用されている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288C 株ならびにその派生株はマンニトールを資化しない。一方、同株はフロキュレーション能(互いに凝集し、フロックと呼ばれる凝集体を形成する能力)も示さない。フロキュレーション能を示す酵母は、迅速かつ低コストで反応液から回収することができるという優れた特性のため、ビール醸造の分野では古くから重要視されている。さらに、バイオエタノールの生産や重金属の回収といった様々な分野への応用も期待されている。一方で、フロキュレーション能は、侵入的増殖能 (寒天培地の中への侵入的な増殖能) や病原性真菌の感染能とも関係する。

【結果】出芽酵母 *S. cerevisiae* BY4742 株 (S288C 派生株)が、低頻度で自然に、遺伝子組換え技術を施すこと無しに、マンニトール資化能と Ca^{2+}依存フロキュレーション能の両方を獲得することを見出した。すなわち、同酵母に両能力を賦与する技術を開発した。当該酵母は侵入的増殖能も獲得した。BY4742 株以外の一倍体酵母 7 株 (BY4741、DBY877、SEY6210、T8-1D、EBY100、YPH500、および AH109 の各株) へのマンニトール資化能とフロキュレーション能ならびに侵入的増殖能の賦与も可能であった。さらにマンニトール資化能とフロキュレーション能を獲得した接合型の異なる一倍体酵母同士の接合により、両能力を保持した二倍体酵母株が作製された。S288C 株がフロキュレーション能を示さない理由は、転写因子 *FLO8* へのナンセンス変異 (G425A) とされているが、マンニトール資化能とフロキュレーション能を獲得した BY4742 株由来の株 (MK3619 株および MK3683 株) も *FLO8* にナンセンス変異 (G425A) を保持していた。すなわち、獲得したフロキュレーション能は *FLO8* 非依存性であった。MK3619 株および MK3683 株は、2.0% (w/v)のマンニトールから各々0.90% (w/v) [転換率 89%] および 0.31% (w/v) [同 30%] のエタノールを培養 3 日間で生産した。以上の知見は、褐藻類主要成分マンニトールからのバイオエタノール生産の実用化に寄与し、有用酵母へのフロキュレーション能の賦与をも可能にする。また、マンニトール資化能とフロキュレーション能を獲得した酵母は、酵母株による両能力発揮の分子基盤の解明、さらには病原性真菌の感染能獲得機序の理解などにも資すると期待される。本研究は、最先端・次世代研究開発支援プログラムの助成により行われた。

mannitol, flocculation, bioethanol

講演番号：4B03a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ B校舎03会場

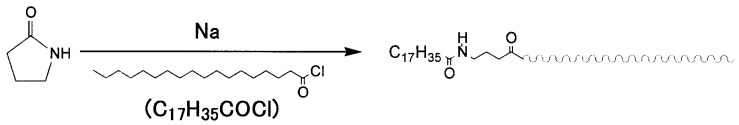
ポリアミド４の生分解性制御

Development of nonbiodegradable polyamide 4

○山野　尚子、川崎　典起、中山　敦好（産技総研関西セ）
○Naoko Yamano, Norioki Kawasaki, Atsuyoshi Nakayama (AIST Kansai)

【目的】ポリアミド４はナイロンの1種であり高性能プラスチックだが同時に生分解性を持つ[1)]。生分解性は用途によっては環境低負荷材料として長所になるが、一方長期安定性を求められる用途では実用化を阻む要因となる。そこでポリアミド4の物性を維持しつつ生分解を制御する技術を検討した。

【方法】塩基性触媒にてポリアミド４のモノマーである 2-ピロリドンを活性化させ、n-ヘキサン中にて長鎖脂肪酸塩化物を開始剤として開環重合を行い、末端に長鎖脂肪酸を持つポリアミド４を合成した。導入した脂肪酸はアセチル基からステアロイル基（C2, C3, C6, C10, C12, C14, C16, C18）である。合成したポリマーの生分解性はポリアミド４分解菌および活性汚泥を用いて評価した。1%の各種ポリマー粉末を分散させた培地（培地組成：0.06 mM $MgSO_4$, 0.25 mM $CaCl_2$, 3.72 mM $FeCl_3$, 0.3 mM $(NH_4)SO_4$, 0.125 mM KH_2PO_4, 0.25 mM K_2HPO_2, 0.25 mM Na_2HPO_4, 0.064 mM NH_4Cl）に 2%寒天末を加え平板培地を作成した。ポリアミド４分解菌 *Pseudomonas* sp.ND-11 株[1)]を上記の平板培地で培養（37℃、7 日）ハロー形成の有無により生分解性を判定した。JIS K6950 に記載されている無機培地に各種ポリマー粉末を分散させ、BOD 測定装置（タイテック, BOD tester 200F）を用いて JIS K6950 に準拠した方法にて生分解に伴う酸素消費量を測定することにより生分解試験を行った。微生物源としては標準活性汚泥(化学物質評価研究機構)を使用した。



ステアロイル末端(C18)を持つポリアミド４の合成

【結果】上記合成方法で各種脂肪酸末端を持つポリマー（分子量、Mn 5.3～14.7 x 10^3, Mw 14.8～66.2 x 10^3）が得られた。ステアロイル基(C18)末端を持つポリアミド４粉末を含む平板培地では、ポリアミド４分解菌はハローが形成されず、生分解性が失われることがわかった。炭素数の異なる脂肪酸について比較したところ、C6 まではクリアなハローが確認できるが、C10 より炭素数が多いポリマーではハローの形成が見られなくなり、炭素数により生分解性が制御できる可能性が示された。活性汚泥を用いた生分解試験でも炭素数に応じて生分解性が抑制される結果が得られ、末端に長鎖脂肪酸を付加することにより生分解性を制御できることを見出した。また、生分解性を示さないステアロイル基末端を持つポリアミド４をポリアミド４にブレンドした場合もその比率に応じて生分解性を抑制制御することが出来た。

1)Yamano *et al*, J.Polym.Environ., 16, 141(2008)

biobase, polyamide, biodegradable

講演番号：4B03a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ B校舎03会場

ブドウの枝・葉におけるポリフェノール類の分布

Distribution of polyphenols in Grape Leaves and Stem

○沼田 大志、坂本 正弘、北島 宣、東 順一（京大院農）
○Motoshi Numata, Masahiro Sakamoto, Akira Kitajima, Jun-ichi Azuma (Kyoto Univ.)

【目的】

ブドウ（*Vitis* spp. ）はブドウ科・ブドウ属に属する落葉性のつる性植物であり、ワインの原料にも利用され、世界中で多く栽培されている。また、ブドウには抗酸化性などの効果が期待されるポリフェノール類が多く含まれており、薬用や健康食品にも利用されている。しかし、ブドウの栽培過程において排出される剪定枝、摘房・摘粒果実は、ほとんどが廃棄物として処理されており、その量は相当なものになっている。そこで、本研究ではこれらの廃棄ブドウバイオマスを有効利用するために必要と考えられる基礎的研究をおこなった。ブドウの枝・葉に着目し、そこに含まれるポリフェノール類（ポリフェノール、縮合型タンニン、フラボノイド）の量とともに、その分布と傾向を分析した。

【方法】

試料としては､京都大学高槻農場で栽培されているブドウ(巨峰:*V. vinifera* × *V. labrusca*; *Kyoho*)より長さ約30 cmの新しい枝を2011年9月7日に採取した。このブドウの枝から一枚ずつ葉を切り離し、枝を一節ごとに分割した。それらを凍結乾燥し粉砕後、60%エタノールを加え48時間攪拌して抽出をおこなった。その後、各抽出溶液についてポリフェノール量、縮合型タンニン量、フラボノイド量を比色定量法によりそれぞれ測定した。ポリフェノールの測定では没食子酸を、縮合型タンニン、フラボノイドの測定では (＋)-カテキン水和物を、標準物質としてそれぞれ用いた。測定量は各試料の乾燥重量に含まれる割合で表した。また、比較検討試料として、異なる長さの枝、巨峰の果実と剪定枝についても同様に分析した。

【結果】

葉においては、ポリフェノール量は先端ほど高い値を示した。縮合型タンニン量とフラボノイド量は、先端に近い1節目の葉から4節目あるいは6節目の葉にかけて増加するが、さらに先端から離れると減少していく傾向が認められた。枝においては、これら3成分の量はいずれも先端部分ではなく、1節目から3節目にかけて最も多くなっていた。ポリフェノール量は先端から離れるに伴い減少していく傾向であったが､縮合型タンニン量とフラボノイド量については減少後やや増加する傾向が認められた。場所的に近いところにある枝と葉において、3成分の値がほぼ一致するということはなく、全体的に葉の方が枝より高くなった。枝と葉の増減傾向は、ポリフェノールについては類似していたが､縮合型タンニンとフラボノイドについては異なっていた。全体的な傾向としては、成熟果実や剪定枝よりも枝・葉の方が値は高かった。今回の結果からブドウの新しい枝におけるポリフェノール類の分布傾向に関する情報が得られた。

grape, polyphenols

講演番号：4B03a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ B校舎03会場

タイトル　トウモロコシ果皮の化学的性質
Title　Chemical properties of corn pericarp
○吉田　有希、坂本　正弘、東　順一（京大・農）
○Tomoki Yoshida, Sakamoto Masahiro, Jun-ichi Azuma (Kyoto univ.)

【目的】トウモロコシは、世界で大量に生産されており、世界三大食物のひとつである。トウモロコシは熱帯起源の植物であるが、長い栽培の歴史の中で世界各地の品種を交配し、様々な生育環境に適合したものが開発されている。そのため、トウモロコシには多くの品種が存在し、甘味種、爆裂種、馬歯種、硬粒種、もち種、軟粒種、有ふ種の7種に分類される。トウモロコシの果皮は果実内の物質を保護するため、その環境ストレスに耐性を持っていると考えられる。環境ストレスから植物体を守る機能は、果皮最外層に存在するワックス及びクチクラ層の寄与するところが大きいとされているが、トウモロコシ果皮のワックス含量は非常に少なく、クチクラ層の堆積はスダンⅢ染色においても確認できなかった。そのため、果皮表層に存在する細胞壁層が環境ストレスへの防御機構として大きく寄与していることが考えられた。そこで、今回はトウモロコシ果皮の組成及び細胞壁主成分である多糖に関して品種間の差を検討した。
【方法】トウモロコシ果実を蒸留水に一夜浸漬後、縦にカットし果皮を剥離した。剥離した果皮は果実の上半分の部位を切り出し、オートクレーブ処理（121 ℃, 1 h）後、蒸留水で水洗し、凍結乾燥させたものを実験に使用した。甘味種（2種）、爆裂種（2種）、馬歯種（2種）、硬粒種（1種）、もち種（3種）、合わせて10品種における果皮の組成分析（タンパク含量、脂質含量、灰分含量、糖含量、ウロン酸含量、でんぷん含量、βグルカン含量）と中性糖組成分析を行った。また、多段階抽出（90 % DMSO抽出、0.02 M CDTA抽出、0.05 M Na_2CO_3、4 % KOH、24 % KOH）により、トウモロコシ果皮から抽出された多糖の組成分析を行った。
【結果】トウモロコシ果皮は、いずれもタンパク含量（2.9-5.5 %）、脂質含量（4.9-12.1 %）、灰分含量（0.4-1.1 %）、糖含量（81.6-94.6 %）、ウロン酸含量（4.9-9.6 %）、でんぷん含量（0.7-3.5 %）にあり、品種間に特筆すべき差異は認められなかった。トウモロコシ果皮に含まれる多糖は、グルコース（18.8-29.7 %）、キシロース（39.8-44.7 %）、アラビノース（21.5-31.2 %）から構成されており、主にセルロースとアラビノキシランから成ることが推察された。しかし、甘味種の1品種のみ他の品種（0.0-0.2 %）と比較してβグルカン含量が3.2 %と高いことが分かった。また、爆裂種のみが他の品種と比較してガラクトースの含量が高かった。多段階抽出で得られた多糖の組成分析の結果、トウモロコシ果皮の多糖は、主に4 % KOH画分に抽出され（53.8-65.2 %）、1.4-1.6残基のキシロースあたり1残基の割合でアラビノースが結合しているアラビノキシランを主成分とする多糖であることが明らかとなった。これらの結果から、果皮の主要構成多糖であるアラビノキシランが、果実内の物質を保護する機能に重要な役割を果たしていることが推察された。

Keywords; Corn pericarp, Arabinoxylan

講演番号：4B03a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ B校舎03会場

リコンビナントキチナーゼ分泌大腸菌を用いた発酵法によるキチンの糖化

Saccharification of chitin by fermentation method using recombinant chitinase secreting *Escherichia coli*

○源 崇光[1], 井坂 恵理子[2], 平野 貴子[2], 袴田 航[1,2], 西尾 俊幸[1,2]([1]日大院生資科・生物資源利用, [2]日大生資科・生命化)

○ Takamitsu Minamoto[1], Eriko Isaka[2], Takako Hirano[2], Wataru Hakamata[1,2], Toshiyuki Nishio[1,2]([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci., Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】エビやカニ、昆虫などの外骨格の主成分であるキチンは、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)がβ-1,4 グリコシド結合で連なった多糖であり、セルロースに次いで 2 番目に多く存在する豊富なバイオマス資源である。しかし、その多くが利用されずに廃棄されている。キチンの加水分解により得られるキチンオリゴ糖は、機能性食品として期待されている。現在、それらの生産法は化学法が一般的であるが、環境汚染や副産物生成などの様々な問題点が挙げられている。そこで我々は、酵素糖化法によるキチン糖化を検討した。しかし、この方法によるキチンオリゴ糖生産は、より環境への負荷が少なく効率的な製造方法ではあるが、キチンが強固な結晶構造であることから、酵素分解を受けにくく反応中に酵素が失活してしまうため、大量の酵素が必要となる。そこで、連続的に新しい酵素を生産しながらキチン分解を行う発酵法が良いのではないかと考えた。そして我々は、リコンビナントキチナーゼを大量に生産・分泌し、キチン分解物である$(GlcNAc)_2$に対する資化性が低い大腸菌 K-12 株由来 HMS174(DE3) / pVP-chi 株を作製し、本菌を用いて発酵法によるキチン糖化を試みた。

【方法・結果】大腸菌K-12株由来HMS174(DE3)株を$(GlcNAc)_2$を含む培地で培養し、経時的に培養液のサンプリングを行った。サンプリングした培養液を遠心分離後、上清を回収しTLCにより残存$(GlcNAc)_2$を確認した。その結果、本菌は$(GlcNAc)_2$資化能が極めて低いことがわかった。このことから、本菌を用いてキチン糖化を行うために、リコンビナントキチナーゼ生産・分泌用プラスミド(pVP-Chi)を本菌に形質転換して培養し、コロイダルキチン含有寒天培地に植菌したところ、クリアゾーン形成を確認することができた。そして、本菌を用いてβ-キチンを基質として発酵法によるキチンオリゴ糖生産の検討を行った。β-キチン含有LB培地で本菌を培養し、誘導物質としてLactose,IPTGをそれぞれ添加した。その後さらに培養し、経時的に培養液のサンプリングを行った。サンプリングした培養液は、キチンを除去後遠心分離し、上清を回収しTLCにより蓄積している$(GlcNAc)_2$を確認した。また、TLCのスポットから濃度を算出し、定量も行った。その結果、IPTGを添加した場合に安定的に$(GlcNAc)_2$を得ることができた。さらに、$(GlcNAc)_2$を精製するため同じ方法（IPTG添加）を用いてβ-キチン（4 g）糖化を行い、培養上清を活性炭カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーに供し、精製したところ$(GlcNAc)_2$の収量は665,3 mg（重量収率16,63%）であった。

chitin saccharification, recombinant chitinase, fermentation method

講演番号：4B03a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ B校舎03会場

好熱菌発酵産物による脱窒過程のDGGE解析

DGGE analysis of denitrifying bacteria in soil amended with thermophile-fermented compost

○ 石川 一人、宮本 浩邦[1, 2]、井藤 俊行[3]、児玉 浩明
（千葉大・院、[1]日環科学、[2]三六九、[3]京葉プラント）
○ Kazuto Ishikawa, Hirokuni Miyamoto[1, 2], Toshiyuki Ito[3], Hiroaki Kodama
(Chiba Univ., [1]Japan Eco-science Co., [2]Miroku Co., [3]Keiyo Plant Engineering Co.)

好熱菌発酵産物とは、小エビ・カニ・小魚等の未利用海産資源を好熱菌により発酵させて製造した農業用資材（以下、発酵産物とする）である。当研究室では、有機系たい肥のモデル系として当該発酵産物を用い、これらを土壌に施用した際の農作物の性状に与える影響について解析してきた。その結果、発酵産物を施用した土壌では、発酵産物中の脱窒作用によって大幅に硝酸態窒素が減少し、それに伴い作物中の硝酸含量が減少することがわかった。

そこで本研究では、発酵産物中の脱窒菌が土壌中の菌相へ与える影響と脱窒との相関を調べることを目的として実験を行った。亜硝酸還元酵素（nirS、nirK）プライマーによるDGGE解析の結果、発酵産物投与区では脱窒反応が盛んに行われている期間に特異的なバンドが検出され、脱窒反応が収まった後も継続してバンドの存在が確認できた。これら発酵産物由来のnir-DGGEバンドの配列を解析しBLASTにて配列相同性を比較したところ、PGPR効果を持つ土壌細菌の亜硝酸還元酵素と高い相同性を有することが明らかになった。

denitrification, DGGE, compost

講演番号:4B03a11
講演日時、会場:3月25日11:10～ B校舎03会場

米糠からの高純度タンパク質・リンの連続回収

Recovery of high-purity proteins and phosphorus compound from rice bran

○渡辺　昌規、千原　尚、佐々野　和雄[1]（広国院大院工・物質工、[1]食協）

○Masanori Watanabe, Nao Chihara, Kazuo Sasano[1] (Dept. Matter. Sci. & Eng., Grad. Sch. Eng., Hiroshima Kokusai Gakuin Univ., [1]Shokkyo Co., Ltd.)

【目的】現在、日本における米糠の生成量は、年間約85万トン（平成20年度）に達し、純国産のバイオマス資源としての利活用が期待されている。しかしながら、精米時に生成した米糠は一部で利活用が行われているが、その殆どは、廃棄物として処理されており、その利活用技術の開発が求められている。

そこで本研究では、米糠に著量含有するタンパク質及びリンを有用物質、あるいは資源として、連続的に回収可能なプロセスの開発を目的とし、タンパク質及びリンを連続的に回収することによる回収タンパク質の高純度化の可能性、単一プロセスからタンパク質・リン双方の産物が回収可能なシステムの構築を念頭に検討を行った。また、タンパク質精製時に用いられる試薬類の使用を低減する為のアプローチについても併せて検討を行った。

【方法・結果】機械脱脂米糠、通常の米糠の双方を供試サンプルとし、弱酸性下において、リン酸、マグネシウム、カルシウム等をイオン化による可溶化・抽出後、アルカリ条件下において不溶性リン酸塩の回収を行い、得られた上清をタンパク可溶性画分とした。その後、タンパク可溶画分をｐＨ調整による等電点沈殿により回収、さらに電解水による洗浄を組み合わせた、IEP/EW(Iso electric precipitation/Electrolyzed water)タンパク質回収・洗浄法により、画分中のタンパク質含量50%超の画分の回収に成功した。さらに、アルカリ可溶性画分のｐＨ値を段階的に調整する事により、タンパク含量70%を超える画分を得る事が可能となった。

また、回収されたリン画分の走査型電子顕微鏡・エネルギー分散型Ｘ線分析装置(SEM/EDS)による元素分布解析を行った結果、リン含量15% (v/v)を示すとともに、カドミウム、鉛等の重金属類は検出されなかった。以上の検討により、有機溶媒、緩衝剤、界面活性剤等に依存しない米糠からの高純度タンパク質・リン双方回収が可能となった。

本研究は、平成23年度（財）サタケ技術振興財団助成金による「米加工副産物からの有価資源回収に関する研究」の一環として行ったものである。

rice protein, rice bran, phosphorus

講演番号：4B03a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ B校舎03会場

合成ガス資化性好熱性細菌*Moorella thermoacetica*の遺伝子組換えマーカー遺伝子の探索

Screening of marker gene for transformation of *Moorella thermoacetica*

○岩﨑　祐樹、喜多　晃久[1]、酒井　伸介[2]、矢野　伸一[1]、村上　克治[1]、高岡　一栄[2]、田島　誉久、加藤　純一、中島田　豊（広島大院先端物質・分子生命、[1]産総研・バイオマス研セ、[2]三井造船・千葉技術開発セ）

○Yuki Iwasaki, Akihisa Kita[1], Shinsuke Sakai[2], Shinichi Yano[1], Katsuji Murakami[1], Kazue Takaoka[2], Takahisa Tajima, Junichi Kato, Yutaka Nakashimada (Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [1]BTRC, AIST, [2]Mitsui Engineering & Shipbuilding Co. Ltd.)

【目的】*Moorella*属細菌は、合成ガス（H_2＋CO_2＋CO）からの物質生産における宿主として有望であることから、当研究室において、合成ガスからエタノールを生産する*Moorella* sp. HUC22-1株を単離した。しかし、エタノール生産性が低く分子育種が必要となったが、遺伝子組換え技術が開発されていなかった。そこで、ゲノム情報が公開されている*Moorella thermoacetica* ATCC39073株をモデル株として、栄養要求性を利用した遺伝子組換え技術の開発を試みた。その結果、ATCC39073株のorotidine-5'-phosphate decarboxylase遺伝子（*pyrF*）を破壊して得られた、5-fluoroorotic acid耐性を示すウラシル要求性変異株（*ΔpyrF*株）を宿主として利用した異種タンパク質発現に成功した。しかし、HUC22-1株およびATCC39073株で簡便に遺伝子組換えを行うには、抗生物質耐性遺伝子などのマーカー遺伝子が必要になると考え、今回、ATCC39073株に使用できる抗生物質耐性遺伝子の探索を行った。

【方法および結果】まず、ATCC39073株の各抗生物質に対する感受性を調べたところ、カナマイシン200 μg/ml、クロラムフェニコール15 μg/ml、エリスロマイシン10 μg/mlの各抗生物質濃度で感受性を示すことが分かった。この結果から、好熱性菌での成功例がある*Streptococcus faecalis*由来の耐熱性カナマイシン耐性遺伝子（*kan*^{r}）をマーカー遺伝子候補として選択した。本マーカー遺伝子にATCC39073株の持つglycelaldehyde-3-phosphate dehydrogenase遺伝子のプロモーターおよびSD配列を付加し、*ΔpyrF*株の染色体上に挿入した。得られた*kan*^{r}挿入株および野生株を200および300 μg/mlのカナマイシンを含む培地で培養したところ、*kan*^{r}挿入株のみ増殖することが確認された。現在、この耐熱性カナマイシン耐性遺伝子を利用してATCC39073株およびHUC22-1株へ外来遺伝子を導入するためのシャトルベクターの構築を行っている。

syngas, *Moorella thermoacetica*, genetic marker

講演番号：4B03a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ B校舎03会場

メタ発酵：化成品生産のための解放複合培養系を用いた新規手法

Meta-fermentation：novel method for pure chemical production using of open-mixed culture system

○プラモド　ポウデル、松本　寛子、奥川　友紀、宮本　浩邦[1]、酒井　謙二（九大院生資環・生機科、[1]日環科学株式会社）

○Pramod Poudel, Hiroko Matsumoto, Yuki Okugawa, Hirokuni Miyamoto1 and Kenji Sakai (Grad Sch. Biores. & Bioenvironl. Sci. Kyushu University, 1Japan Eco-Science, Co. Ltd.)

We introduced concept of “Meta-fermentation” to describe fermentation production of chemicals by controlled mixed culture system. Meta-fermentation under open and mixed culture conditions is useful for biotransformation of organic wastes to valuable materials. Marine animal resource compost (MAR-compost) was used as a mixed culture seed under open and mixed culture conditions. Thermophilic open-mixed culture system have some advantages like efficient transformation of multiple substrates, no need of sterilization, degradation of active thermolabiles, low facility cost and insusceptible to contamination. In addition, thermophilic mixed -culture system has been of great interest, principally in regard to their potential in L-lactic acid production using cheaper substrates like municipal food waste. Optically pure L-lactic acid can be polymerized to form a biodegradable and recyclable polyester poly-L-lactic acid, a material for bio-plastic which can be a potential substitute for petroleum in future. Besides, we focused on the effect of thermophilic temperatures on the production of pure chemicals from food waste under open condition. So, we optimized different thermophilic fermentation temperature conditions specially emphasizing on the maximum productivity of L-lactic acid under anaerobic condition. We obtained an average of 0.27 g/L per hour, 0.32 g/L.h and 0.21g/L.h of L-lactic acid productivity at 45℃, 50℃ and 55℃ respectively. The optical purity exceeded 99.6% at 45℃, 50℃ and 55℃. Change in microbial community during the entire fermentation period at different thermophilic temperatures was analyzed using DGGE. Sequence of 16S rRNA gene obtained from DGGE analysis, revealed that, *Bacillus coagulans* was predominantly distributed throughout the fermentation period at 55℃.

Meta-fermentation, L-lactic acid production, thermophilic mixed bacterial culture

講演番号:4A04a01
講演日時、会場:3月25日09:00～ A校舎04会場

*Melaleuca leucadendra*からのtestosterone 5α-reductase阻害物質の探索

Isolation of Testosterone 5α-Reductase Inhibitor from *Melaleuca leucadendra*

○伊秩　誠志、Maria Dewi P. T. Gunawan Puteri、加藤　英介、川端　潤（北大院農）
○Satoshi Ijichi, Maria Dewi P. T. Gunawan Puteri, Eisuke Kato, Jun Kawabata (Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ.)

【目的】脱毛症にはいくつかの原因があるが、その中でも男性型脱毛症(Androgenetic Alopesia；AGA)は思春期以降の男性、特に30代から50代の男性に多く見られる男性ホルモンを原因とした脱毛症であり、近年では10代や20代前半の男性にも増加の傾向が見られている。AGAは頭皮の組織でtestosteroneが5α-reductaseによりdihydrotestosterone(DHT)に還元されることによって進行する。DHTが蓄積すると、皮脂腺から皮脂の分泌の亢進、毛乳頭から毛髪の成長を停止するシグナルの誘発を促す。AGAの治療には5α-reductaseを阻害することが効果的であり、実際プロペシアという酵素阻害型の治療薬が使用されている。プロペシアは内服薬という画期的な育毛剤であるが、医療品であるため医師の処方箋が必要である。そこで本研究では、普段の食事から手軽に摂取できるように天然の植物から5α-reductase阻害物質を探索することを目的とした。
【方法】酵素阻害活性は被験物質、testosterone、酵素源としてラット肝臓抽出物である S9、Tris buffer を加え、37℃でプレインキュベート後、NADPH を加えて 37℃、30 分間酵素反応を行った。反応溶液を酢酸エチルで抽出し、内部標準として hexyl *p*-hydroxybenzoate を加えた。有機層を乾固後、メタノールに溶解して HPLC で testosterone を定量した。阻害率は control の testosterone 減少量と被検物質溶液の testosterone 減少量の比率から求めた。
【結果】マレーシア、インドネシア産植物試料を 50%メタノールで抽出し、阻害活性試験を行った。スクリーニングの結果、フトモモ科の植物である *Melaleuca leucadendra* の 50%メタノール抽出物に高い阻害活性が見られた。この抽出物を水-ヘキサンで分液した後、さらに水層をクロロホルム:メタノール:水=4:1:5 で水層と有機層に分液した。高い阻害活性が見られた水層を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー(水-メタノール系)で 3 つの画分に分けた。高い阻害活性があった溶出画分を Cosmosil 75C18 OPN カラムクロマトグラフィー(水-メタノール系)を用いて分画を行った。活性画分をさらに Cosmosil 75C18 OPN カラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC を用いて分画中である。

testosterone 5α-reductase inhibitor, alopesia, Indonesian herbs

講演番号：4A04a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ A校舎04会場

タイトル　シマホオズキ果実抽出物のシワ改善作用

Title　Improvement of skin wrinkles　with *Physalis peruviana* fruit extract

○土田 克彦、末次 一博、成田 美穂、森田 哲史（ナリス化粧品）

○Katsuhiko Tsuchida, Kazuhiro Suetsugu, Miho Narita, Satoshi Morita (Naris Cosmetics)

【目的】顔面部のシワは美容的観点から、重要な抗老化研究の対象である。我々は、シワ改善効果を有する素材の探索を行い、シマホオズキ果実に優れた効果を見出した。本発表では、シマホオズキ果実抽出物のシワ改善作用と、その作用を有する成分について検討した結果を報告する。

【方法】まず、シマホオズキ果実抽出物によるシワ改善作用をレプリカ法により評価した。次にシマホオズキ果実抽出物を加えた正常ヒト皮膚線維芽細胞からmRNAあるいはタンパクを採取し、Real-time PCR あるいはELISA法により、シマホオズキ果実抽出物のシワ形成に関与するタンパクおよびタンパク合成量への影響を検討した。

【結果】シマホオズキ果実抽出物を配合した製剤を顔面部に連続して塗布することにより、シワ改善作用が認められた。次に加齢によるシワ発生部で合成量が減少していることが知られているCollagen、Elastin、Hyaluronic acid synthase について、シマホオズキ果実抽出物が与える影響を評価した結果、これらのmRNAまたはタンパク合成量に対して影響は与えていないことがわかった。次に Elastin 周囲に存在する Fibrillin-1 に着目して評価を行ったところ、Fibrillin-1 mRNA、タンパク合成量に変化が認められた。さらに、このような作用を有するシマホオズキ果実抽出物中成分の同定を試みた。

Wrinkle, Physalis peruviana, Fibrillin-1

講演番号：4A04a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ A校舎04会場

ペルー産キク科植物２種に含まれるHL-60増殖抑制物質の探索

Identification of HL-60 Antiproliferative Compounds from Two Peruvian Asteraceae Plants.

○佐藤綾，田邊章仁，常盤野哲生、北山雅彦[1]，ブリセーニョ　アルベルト[2]，川井悟[3]，吉澤結子
（秋田県大生資科，[1]京都工繊大遺伝資源，[2]Universidad Catolica de Santa Maria，[3]東電大理工）
○Aya Sato, Akihito Tanabe, Tetsuo Tokiwano, Masahiko Kitayama, Alberto Briceno，Satoru Kawaii, Yuko Yoshizawa
(Akita Pref. Univ., Kyoto Inst. Tech., Univ. Catolica de Santa Maria, Tokyo Denki Univ.)

【目的】

南米ペルーは、海岸地帯、アンデス高地、熱帯地帯など多様な地形と気候により植物種が豊富で、それらの中には民間伝承薬として用いられる植物もあるが、有効成分や薬効が解明されていないものもある。そこで本研究室では、ペルーの植物からヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 の増殖抑制活性を指標に生理活性物質を探索した。ペルーで民間薬として用いられてきた植物 17 種のメタノール抽出物をスクリーニングした結果、そのうち 4 種が IC_{50}値 10 ppm 以下の強い活性を示した。本研究では、活性の強かったキク科植物 *Senecio graveolens* と *Cynara scolymus*から HL-60 に対して増殖抑制活性を有する物質の単離と構造決定を目的とした。

【方法】

S. graveolens および *C. scolymus* の葉と茎の乾燥品をメタノールに浸漬し、不溶物をろ過した後、メタノールを減圧留去して粗抽出物を得た。これを HL-60 に対する増殖抑制活性を指標に、カラムクロマトグラフィーで分画・精製を行った。単離した化合物は、NMR 等の機器分析によって構造解析を行った。活性試験は、10% FBS を含む RPMI-1640 培地で 37℃、5% CO_2 条件下で HL-60 細胞に試料を添加し、その後 alamar Blue® を添加して、吸光度により IC_{50} 値を算出した。また、正常細胞との選択性を調べるため、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC に対しても活性試験を行った。HUVEC に対する活性試験は、EGM-2 培地で 37℃、5% CO_2 条件下で24時間培養した後、試料を添加し、以下 HL-60 と同様に IC_{50} 値を算出した。

【結果】

*S.graveolens*のメタノール抽出物から、HL-60 に対し増殖抑制活性を示す化合物 1 種を単離した。ESI-HR-MS 及び NMR 測定により、 1-[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-ethanoneと同定した。単離収率は、6.77 mg/g dry weight であり、HL-60 に対するIC_{50} 値は、0.11 μM であった。また、*C.scolymus* からも化合物 1 種を単離し、cynaropicrin と同定した。単離収率は、1.24 mg/g dry weightであった。IC_{50} 値は HL-60 に対し 1.16 μM 、HUVEC に対し 12.4 μM であり、がん細胞に対し約 10 倍の選択性を示した。

HL-60, Senecio graveolens, Cynara scolymus

講演番号：4A04a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ A校舎04会場

ウルシ科植物カイノキの成分研究（３）

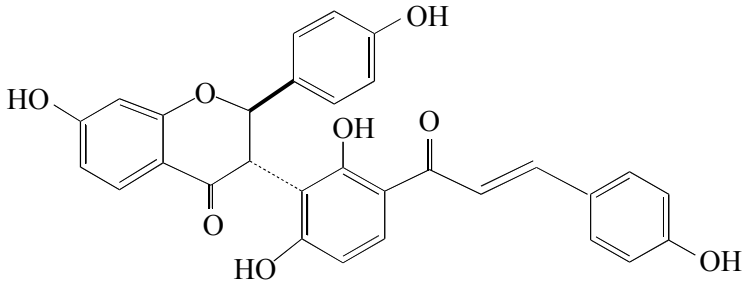
Constituents of *Pistacia chinensis* (Anacardiaceae) (3)

○稲田　昭，大島千佳，沖出宏美，稲冨由香，邑田裕子，徳田春邦[1]，　鈴木信孝[1]　（摂南大・薬，[1]金沢大・医）

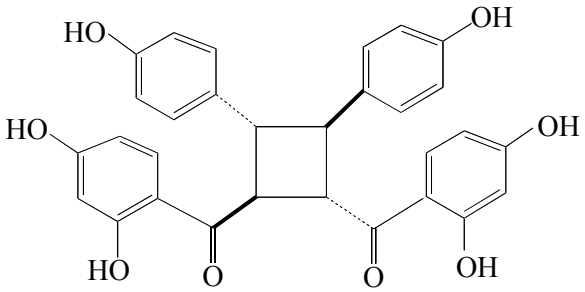
○Akira Inada, Chika Ohshima, Hiromi Okide, Yuka Inatomi, Hiroko Murata, Harukuni Tokuda[1], Nobutaka Suzuki[1] (Setsunandai, [1]Kanazawadai)

【目的】カイノキ（*Pistacia chinensis* Bunge)はウルシ科に属する落葉高木で，中国，台湾，フイリッピンに分布しており，日本では家具や紅葉が美しいことから街路樹などとして利用されている。先に演者らは本植物の枝について成分検索をおこない，新規化合物(**PC-C**)を含む種々の骨格を持つビフラボノイド類６種(**PC-A**-**PC-F**)を単離・構造決定した。[1)] 今回，さらに詳細な成分検索を検討した結果，新たにサイクロブタン環を持つ既知ビフラボノイド(**PC-H**)などとともに,新規ビフラボノイド(**PC-G**)を単離した。さらに，これらの化合物の抗発がんプロモーター活性についても検討したので併せて報告する。

【実験・結果】本学薬用植物園で採取したカイノキの枝のメタノール抽出エキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画した。各分画を ODS カラムクロマトグラフィーおよび HPLC などを用いて精製し，既に報告したビフラボノイド類の他に，新たに **PC-G**，**PC-H** などを単離した。各化合物の構造は，NMR および MS などの各種スペクトルデータの解析により決定した。次に，これらのビフラボノイド類の抗発がんプロモーター活性を Epstein-Barr virus early antigen の発現を指標とする *in vitro* の系で検討した結果，**PC-C** に強い活性が認められたため，**PC-C** についてマウス皮膚二段階発がん抑制実験をおこなった。その結果，コントロール群と比較すると，腫瘍発生の著しい遅延効果とともにマウス一匹あたりの腫瘍個数についても約 50%の抑制効果が認められたことから，**PC-C** の抗発がんプロモーターとしての有用性が明らかになった。



PC-G



PC-H

1) a) 日本生薬学会第 57 回年会講演要旨集（徳島）p. 352 (2010)，　b). 日本生薬学会第 58 回年会講演要旨集（東京）p. 289 (2011)

Pistacia chinensis, biflavonoid, anti-tumor promoting activity

講演番号：4A04a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ A校舎04会場

オニシモツケ地上部からのリパーゼ阻害成分の単離・構造決定

Isolation and Structure Elucidation of Lipase Inhibitors from *Filipendula kamtschatica*

○加藤英介、山　理嗣、中込　亮[1]、柴田敏郎[2]、細川敬三[3]、川端　潤（北大院農、[1]北大農、[2]医薬基盤研・薬植セ、[3]兵庫大）

○Eisuke Kato, Michitsugu Yama, Ryo Nakagomi[1], Toshiro Shibata[2], Keizo Hosokawa[3], Jun Kawabata (Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ., [1]Fac. Agr. Hokkaido Univ., [2]NIBIO, [3]Hyogo Univ.)

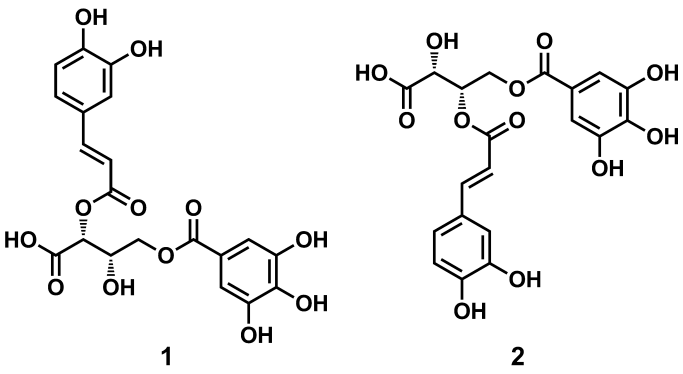
【目的】

食事に含まれる脂質の主成分であるトリグリセリドは、消化管内の酵素である膵リパーゼによりモノアシルグリセロールと脂肪酸へと加水分解されることで、小腸から吸収可能となる。従って、膵リパーゼの阻害はトリグリセリドの吸収を抑えることにつながる。各種疾患につながるメタボリックシンドローム・肥満の予防には脂質の吸収抑制が効果的であることから、我々は各種植物から膵リパーゼ阻害物質の探索を行っている。

バラ科オニシモツケ（*Filipendula kamtschatica*）は、北方系植物のスクリーニングから見出された高いリパーゼ阻害活性を示す植物である。我々は昨年度この植物の地上部に含まれるリパーゼ阻害物質について報告している。[1] 本発表では、このリパーゼ阻害物質1の構造決定と共に、新たに単離された類縁体の構造決定とリパーゼ阻害活性について報告する。

【方法及び結果】

オニシモツケ地上部の50%メタノール水溶液抽出物を、リパーゼ阻害活性を指標として種々のカラムクロマトグラフィーにより分画することで、化合物1（110 mg）とその類縁体を得た。類縁体については各種スペクトル解析から1と同様、没食子酸、カフェ酸及び糖酸の縮合物であるが、縮合位置が異なる2であると決定した。また糖酸部については、メタノールを用いた加溶媒分解・メチルエステル化後、市販のcalcium L-threonateより誘導したmethyl L-threonateまたはL-threonolactoneと比較することにより1, 2共に図のような絶対立体配置であると決定した。またリパーゼ阻害活性のIC_{50}値は1が246 μM、2が26 μMと結合位置の違いにより一桁異なっていた。



1. 山　理嗣、他4名、日本農芸化学会大会2011, 2J17p04.

lipase inhibitor, pancreatic lipase, metabolic syndrome

講演番号：4A04a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ A校舎04会場

インドネシア産植物*Eugenia polyantha*中の膵リパーゼ阻害成分の単離、構造決定

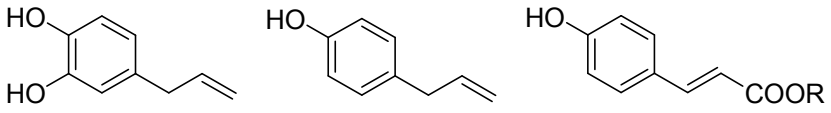
Isolation of the pancreatic lipase inhibitory principle from Indonesian plant *Eugenia polyantha*

○中込 亮、Maria Dewi P.T. Gunawan Puteri[1]、加藤 英介[1]、川端 潤[1]（北大農、[1]北大院農）
○Ryo Nakagomi, Maria Dewi P.T. Gunawan Puteri[1], Eisuke Kato[1], Jun Kawabata[1] (Fac. Agr. Hokkaido Univ., [1]Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ.)

【目的】食物中の脂質の主成分であるトリグリセリドは、膵リパーゼによって遊離脂肪酸とモノアシルグリセロールへと水解され、小腸で吸収される。このため、膵リパーゼ阻害成分は脂質吸収を抑えることにより、肥満予防に効果的である。我々は今回インドネシア産の植物のスクリーニングを行い、高いリパーゼ阻害活性を示した植物のうち*Eugenia polyantha*葉より阻害成分の探索を行った。

【方法】酵素源に市販のブタ膵臓リパーゼ、基質にトリオレインミセルを用い、水解により生じるオレイン酸量からリパーゼ阻害活性を評価した。尚、オレイン酸の酵素による定量法に際して、酵素反応が供試成分により妨害を受けたため、遊離したオレイン酸をヘキサンにより抽出して供試成分と分離する改良法を用いた。

【結果】インドネシア産植物*Eugenia polyantha*(Myrtaceae)乾燥葉(40 g)の50%メタノール抽出物を水と酢酸エチルで分配したところ、阻害活性は酢酸エチル可溶部に移行した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより繰り返し分離することで、リパーゼ阻害活性を示す画分を４つ得た。このうち最も高極性の画分は、種々の機器分析の結果4-アリルカテコール(**1**)と決定した。**1** (730.3 mg)は*Eugenia polyantha*に含まれる主要活性成分であり、その膵リパーゼに対する阻害活性は1.1 mMで51%であった。またその他の画分から副次的な活性成分として**2**と**3**を得た。構造解析の結果、**2**は4-アリルフェノール、**3**は*p*-クマル酸のエステル体と決定した。さらに他の画分に含まれる構造未知物質についても現在構造決定を試みている。



1 **2** **3**

Lipase inhibitor, pancreatic lipase, metabolic syndrome

講演番号：4A04a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ A校舎04会場

インドネシア産薬用植物中のマルターゼ阻害物質の探索

Search for potential maltase inhibitors from Indonesian herbs

○イネス　セプティ　アルシニングティアス、島田実幸、マリアデウィP.T.グナワンプテリ、加藤英介、川端潤　（北大院農）

○Ines Septi Arsiningtyas, Miyuki Shimada, Maria Dewi P.T. Gunawan Puteri, Eisuke Kato and Jun Kawabata　(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

【Objective】Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease caused by deficiency in insulin secretion or by insulin resistance. One promising approach to treat DM is through decreasing of postprandial hyperglycemia by suppressing carbohydrate digestion. Reduction of glucose absorption can be done by inhibiting carbohydrate-hydrolyzing enzymes, α–glucosidase, such as maltase and sucrase.

Indonesian herbs, integrated in Indonesian healthy life style as traditional medicine also as foods and cosmetics, are potential for further exploration. Current study aims to reveal Indonesian herbs potency as anti-hyperglycaemic agent based on their inhibitory activity against maltase.

【Methods】Research materials were collected from local Jamu ingredients and medicinal herbs plantation in Indonesia. Determination of maltase inhibitory activity of Indonesian herbs was done *in vitro*. Enzymatic assay is used to evaluate their activity to inhibit maltose hydrolysis by rat intestinal glucosidase.

【Results】From 82 Indonesian herbs observed in this study, one of the promising samples was *Pluchea indica*. Methanolic extract of *P. indica* leaves showed significant inhibitory activity against maltase. Solvent partition with ethyl acetate-water resulted in the finding that the active principles were soluble in the ethyl acetate layer. Using silica gel, ODS column chromatography and preparative HPLC, the ethyl acetate soluble layer was successfully chromatographed. Further purification of the active fractions is being done to isolate active principles.

Diabetes mellitus, maltase inhibitors, Indonesian herbs

講演番号：4A04a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ A校舎04会場

熱ショックタンパク質誘導活性を有する新規化合物の単離及び構造決定

Isolation and structure determination of a novel compound to induce HSP70.

○伊藤 知洋[1]、松浦 英幸[2]、三浦 健人[1]、藤井 創[1]（[1]株式会社アミノアップ化学、[2]北大院農・応生科）

○Tomohiro Ito[1], Hideyuki Matsuura[2], Takehito Miura[1], Hajime Fujii[1]([1]Amino Up Chemical Co., Ltd., [2]Hokkaido Univ.)

【目的】ストレスタンパク質と呼ばれるタンパク質のひとつに、熱ショックタンパク質（以下、HSP）がある。中でもHSP70は、生体が物理的、化学的、生理的又は精神的ストレスを受けた場合に、細胞内に誘導されるタンパク質の一つである。近年、HSP70の抗細胞死作用及び抗炎症作用が認められ、多様なストレスに対する細胞保護効果が報告されている。そこで本研究では、抗ストレス効果を有する機能性食品開発を目的とし、HSP70誘導活性を指標として野菜を含む天然物のスクリーニングを行った。

【方法】HSP70誘導活性の評価は、HeLa細胞を用いてmRNA及びタンパク発現レベルを測定した。スクリーニングで活性が認められた素材については、HSP70のmRNA発現レベルを指標として各種カラムクロマトグラフィー、HPLCを用いて精製を行った。精製の結果、単離した化合物について、MS、NMRを用いて構造解析を行った。さらに、スクリーニングで活性が認められた素材について、その熱水抽出物を用いて*in vivo*での効果を検証した。マウス断眠モデルを用い、抗ストレス効果について、(1)酸化ストレス指標としての血清中過酸化脂質量(血清トリグリセライド(TG)量に対する過酸化脂質(LPO)量比）(LPO/TG)の測定、(2)血中コルチコステロン濃度の測定、及び(3)脱毛マウスの発現率の評価を行うことで検討した。

【結果】野菜を含む天然物由来物質のスクリーニングを行った結果、ある種の野菜の熱水抽出物に活性が認められたため、活性物質の精製を試みた。精製の結果、コントロールと比較して、mRNA及びタンパク発現レベルを有意に上昇させる新規な化合物を単離、構造決定した。また、その野菜の熱水抽出物を用いた*in vivo*での効果検討の結果、LPO/TG値、血中コルチコステロン濃度、脱毛マウスの発現率を有意に抑制した。

novel compound, HSP70, anti-stress activity

講演番号：4A04a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ A校舎04会場

褐藻クロメ*Ecklonia kurome*の新規フロロタンニンの単離・構造決定と抗酸化活性

Isolation and structural elucidation of two new phlorotannins from the brown alga, *Ecklonia kurome*

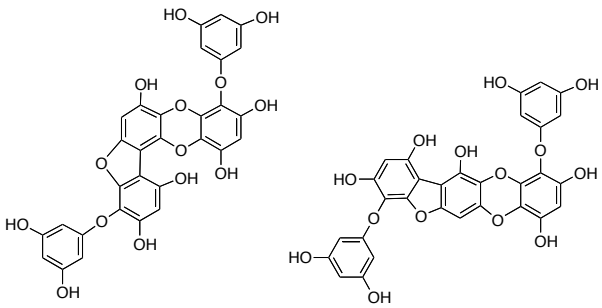
近藤左和子、林　宜瑾、豊原治彦[1]、伊藤久富[2]、内田隆史、○山下まり（東北大・院農、[1]京大・院農、[2]長瀬産業）

Sawako Kondo, Yi-Chin Lin, Haruhiko Toyohara[1], Hisatomi Ito[2], Takafumi Uchida, ○Mari Yotsu-Yamashita (Tohoku University, [1]Kyoto University, [2]Nagase & Co. LTD)

【目的】クロメやサガラメ等の褐藻は、phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) が重合したポリフェノール（フロロタンニン類）を含み、種々の生理活性を持つことが報告されている。我々は、クロメおよびサガラメに新規ポリフェノール 2 成分が存在することを見出した。本研究ではそれらの新規ポリフェノールを単離・構造決定し、抗酸化活性を評価することを目的とした。

【方法】クロメより、70% EtOH で抽出後、ダイヤイオン HP20 を用いてポリフェノール画分を得た。その画分を ESI-MS に供すると、未知のポリフェノールと考えられるイオンが、 $[M-H]^-$ *m/z* 973 (negative)、 $[M+H]^+$ *m/z* 975 (positive)に得られた。そこで、数種の逆相 HPLC に供し、このイオンを与える 2 成分を精製し、973-F および 973-S と仮称した。また、この精製過程で、既知の phlorofucofuroekol-A (PFF-A)[1)]と phlorofucofuroekol-B (PFF-B)[2)]も単離した。973-F および 973-S は、アセチル化および各種 NMR 測定により構造決定を行った。また、抗酸化活性は DPPH ラジカル消去活性で評価した。細胞毒性は、ヒト白血病 T 細胞 Jurkat T とマウス神経芽細胞腫 Neuro2A に各成分を加え、24 時間後に WST-8 assay で生細胞数を調べた。

【結果】ポリフェノール画分 500 mg より、973-F (9 mg)、973-S (6 mg)、PFFA (8 mg)、PFFB (4 mg) を単離した。973-F は HR-ESI-TOF-MS (positive)で$[M+H]^+$ *m/z* 975.12583 (calcd for $C_{48}H_{31}O_{23}$ 975.12506, Δ +0.77 mmu)を示し、分子式を $C_{48}H_{30}O_{23}$ と決定した。既知 PFF-A、 PFF-B の NMR スペクトルとの比較から、973-F、973-S は、部分構造にそれぞれ PFF-B、PFF-A を有し、共通の分子量 374 のユニットが結合した構造であると考えられた。さらに既知フロロタンニン類の NMR データと比較し、973-F、973-S の構造を決定した。973-F、973-S の抗酸化活性は、α-tocopherol よりも強く、さらに PFF-A、PFF-B よりも強いことが示された。またこれらのフロロタンニン類は、Jurkat T、Neuro2A のどちらの細胞に対しても 50 μM で細胞毒性を示さなかった。



PFF-A　　PFF-B

1) Fukuyama Y., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **1990**, 38, 133.

2) Sugimura Y., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2006**, 70, 2807.

brown alga, phlorotannin, polyphenol

講演番号：4A04a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ A校舎04会場

マウス精子のハイパーアクチベーション　運動を誘導する植物成分の探索

Flavan dimers induce hyperactivation-like motility of mouse spermatozoa

○荒舘　忠、谷井　一　、小宮　顕[1]（富山大・医生物、[1]富山大・医・泌尿器）

○Tadashi Aradate, Ichiro Tanii, Akira Komiya[1] (Univ. of Toyama, Medical Biology, [1]Univ. of Toyama, Urology)

【目的】精子の超活性化（ハイパーアクチベーション）は、精子の鞭毛が対称的な動きから非対称的な動きに変化することを特徴とする運動形態として観察される。この変化は、精子が　周囲の　丘細胞層や透明帯を通過する時の推進　となるため、真獣　における受精の成　に重である。体外受精においても、低運動性あるいは凍結保存精子を　いるような場合では受精が低くなることがある。このような精子にハイパーアクチベーションを付与できる化合物は、体外受精　の向上に役　ち、生殖医　および畜産分野への応　可能なツールとなる。そこで、マウス精子のハイパーアクチベーションを誘導する化合物を植物成分から探索した。

【方法】生　活性物質の探索源として植物440種より調製したエタノール抽出物（1000種　）を　いた。雄マウス（ICR、12～18週　）の精巣上体尾部より精子塊を採取してTYH培地へ入れ、37℃、5%CO_2下で90分間インキュベートし、精子を受精能獲得（キャパシテーション）状態にした。この精子を植物抽出エキスや化合物が入ったTYH培地に加えた後、顕微鏡で精子の運動を観察した。効果が確認できたエキスの活性成分は、分配抽出、silica gel、Sephadex LH20、cosmosil RP-C18カラムクロマトグラフィーおよびHPLCにより分　、精製した。精子の運動能は精子運動能解析装置（SMAS）を　いて、精子の運動　、頭部振動数、頭部振幅、直線速度、曲線速度、直進性を測定した。

【結果】スクリーニングの結果から、カワラケツメイ（*Cassia mimosoides* L. subsp. *nomame*）の　のエキスに精子のハイパーアクチベーションを誘導する効果を見出した。活性を指標に成分の分　を行い、　エキスの酢酸エチル抽出物からFlavan dimerに属する2種　の化合物 **1**、**2**を得た。化合物 **1**、**2**の構造解析結果と精子運動能に対する効果について報告する。

sperm, hyperactivation, flavan dimer

講演番号：4A05a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ A校舎05会場

アネトールが示す相乗的抗真菌作用は薬剤耐性機構の抑制を介して発揮される

Anethole exhibits synergistic antifungal activity via restriction of multidrug resistance

石倉　昂幸, 城野　由衣, 山口　大輔, 荻田　亮[1], ○藤田　憲一, 田中　俊雄（阪市大院・理, [1]阪市大・都市健康･スポーツ研究センター）

Takayuki Ishikura, Yui Jono, Daisuke Yamaguchi, Akira Ogita[1], ○Ken-ichi Fujita, Toshio Tanaka (*Graduate School of Science, Osaka City University,* [1]*Research Center for Urban Health and Sports, Osaka City University*)

トランス・アネトール（アネトール）はセリ科植物のアニス(*Pimpiniia anisum* L)の種子から抽出される油状成分である。独特の芳香を放ち、甘味料・保存料として広く食品に添加されており、微生物に対しても微弱ながら抗菌活性を示す。また、本物質はポリゴジアール類、ナギラクトン類、長鎖アルコール類などの他の薬剤と組み合わせることで相乗的な抗真菌活性を発揮することがすでに判明している。

【目的】本研究では、アネトールとモデル薬剤であるドデカノールを併用した際に発揮される相乗的な抗真菌活性発現メカニズムを、出芽酵母の薬剤耐性に関わっている多剤耐性薬剤排出ポンプ、ABCトランスポーター群に絞って解析した。

【方法および結果】各薬剤で処理した出芽酵母においてRT-PCR法により遺伝子発現量を解析した結果、ドデカノール処理によって少なくともその排出ポンプであるPDR5の発現量が増大し、アネトールとの併用によりPDR5の発現は強く抑制されることがわかった。加えて、PDR5欠損株はドデカノール感受性が高まった。さらにPDR5の発現を制御していると報告されている転写因子PDR1についてもアネトールとの併用によりその発現が抑制された。さらに病原性真菌*Candida albicans*に対して抗真菌薬フルコナゾールと併用した場合においてもアネトールは相乗効果を発揮することが判明した。

Anethole, multidrug efflux pumps, *Candida albicans*

講演番号：4A05a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ A校舎05会場

ハイグロマイシンBとポリミキシンBの相乗的殺真菌作用

Synergistic fungicidal activities of hygromycin B and polymyxin B

○油谷 雅広[1]、荻田 亮[1,2]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1] ([1]阪市大院・理、[2]阪市大・健康研セ)
○Masahiro Yutani[1]、Akira Ogita[1,2]、Ken-ichi Fujita[1]、Toshio Tanaka[1] ([1]*Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ.*, [2]*Res. Cntr. for Urban Health & Sports*)

【目的】抗グラム陰性細菌剤 polymyxin B（PMB）は液胞膜障害作用を介して殺真菌作用を発揮する。一方、液胞膜の形態異常を伴う出芽酵母の変異株 (*vps54*, *sac1,* etc) がアミノ配糖体 hygromycin B (HgB) に超感受性となることが明らかにされている。本研究では、*S. cerevisiae* BY4741株を用いてPMBとHgBの併用効果について検討した。
【方法と結果】PMB は BY4741 株に対して液胞膜の断片化を伴う殺菌作用を示し、HgB も微弱かつ遅延的な殺菌作用を示した。両者を静菌的濃度で併用すると、急激かつ著しい殺菌作用が現れたが、液胞の形態には異常が認められなかった。HgB は PMB 誘導体である colistin との間でも同様の相乗的作用を示したが、同じく液胞膜障害作用を示す amphotericin B (AmB) との間では併用効果を示さなかった。*S. cerevisiae* における HgB のタンパク質合成阻害活性はスフェロプラストを用いて証明されているが、HgB を静菌的濃度で BY4741 株の栄養細胞に単独投与した場合も、PMB と併用した場合もタンパク質合成の阻害活性は検出されなかった。*vps* 遺伝子欠損株の中に上述変異株よりも著しい HgB 感受性を示す株として新たにΔ*vps16* とΔ*vps34* を見出した。PMB は Vps16p および Vps34p、あるいはこれら液胞関連タンパク質の制御下にある部位への作用を介して、HgB に潜在する未知の抗真菌活性を増幅している可能性がある。HgB に潜在する活性がタンパク質合成阻害活性と同様に水酸基のリン酸化による修飾で消失するかどうかを明かにするために、HgB リン酸化酵素遺伝子を含むプラスミドで形質転換した親株およびΔ*vps16* 株に対する HgB の作用を比較した。形質転換の結果、親株に対する HgB の MIC は 200 μM から>8 mM に上昇したが、PMB の共存下ではその値が 2 mM まで低下した。一方、Δ*vps16* 株に対する MIC は 3.13 μM から 1.6 mM に上昇したが、PMB の共存下でもその値は 0.8 mM にとどまった。HgB に潜在する抗真菌活性がリン酸化によっても部分的に維持されていた理由について現在検討中である。

hygromycin B, polymyxin B, fungicidal activity

講演番号：4A05a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ A校舎05会場

出芽酵母に対してジヒドロフェニルアラニンはアポトーシス様細胞死を誘導する

Apoptotic-like cell death induced by L-2,5-dihydrophenylalanine in budding yeast

○中尾 有里、荻田 亮[1]、藤田 憲一、田中 俊雄（阪市大院・理、[1]阪市大・健康研セ）
○Yuri Nakao, Akira Ogita[1], Ken-ichi Fujita, Toshio Tanaka (Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [1]Res. Cntr. for Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

本研究室で、放線菌 *Streptomyces* sp. 548-07 から単離されたフェニルアラニンの類縁体 L-2,5-dihydrophenylalanine (DHPA)は、カンジダ菌やアスペルギルス属菌などの真菌に対して弱い抗菌作用を示す。DHPA は、*Aspergillus* 属菌に対して微小管を消失させることにより菌糸の分岐異常を伴った抗真菌作用を示す。DHPA によって生じる *Aspergillus* 属菌の形態異常は、細胞内チューブリン量の減少と関連していることがすでに判明している。一方、本類縁体はヒト由来白血病由来の培養細胞 HL-60 株に対して、核の断片化を伴うアポトーシスを誘導する。

【目的】

今回は出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*に対するDHPAの作用機構を解析した。

【方法と結果】

24 時間の処理を施した場合、DHPA は *S. cerevisiae* ATCC7754 株に対して濃度依存的に生育を抑制していることがわかった。IC_{50} (62.5 μg/ml)で DHPA 処理した細胞の約 6 割において核の断片化が認められた。核の断片化は、アポトーシスの結果、引き起こされる現象のひとつで、DHPA がアポトーシスを引き起こす可能性が想定された。DHPA は本酵母に対して活性酸素種の産生を誘導することがわかった。活性酸素種に依存するアポトーシスの際に見られるカスパーゼ様酵素の活性化も認められた。さらに抗酸化剤 α-トコフェロールの添加によって生育阻害からの部分的な回復が確認された。以上の結果から、ヒト由来白血病由来の HL-60 細胞と同じく、DHPA は出芽酵母に対して活性酸素種の産生を伴うアポトーシス様の細胞死を誘導している可能性が高くなった。

apoptosis, budding yeast, L-2,5-dihydrophenylalanine

講演番号：4A05a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ A校舎05会場

N-methyl-*N''*-dodecylguanidine によって増幅される amphotericin B の真菌液胞膜障害作用 –蛍光標識誘導体を用いる細胞内動態の可視化–

Enhancement effect of *N*-methyl-*N''*-dodecylguanidine on the vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B

○姜 昌慶[1]、山田 圭一[2]、油谷 雅広[1]、臼杵 克之助[1]、荻田 亮[1,3]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1]（[1]阪市大院・理、[2]群馬大院・工、[3]阪市大・健康研セ）

○Chang-Kyung Kang[1], Keiichi Yamada[2], Masahiro Yutani[1], Yoshinosuke Usuki[1], Akira Ogita[1, 3], Ken-ichi Fujita[1], Toshio Tanaka[1] (*[1]Graduate School of Science, Osaka City University, [2]Graduate School of Engineering, Gunma University, [3]Reserch Center for Urban Health and Sports, Osaka City University*)

【目的】ポリオールマクロライドの一種である niphimycin (NM) は amphotericin B (AmB) を凌ぐ強い殺真菌活性を示す。NM のアルキルグアニジン側鎖誘導体 *N*-methyl-*N''*-dodecylguanidine (MC12) を AmB に共存させると、AmB の液胞膜障害作用を顕著に増幅することが明らかになっている。本研究では、AmB と MC12 の併用効果を AmB の標的分子である細胞膜エルゴステロールとの関係において検討した。

【方法と結果】AmB および AmB にダンシル基を導入した蛍光標識誘導体 (AmB-Ds) を用いて *S. cerevisiae* に対する AmB の致死作用と細胞内動態との関係について解析した。AmB-Ds の致死作用は AmB の致死作用と同様に MC12 の共存下で著しく増幅された。致死濃度以下の AmB-Ds 処理細胞の場合も、細胞質内に明瞭な蛍光が観察されたが、液胞膜障害は観察されなかった。一方、MC12 の共存下では、AmB-Ds 処理細胞において液胞膜の形態異常が観察されたことから、MC12 は AmB-Ds の細胞内への取り込みではなく、細胞内に取り込まれた AmB-Ds の液胞膜への作用を促進していることが判った。親株に見られた AmB と MC12 との相乗効果がエルゴステロール合成能を欠く *Δerg3* 株では全く見られなかった。*Δerg3* 株においては、MC12 の有無に関わらず AmB-Ds の細胞内への取り込みも、液胞膜の異常も観察されなかった。本変異株の AmB 処理細胞における K^+ の漏出は親株の場合と同程度に顕著であった。

amphotericin B, *S. cerevisiae*, vacuole

講演番号：4A05a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ A校舎05会場

イソプレノイド誘導体 1-geranylgeranylpyridinium (GGPy) の抗真菌活性における標的タンパク質の同定と解析

Identification of molecular target in fungicidal activity of isoprenoid derivative, 1-geranylgeranylpyridinium (GGPy)

○幸 慎太郎[1]、臼杵 克之助[1]、荻田 亮[1,2]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1]
([1]阪市大院・理、[2]阪市大・健康研セ)
○Shintarou Miyuki[1], Yoshinosuke Usuki[1], Akira Ogita[1,2], Ken-ichi Fujita[1], Toshio Tanaka[1]
([1]*Graduate School of Science, Osaka City University,* [2]*Research Center for Urban Health and Sports, Osaka City University*)

【目的】細胞壁グルカン合成を阻害すると期待されたイソプレノイド誘導体 1-geranylgeranylpyridinium (GGPy) は、確かに低浸透圧下で *S. cerevisiae* などの真菌に対して強い致死作用を発揮した。しかしながら、GGPy は高浸透圧や高温など様々なストレス条件下でも強い致死作用を発揮することから、その標的分子は細胞壁合成とは異なる部位に存在するとみなされた。本研究においては、分子間相互作用にもとづいて GGPy の標的分子をダイレクトに同定しようとした。
【方法と結果】37℃で1時間の高温処理を施した *S. cerevisiae* の細胞破砕液上清から GGPy をリガンドとするアフィニテイークロマトグラフィーによって GGPy 親和性タンパク質を単離した。同カラムから GGPy を含む緩衝液で溶出される画分は SDS-PAGE において2本のバンドを与えた。これらのバンドは、MALDI-TOF-MASS によって glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の isozyme 3 および fatty acid synthetase (fas) の ß-subunit と同定された。解糖系酵素である GAPDH には３つのアイソザイムが存在するため、isozyme 3 の遺伝子欠損株は生育可能である。一方、fas は *S. cerevisiae* を始めとする真菌の脂肪酸合成に必須であり、その遺伝子欠損株は致死である。GGPy と fas 阻害剤である cerulenin との間には *S. cerevisiae* の生育阻害において相加的な関係が認められた。Fas に対する GGPy の阻害様式について現在検討中である。

isoprenoid-derivative, *S. cerevisiae*, fatty acid synthetase

講演番号：4A05a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ A校舎05会場

M期特異的キネシン(KSP)阻害剤 Terpendole E 類の作用機構解析

Analyses of inhibition mechanism of Terpendole E derivative on mitotic kinesin, KSP

○知念拓実[1]、樽井弓佳[1]、南雲陽子[1]、矢島潤一郎[2]、本山高幸[3]、長田裕之[3]、臼井健郎[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]東大院・総合文化、[3]理研基幹研・ケミカルバイオロジー)

○Takumi Chinen[1], Yuka Tarui[1], Yoko Nagumo[1], Junichiro Yajima[2], Takayuki Motoyama[3], Hiroyuki Osada[3], and Takeo Usui[1] ([1]Grad. School of Life and Environmental Sciences, Univ. Tsukuba, [2]Grad. School of Arts and Sciences, Univ. Tokyo, [3]Chem. Biol., RIKEN ASI)

【目的】Terpendole E (TerE) は天然化合物としては唯一報告されている KSP 特異的阻害剤であるが、その詳細な阻害機構・結合部位は不明のままである。そこで本研究では高活性 TerE 類縁体と、既に作用機構・結合部位の明らかとなっている S-trityl-L-cysteine (STLC) および GSK-1 の作用を比較することで、TerE の KSP 阻害機構を明らかにすることを目的とした。

【方法及び結果】STLC は KSP 構造を ADP 結合型に変化させ、微小管との相互作用を弱めることが知られている。そこで STLC と同様に TerE 類縁体および GSK-1 が KSP と微小管との相互作用を弱めるかどうかを、微小管共沈実験、及び KSP と Kinesine-1 による tug-o-war sliding assay[1)] により検討した。その結果、TerE 類縁体は KSP の微小管結合を弱めるものの、その活性は STLC と比べて弱いこと、一方 GSK-1 は STLC や TerE 類縁体とは異なり KSP と微小管との結合を強めることが明らかとなった。続いて STLC 耐性変異あるいは GSK-1 耐性変異を持つ KSP モータードメインをそれぞれ作製し、微小管存在下、各阻害剤の変異 KSP に対する ATPase 阻害活性を検討した。その結果、STLC 耐性 KSP は STLC に、GSK-1 耐性 KSP は GSK-1 に対して耐性を示したが、TerE 類縁体はこれらの両 STLC/GSK-1 耐性変異 KSP の ATPase 活性を野生型 KSP と同様に強く阻害することが明らかとなった。

以上の結果から TerE 類縁体は STLC や GSK-1 とは異なる部位に結合し、KSP と微小管との結合を弱めることで KSP 機能を阻害すること、また GSK-1 は KSP-微小管結合を強める方向に作用することが明らかとなった。

1) *Curr. Biol.*, **14**, 411-412 (2004)

Terpendole e, Stlc, Ksp

講演番号：4A05a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ A校舎05会場

FD-891のアクチンへの作用機構解析

Effects of FD-891 on actin cytoskeleton

○竹内美穂、仙波由行[1]、工藤史貴[2]、江口正[3]、溝上一敏[4]、片岡孝夫[5]、臼井健郎（筑波大院・生命環境、[1]筑波大・生命環境、[2]東工大院理工・化学、[3]東工大院理工・物質科学、[4]大正製薬、[5]京工繊大院・応生）

○Miho Takeuchi, Yoshiyuki Senba[1], Fumitaka Kudo[2], Tadashi Eguchi[3], Kazutoshi Mizoue[4], Takao Kataoka[5], Takeo Usui (Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [1]College of Biological Sciences, University of Tsukuba, [2]Department of Chemistry, and [3]Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology, [4]Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., [5]Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology

【目的】FD-891は放線菌*Streptomyces graminofaciens* A-8890が産生する抗腫瘍活性を有する16員環マクロライドである。我々は一昨年、昨年度の本大会にて、本物質が細胞内アクチン構造を破壊すること、様々なアクチン結合タンパク質とF-アクチンとの結合を阻害すること、さらに生合成類縁体を用いた構造活性相関検討の結果から、FD-891の細胞毒性および細胞形態変化誘導活性に重要な部位について明らかにし、報告してきた。今回、FD-891のアクチン結合部位を同定することを目的に、FD-891のアクチン結合モデルを作成し、そのモデルを元に変異アクチンのみを発現する酵母を作成、解析を行ったので報告する。

【方法・結果】統合計算化学システムMOEを用いてFD-891のアクチン結合モデルを作成した。得られた結合モデルより、FD-891はアクチンのサブドメイン1とサブドメイン3が形成するポケットに結合していること、さらにFD-891のアクチン結合に11アミノ酸残基が関与している可能性が示唆された。そこで、昨年度本大会で我々が報告した多剤超感受性酵母を元株として、FD-891の結合に関わると考えられるアミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した変異アクチンのみを発現する酵母を作成した。得られた各変異アクチン発現酵母のFD-891に対する感受性を検討したところ、FD-891に対して耐性及び超感受性を示す変異アクチン発現酵母がそれぞれ一株ずつ得られた。両変異株ともにcytochalasin Bに対する感受性は変化が見られなかったことから、これらの変異部位はFD-891とアクチンの結合に関わっていることが強く示唆された。

FD-891, actin, yeast

講演番号：4A05a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ A校舎05会場

真菌を用いたクロラムフェニコールの新規作用点の探索

Search for the novel molecule target(s) of Chloramphenicol in *Magnaporthe oryzae*

○西脇 綾香、後藤 麻紀子、鎌倉 高志（東理大院理工・応生科）
○Ayaka Nishiwaki, Makiko Goto, Takashi Kamakura (TUS)

【目的】イネいもち病菌（*Magnaporthe oryzae*）はイネに感染して病害を引き起こす植物病原糸状菌である。本菌は宿主への感染時に分生子から発芽管を伸長させ、その先端に感染に必須な器官である付着器を形成する。付着器形成という現象は、真核生物において最も単純な細胞分化のモデルの一つであると考えられる。一般に、細胞分化プロセスには多くの遺伝子が関与しており、それだけ阻害されうるポイントも多いことが知られている。これらのことは、本菌の付着器形成が各種の細胞内因子を阻害する化合物に対して非常に鋭敏に反応する実験系として利用が可能であることを意味する。そこで、本研究は、このような実験系を用いて、各種化合物の新たな作用を探索し、その分子標的を同定することを目的としている。
【方法・結果】本菌に様々な既知の薬剤を作用させたところ、原核生物のタンパク質合成を阻害する抗生物質であるクロラムフェニコール（Chloramphenicol：Cm）が、発芽管伸長を阻害せずに付着器形成を特異的に阻害した。本菌は真核生物であることから、本菌に対するCmの新規作用点が存在する可能性が示唆された。そこで新規作用点探索を目的として、Cmと結合すると思われる標的候補ペプチドのT7ファージディスプレイ法による取得を試みた。その結果、ホスファターゼ様タンパク質の一部と相同性の高い標的候補ペプチド配列を取得した。このタンパク質をコードしている遺伝子を本菌において過剰発現させ、野生株では付着器形成を阻害する濃度のCmを作用させたところ、付着器形成能が回復した。Cmはヒトに対しても作用点未知の強い副作用を示すことから、Cmが真菌とヒトとで共通の作用点に作用している可能性も考えられる。現在、この遺伝子に注目しさらに解析を進めている。

phytopathogenic fungi, T7phage display, antibiotic

講演番号：4A05a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ A校舎05会場

真菌を用いたロキシスロマイシンの新規作用点の探索

A Possible Alternative Target of Roxithromycin in Fungi

○熊坂 茉佑、石井 晶、小泉 優希、各務 佑哉、鎌倉 高志（東理大・理工）
○Mayu Kumasaka, Akira Ishii, Yuki Koizumi, Yuya Kakumu, Takashi Kamakura (Tokyo University of Science)

【目的】イネいもち病菌(*Magnaporthe oryzae*)はイネに感染して病害を引き起こす植物病原糸状菌である。本菌は宿主への感染時に、分生子から発芽管を伸長させ、その先端に感染特異的な器官である付着器を形成し、植物体内に侵入する。本菌の付着器形成は、真核生物の細胞分化の最も単純な機構の一つであり、細胞分化には多くの遺伝子が関与するため各種の細胞内因子を阻害する化合物に対して非常に鋭敏に反応する。本研究はこの付着器を用いて各種化合物の新規作用を探索し、その分子標的を決定することを目的としている。新規作用点が本菌特異的または真菌特異的であれば抗いもち剤、抗菌剤の標的として、真核生物に広く存在するのならばヒトにおける副作用点の解明に寄与することができると考えられる。
【方法・結果】本菌に様々な各種化合物を作用させ、付着器の分化や発芽への影響を調べたところ、14員環マクロライド系抗生物質であるRoxithromycin(RXM)が、発芽管伸長を阻害せずに付着器形成を特異的に阻害する作用を示した(Nagashima, 2008年度本大会)。RXMは原核生物のタンパク質合成を阻害するが、真核生物である本菌に効果を示し、またヒトにおけるRXMの効果でも抗炎症作用や血管新生阻害作用などの作用点が明確になっていないものが報告されていることから、本菌に対するRXMの新規作用点の存在が示唆された。そこで、T7ファージディスプレイ法を用いてRXMの標的分子の探索を行い、得られた複数の候補遺伝子の中からヒトにおいても保存されている遺伝子に着目し、本菌において2回相同組換えを行うことで標的候補遺伝子の破壊を試みた。その結果、この遺伝子の発現量が低下した株が得られ、RXMに対する感受性が低下していた。さらに、この遺伝子が本菌において付着器形成時特異的に発現している事がわかった。また、この遺伝子を本菌において過剰発現させRXMに対する感受性について調べたところ、過剰発現株では、野生株と比較してRXMに対する感受性の変化は見られなかった。

Appressorium formation, A macrolide antibiotic, *Magnaporthe oryzae*

講演番号：4A05a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ A校舎05会場

トリコテセン生産阻害物質precocene IIの作用機構に関する研究

Studies on the mode of action of precocene II as a trichothecene production inhibitor

○坂本直子、吉成知也[1]、露木利枝、長澤寛道、作田庄平（東大院・農生科・応生化、[1]国立衛研）
○Naoko Sakamoto, Tomoya Yoshinari[1], Rie Tsuyuki, Hiromichi Nagasawa , Shohei Sakuda (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [1]National Institute of Health Science)

【目的】世界中で深刻な問題となっているマイコトキシンの一種であるdeoxynivalenol (DON)の生産阻害物質として、当研究室でprecocene IIが同定された。Precocene IIは抗幼若ホルモン活性物質として知られているが、DON生産菌である*Fusarium graminearum*の生育は阻害せず、マイコトキシン生産だけを特異的に阻害する。本研究では、precocene IIがDON生産を特異的に阻害する作用機構を解明することで、マイコトキシン汚染被害に対する効果的な防除策の確立に寄与することを目的としている。
【方法・結果】Precocene IIがDON生産を阻害する作用点を同定するため、フォトアフィニティープローブを用い、precocene IIとの競合阻害実験、二次元電気泳動を行ったところ、precocene IIと特異的に結合するタンパク質のスポットが観察された。現在このprecoceneIIと結合したタンパク質の同定を進めている。また、precocene IIの構造活性相関を調べたところ、抗幼若ホルモン活性の場合と異なる結果が得られた。さらに、代謝物からprecocene IIの作用機構を考えるため、メタボローム解析、アセチルCoAの定量、代謝経路にかかわる酵素遺伝子のreal-timePCRを行ったところ、precocene IIはDON生産にかかわるアセチルCoAの生産を特異的に阻害していることが判明した。

3-ADON、precocene II、acetyl-CoA

講演番号:4A05a11
講演日時、会場:3月25日11:10～ A校舎05会場

骨代謝細胞の分化に対する月桃由来化合物の作用

Effects of compounds isolated from *Alpinia zerumbet* on bone cell differentiation.

○夏目 矩行[2]、長谷川 森一[2] 、米澤 貴之[1]、車 炳允[1,2]、中川 大[1,2]、照屋 俊明[1]、永井 和夫[1]、禹 済泰[1,2] ([1]中部大学 生物機能開発研究所、[2]中部大学応用生物学部)

○Noriyuki Natsume, Shin-ichi Hasegawa[2], Takayuki Yonezawa[1], Byung-Yoon Cha[1,2], Hiroshi Nakagawa[1,2], Toshiaki Teruya[1], Kazuo Nagai[1,2], Je-Tae Woo[1,2]
([1]Research Institute for Biological Functions,Chubu University, [2]Department of Biological Chemistry,Chubu University)

【目的】月桃は熱帯・亜熱帯地域に自生しているショウガ科ハナミョウガ属の多年生常緑草本であり、薬理作用として抗菌作用・抗酸化作用・抗炎症作用などが報告されている。本研究では、月桃の葉からの新規生理活性化合物の探索および精製・単離を行い、骨芽細胞と破骨細胞の分化における作用を検討した。

【方法】破砕した沖縄産の月桃葉のメタノール抽出物を各種溶媒で分配操作し、クロマトグラフィーを用いて、化合物を精製・単離し,NMRなどの機器分析によって構造解析を行なった。骨芽細胞の分化に対する作用は、前骨芽細胞株であるMC3T3-E1細胞を用いて、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)の酵素活性の測定と染色、及び石灰化実験により評価した。破骨細胞の分化に対する作用は、マクロファージ様細胞株であるRAW264.7細胞を用いて、破骨細胞分化マーカーである酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)酵素活性と染色により評価した。また、RANKLにより活性化される各種シグナル因子の発現について、Western blot法により解析した。

【結果】沖縄産の月桃葉のメタノール抽出物から単離・精製した化合物から、骨芽細胞分化促進作用を示すpinocembrin及び、破骨細胞分化抑制作用を示すcardamoninを見出した。MC3T3-E1細胞の骨芽細胞分化において、pinocembrinはMC3T3-E1細胞のALP活性を促進し、石灰化も促進した。cardamoninはRANKL刺激によるp38 MAPK、ERK及び ＩκBのリン酸化を抑制した。さらに破骨細胞分化に重要な転写因子であるc-FosとNFATc1の発現を抑制した。これらの結果よりcardamoninは、RANKL刺激破骨細胞分化初期シグナル分子の活性化の阻害を介しc-FosやNFATc1の発現の抑制によって破骨細胞の分化が阻害されることが示唆された。

Osteoblast, Osteoclast, Bone

講演番号：4A05a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ A校舎05会場

シトクロム*c*-カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ活性発現の分子機構

Molecular mechanisms for the induction of peroxidase activity of the cytochrome *c*-cardiolipin complex.

○新林　良太、安部　真人、三芳　秀人（京大院農・応用生命）
○Ryota Niibayashi, Masato Abe, Hideto Miyoshi (Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】カルジオリピン（CL）はミトコンドリア内膜に局在するリン脂質であり、4 つの脂肪酸部と 2 つのリン酸部から構成される（Fig. 1）。CL はミトコンドリア内で発生した活性酸素種に起因するアポトーシスにおいて、シトクロム *c*（cyt *c*）のミトコンドリア外漏出を制御していることがわかっている。Cyt *c* の漏出機構については、概ね以下のように考えられている。すなわち、「アポトーシス初動過程において、① Cyt *c* はミトコンドリア内膜に存在する CL と特異的な複合体（cyt *c*-CL 複合体）を形成する。② これによって cyt *c* に構造変化が起こりペルオキシダーゼ活性が誘導され、CL 自身が過酸化される。③ 過酸化された CL は cyt *c* との親和性が低下し、cyt *c* がミトコンドリア外膜小孔から細胞質へと漏出する。」というものである。しかし、それぞれの素過程の詳細な分子機構に関しては、未解明な点が残っている。

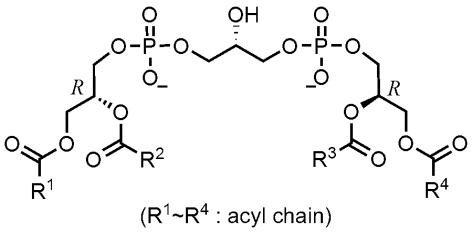


Fig. 1. カルジオリピンの構造

そこで本研究では、cyt *c*-CL 複合体形成とペルオキシダーゼ活性誘導を支配する CL の化学構造因子を解明することを目的とした。特に、脂肪酸部の不飽和結合とリン酸部のグリセロール骨格の寄与についての検討を目指し、一連の類縁体を合成した。

【方法と結果】合成した CL 類縁体と dioleoylphosphatidylcholine（DOPC）からリポソームを調製し（DOPC:CL = 9:1）、cyt *c*-CL 複合体形成によるペルオキシダーゼ活性を評価した（Fig. 2）。その結果、飽和脂肪酸であるステアリン酸によって構成される TSCL を含むリポソームに最も顕著な活性化が確認され、リン酸部を改変した CL 類においてもペルオキシダーゼ活性の誘導が認められた。このことから、CL の脂肪酸部の不飽和結合は重要でないことが明らかとなり、リン酸部の特定の構造が認識されていないことが示唆された。次に、リポソーム共沈法によって CL 含有リポソームと cyt *c* との結合親和性（$B_{L/S}$）を評価した。その結果、ペルオキシダーゼ活性の誘導効果と結合親和性の間に良好な相関が認められた（Fig. 2）。これにより CL 類のペルオキシダーゼ活性誘導の能力は、cyt *c* との結合親和性によって決定されていることが明らかとなった。

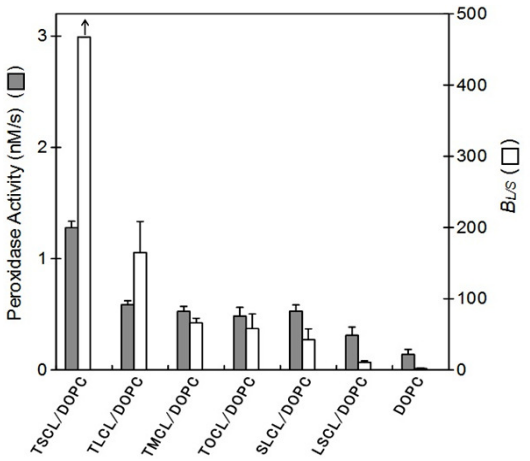


Fig. 2. ペルオキシダーゼ誘導活性と cyt *c* との親和性の相関

【参考文献】Abe, M., Niibayashi, R., *et al*. (2011), *Biochemistry* 50, 8383-8391.

cardiolipin, cytochrome *c*, apoptosis

講演番号：4A05a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ A校舎05会場

ユビキノンプローブの創製と出芽酵母におけるユビキノン結合性タンパク質のスクリーニング

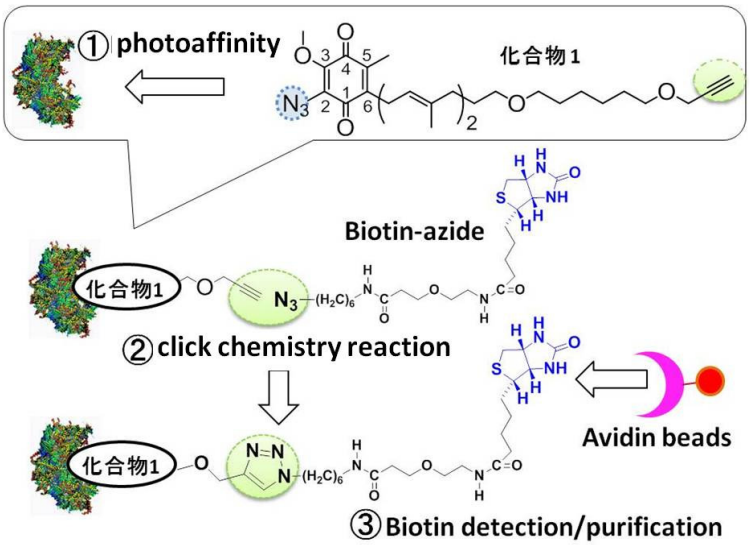
Comprehensive survey of ubiquinone-binding protein in *Saccaromyces serevisiae* using synthetic molecular probes

○ 工藤佐和子[1]、村井正俊[1]、矢崎一史[2]、三芳秀人[1]（[1]京大院農・応用生命, [2]京大・生存研）
○ Sawako Kudo[1], Masatoshi Murai[1], Kazufumi Yazaki[2], and Hideto Miyoshi[1]. ([1]Graduate School of Agriculture and [2]Reseach Institute for Sustainable Humanosphere , Kyoto Univ.)

【背景・目的】ユビキノンに代表されるキノン類は、バクテリアから高等生物に至るまで幅広く分布する生理活性分子であり、その主な役割は呼吸鎖電子伝達系における基質としてはたらくことである。近年の研究では、電子輸送担体としてだけではなく、細胞内の随所で一定の生理的役割を担っていることを示唆する報告が相次いでいるが、そこに関与するタンパク質の同定を含め、未だ決定的な実験的裏付けは得られていない。

こうした背景から、ユビキノンを結合することによって一定の生理的機能を果たしているタンパク質や、ユビキノンの細胞内輸送を担うタンパク質など、ユビキノンと一定の親和性を持つタンパク質（キノン結合性タンパク質）を幅広く探索することは重要な意味を持つ。本研究では、独自に合成したユビキノンプローブを用いた光親和性標識法に基づき、内在性のユビキノンを持たない出芽酵母ユビキノン生合成欠損株（ΔCOQ2）から、キノン結合性タンパク質を網羅的に単離・同定し、機能解明に繋げることを目的とした。

【方法・結果】これまでに当研究室ではビオチン化ユビキノンプローブの合成を進めてきたが、嵩高いビオチン分子の導入による化合物の生理活性の低下は避けられない。そこで、活性の維持と生化学分析の汎用性を考慮した新規なユビキノンプローブ（化合物 1）を合成した。本化合物はベンゾキノン環 2 位の位置に光反応基であるアジド基を持ち、分子末端にはclick chemistry（[3+2] 型環化付加反応）によるビオチンタグの導入を念頭にアルキン構造を導入した。



ΔCOQ2 酵母由来のミトコンドリアを用いて、化合物 1 の基質活性を評価した結果、良好な電子伝達活性と高い阻害剤感受性を示すことがわかった。続いて、ミトコンドリアおよびミクロソーム画分を用いて、光親和性標識と click chemistry によるビオチンタグの導入を行った。その結果、両画分から特異的に標識を受ける複数のタンパク質を再現性良く検出することが出来た。

Ubiquinone, photoaffinity labeling, click chemistry

講演番号：4A05a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ A校舎05会場

T7 ファージディスプレイ法を用いた新規ドキソルビシン結合タンパク質の同定

IDENTIFICATION OF A DOXORUBICIN-BINDING PROTEIN FROM A T7 PHAGE DISPLAY SCREEN

○草柳 友恵[1,2]、高草木 洋一[3]、倉持 幸司[4]、紙透 伸治[3]、小林 進[5]、坂口 謙吾[3]、菅原 二三男[3]
([1]東理大院理工・応生科、[2]JSPS 特別研究員 DC、[3]東理大理工、[4]京府大院・生命環境、[5]東理大薬)
○Tomoe Kusayanagi[1,2], Yoichi Takakusagi[1], Kouji Kuramochi[3], Shinji Kamisuki[1], Susumu Kobayashi[1], Kengo Sakaguchi[1], Fumio Sugawara[1] ([1]TUS, [2]JSPS Research Fellow, [3]KPU)

【目的】抗がん剤ドキソルビシン（DOX）は、急性リンパ性白血病、乳癌、肺癌など多岐に渡って使用されている。その作用機序は DNA インターカレーションによると言われているが、未解明の部分が多い。そこで本研究では新規 DOX 結合タンパク質が未解明の作用機序を説明すると考え、その探索に着手した。

【方法・結果】結合タンパク質の探索には、Quartz crystal microbalance- phage display（QCM-PD）法を用いた。まず、DOX を分子プローブ DOX-SAM として基盤に固定化し、15 mer のランダムなペプチドを提示したファージライブラリーから DOX 結合ファージ群を選抜した。次に、Receptor ligand contacts サーバーを用い、ファージ提示ペプチド群と human IPI データベースに含まれる全タンパク質との配列類似性を解析した。ペプチド群に高い類似性を示したタンパク質の中から、Fanconi anemia group F protein（FANCF）を DOX 結合候補タンパク質と同定した。そこで、FANCF と DOX の結合を確認するために以下の実験を行った。まず、DOX のビオチン化誘導体とヒト細胞抽出液を用いてプルダウンアッセイを行い、DOX 結合タンパク質を抗 FANCF 抗体により検出した。その結果、DOX は FANCF に結合することが示唆された。さらに、FANCF を大腸菌組み換えタンパク質として発現・精製した。精製した FANCF と DOX の結合を surface plasmon resonance（SPR）装置を用いて解析したとこ、これらの解離定数は 40 nM であった。

QCM-PD 法によるスクリーニングから得られた DOX 結合ペプチド群と FANCF の配列類似性を数値化し、FANCF の DOX 結合部位を推測した。その結果、FANCF の 93 番目のアミノ酸 L（93L）を中心とする領域、N 末端の 14L と C 末端の 343G、352L を中心とする領域を DOX 結合部位であると推測した。シスプラチンなどの架橋剤によって DNA 損傷が起きると、FANCF は N 及び C 末端領域を介して他の Fanconi anemia（FA）タンパク質と複合体を形成する。この複合体は、Fanconi anemia group D2 protein（FANCD2）のモノユビキチン化を誘導して DNA 修復を行う。そこで、DOX の FANCD2 モノユビキチン化に与える影響を観察した。その結果、DOX により FANCD2 のユビキチン化阻害が起こることを確認した。これらの結果から DOX が FANCF に結合し、FANCD2 モノユビキチン化を阻害するという可能性が示唆された。

phage display screen, doxorubicin, fanconi anemia

講演番号：4A05a15
講演日時、会場：3月25日11:54～ A校舎05会場

新規タモキシフェン類縁体リダイフェン B 結合タンパク質の探索

Identification of a novel tamoxifen derivative, ridaifen-B-binding protein

○九十田　千子、紙透　伸治[1]、池北　雅彦[1]、椎名　勇[2]、菅原　二三男[1]（東理大院理工・応生科、[1]東理大理工・応生、[2]東理大理・応化）

○Senko Tsukuda, Shinji Kamisuki[1], Masahiko Ikekita[1], Isamu Shiina[2], Fumio Sugawara[1] (TUS, [1,2]TUS)

【目的】タモキシフェンはエストロゲンと競合的にエストロゲン受容体に結合し、乳癌細胞において抗腫瘍作用を発揮するため、乳癌の代表的なホルモン治療薬として用いられてきた。しかし、長期投与による子宮内膜癌のリスク増加が指摘されており、改良が望まれている。このような背景からタモキシフェンの改良を目的とし、本学において新規タモキシフェン類縁体であるリダイフェン B が合成された。リダイフェンB は、タモキシフェンと同様にエストロゲン受容体を介して作用すると予想された。しかし、エストロゲン受容体を発現していない細胞においてもアポトーシス誘導することが示され、エストロゲン受容体を介さない作用機構を有することが示唆された。そこで本研究では、リダイフェン B の作用機構の解明を目的とし、T7 ファージディスプレイ法を用いたリダイフェン B 結合タンパク質の探索に着手した。

【方法・結果】T7 ファージディスプレイ法は、結合タンパク質の同定と同時に結合部位も同定することが可能であり、化合物の結合タンパク質を探索する上で有効なツールである。この手法を用い、ヒト急性リンパ性白血病細胞 Jurkat 由来 cDNA T7 ファージライブラリーよりリダイフェン B 結合タンパク質を探索した。その結果、PERQ amino acid-rich with GYF domain containing protein 2 (PERQ2) の 745-1030 a.a. に一致する配列を提示したファージクローンを得た。そこで、三種類の結合試験を行ったところ、リダイフェン B と PERQ2 ファージ提示部位が結合する結果を得、その解離定数値は1.86×10^{-7} (M) であった。

PERQ2 は、Growth factor receptor-bound protein 10 (Grb10) と協同的に働き、チロシンキナーゼ受容体下流のシグナル伝達を調節するとされている。このシグナル経路は、PI3K/AKT 経路と Ras/MAPK 経路に大別され、PERQ2 はこれらの二つの経路に関与することが示されている。そこで、リダイフェン B はこれら二つの経路に影響を与えるかを、各経路に存在する Akt 及び ERK1/2 のリン酸化を観察することで検証した。その結果、リダイフェン B はこれらの経路に影響を与えることが示唆された。

phage display , a novel tamoxifen derivative , PERQ2

講演番号：4A06a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ A校舎06会場

新規タデ藍抽出物の病原性真菌*Malassezia furfur*に対する抗真菌活性

Antifungal activities of novel *Polygonum tinctorium* extract to pathogenic fungi *Malassezia furfur*.

○山下 健太郎、草刈　剛、繁田　泰民、山本　和司、[1]長内　理大、[1]中根　明夫、[1]北原　晴男、[1]花田　勝美（サンスター、[1]弘前大）

○Kentaro Yamashita, Takashi Kusakari, Yasutami Shigeta, Kazushi Yamamoto, [1]Michihiro Osanai, [1]Akio Nakane, [1]Haruo Kitahara, [1]Katsumi Hanada (Sunstar Inc., [1]Hirosaki Univ.)

【目的】タデ藍（*Polygonum tinctorium*）はタデ科イヌタデ属の一年草であり、日本における藍染め染料の原料植物として用いられる。また、古くから様々な薬効が言い伝えられた民間伝承薬としても用いられており、現在でも、タデ藍の乾燥葉は清熱解毒作用のある生薬として広く利用されている。タデ藍の生理活性物質の一つであるトリプタンスリンは、様々なヒト皮膚疾患の発症・悪化要因ともなる*Malassezia*属菌に対する抗菌活性を有することが知られている。我々はトリプタンスリンを多く含むタデ藍抽出物を作製し、この菌の過剰な増殖を抑えることにより、様々な皮膚疾患の予防・改善が可能となると考え、新たに作製法を検討したタデ藍抽出物の*Malassezia*属菌に対する抗菌活性を調べた。

【方法】タデ藍乾燥葉から新規のタデ藍抽出物を作製した。次に、この抽出物の*Malassezia furfur*に対する増殖抑制作用を確認した。具体的には、液体培地に所定濃度の抽出物と*Malassezia furfur*とを加えた試験菌液を３４℃で振盪培養し、接触７２時間後および１２０時間後に試験菌液を採取して濁度を測定した。また、試験菌液を寒天培地に塗布して３４℃で培養し、寒天培地上に生じたコロニー数を計測した。

【結果】今回作製した新規タデ藍抽出物は、トリプタンスリンを高濃度に含有することを確認した。また、この抽出物に*Malassezia*属菌の一種である*Malassezia furfur*に対する抗菌活性があることを見出した。この抽出物を使用することにより、ヒト皮膚疾患の予防・改善に繋がることが期待できる。

講演番号：4A06a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ A校舎06会場

ヤチヤナギの芳香成分と機能性に関する研究

Composition of essential oil of *Myrica gale* and their functianal property.

◯中田 真悠子、妙田 貴生、脇田 陽一[1]、戸枝一喜、藤森 嶺、西澤 信（ 東農大生物産業・食香、北海道立総合研究機構[1] ）

◯Mayuko Nakata, Takao Myouda, Youichi Wakita[1], Kazuki Toeda, Takane Fujimori, Makoto Nishizawa (Tokyo University of Agriculture, Forestry Research Institute (Hokkaido)[1])

【目的】ヤチヤナギ（*Myrica gale*）はヤマモモ科の落葉小低木で、我が国では北海道に広く自生する。枝葉にすがすがしい芳香があり、ヨーロッパなどでは古くから防虫剤、化粧品、あるいはビールの香り付けなどに利用されてきたが、現在は資源保全を理由に利用されていない。一方、我が国では北海道立林業試験場が組織培養法による安定的な大量増殖に成功したことから、新たな資源としてその利用が期待されている。本研究では、自生株および栽培株ヤチヤナギの芳香特性を比較し、機能性の一つとして抗菌活性について検討した。【方法】北海道苫小牧市に自生する株より採取した葉を自生株葉とし、北海道立林業試験場の圃場にて栽培されている株より採取した葉を栽培株葉として実験に供した。採取した葉を乾燥し、直接水蒸気蒸留により精油を搾取した。これをGC-MS（カラム：DB-WAX）に供し、芳香成分を分析した。また、AEDA 法により重要香気成分を特定した。なお、栽培株の葉は、6-8 月下旬に採取し、生葉の芳香成分を SPME 法にて抽出して成分を比較した。抗菌活性試験は、*S. aureus*、*B. subtilis*、*S. cerevisiae* および *C. albicans* に対する精油の効果を検討した。【結果・考察】自生株と栽培株より抽出した精油の芳香成分をGC-MS により比較した。自生株の芳香成分は、selina-3,7(11)-dien、cymene、limonene を主要成分として 51 個の成分が検出された。一方、栽培株では 47 個の成分が検出されたが、主要成分は自生株のそれと概ね一致したことから、芳香特性に大きな差異のないことが推察された。そこで、ヤチヤナギ葉の芳香に寄与する成分を特定するために栽培株由来精油を試料としてGC-O を実施し、AEDA 法によって重要香気成分の特定を試みた。その結果、8 化合物が検出され、FD 値は Linalool が最も高く、次いで Limonene, cineole が高かった。以上より、ヤチヤナギの芳香は上記3 化合物によって特徴付けられていることが示唆された。また、栽培株ヤチヤナギ芳香の季節変動を明らかにするため、6-8 月下旬の葉を試料として SPME 法および GC-O を実施したところ、各月の芳香成分や芳香に大きな違いはみられなかった。次に、ヤチヤナギの機能性を明らかにするため、*S. aureus*、*B. subtilis*、*S. cerevisiae*、*C. albicans* の生育に対する精油の影響を調べた。精油の最小阻害濃度（MIC）の検討を行った。*S. aureus* では最小阻害濃度（MIC）が 3906 ppm、*B. subtilis* で 122 ppm、*S. cerevisiae* で 3906 ppm、*C. albicans* で 3906 ppm と、*B. subtilis* に対し強い抗菌作用のあることが認められた。そこで、抗菌物質を特定するために精油をシリカゲルカラムで分画して抗菌試験を行ったところ、極めて極性の低い画分に抗菌活性が認められた。

Myrica gale, essential oil, antimicrobial

講演番号：4A06a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ A校舎06会場

ミツバチの行動学的観察と化学分析による韓国済州島産プロポリスの起源植物の同定

Identification of the plant origin of propolis from Jeju Island, Korea, by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis

○下村 幸佑、杉山 靖正[1]、安 木蓮[2]、中村 純[3]、熊澤 茂則 (静岡県大院・生活健康、[1]鹿児島大・水産、[2]韓国東亜大・食栄、[3]玉川大・ミツバチ科学研究センター)
○Kohsuke Shimomura, Yasumasa Sugiyama[1], Mok-Ryeon Ahn[2], Jun Nakamura[3], Shigenori Kumazawa (University of Shizuoka, [1]Kagoshima University, [2]Dong-A University, Korea, [3]Tamagawa University)

【目的】プロポリスは、ミツバチが特定の植物 (起源植物) の樹脂状物質を巣内に塗布した粘性物質であり、抗菌、抗癌、抗酸化作用などをもつことから人々には健康食品素材として利用されている。しかし、全てのプロポリスが同様の生理作用をもつ訳ではない。プロポリスはミツバチが起源植物由来の原料を単に集めたものであり、プロポリスの形態、成分、生理作用などは起源植物の種類に大きく左右されるためである。例えば、ポプラ類を起源植物とする中国やヨーロッパ産のプロポリスは顕著な抗酸化作用を示し、バッカリスの新芽から成るブラジル産プロポリスは抗癌作用をもつことが特徴的である。ゆえに、プロポリスを有効に利用するには、起源植物を明らかにしてプロポリスの諸性質を把握する必要がある。また、プロポリス中の生理活性成分は起源植物にも多く含まれることが予想されるため、未知の起源植物の解明は有用な植物資源の発見に繋がる可能性もある。これまでに、我々は、韓国済州島で採取されるプロポリスが他のいずれの地域のプロポリスとも異なる成分組成をもつことを明らかにした。このことは、プロポリスの新しい生理作用や起源植物の可能性を示唆している。そこで、本研究では、済州島産プロポリスの成分分析と起源植物の同定を試みた。
【方法・結果】済州島産プロポリスのエタノール抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーと分取HPLCによって分画し、27個の化合物を単離した。NMRやMSによる機器分析の結果、単離された化合物は8個の新規カルコン類、10個の既知カルコン類及び9個の既知クマリン類であることが明らかになった。さらに、既知化合物の多くは、明日葉 (*Angelica Keiskei*) の含有成分として報告されている化合物であった。そこで、明日葉が済州島産プロポリスの起源植物であると推測し、済州島でミツバチの行動学的観察を行った。その結果、済州島に存在する明日葉栽培場で、明日葉をプロポリスの原料として利用するミツバチの観察に成功した。すなわち、ミツバチは、明日葉の収穫後の切断面や節などから滲出する黄色の粘性物質を、口を用いて後脚の花粉籠に集めていた。また、栽培場で採取した明日葉の滲出液と、同栽培場近辺の養蜂場で採取したプロポリスのメタノール抽出物は、非常に近いHPLCパターンを示した。これらの結果から、韓国済州島産プロポリスの起源植物を明日葉と同定した。明日葉がプロポリスの起源植物であるという知見は、本研究で初めて確認されたものである。また、明日葉は大型の多年生草本であるが、これまでに報告されているプロポリスの起源植物はほぼ全て木本であり、草本の起源植物の例は極めて少ない。

propolis, Korea, *Angelica keiskei*

講演番号:4A06a04
講演日時、会場:3月25日09:33～ A校舎06会場

オウレン（*Coptis japonica* Makino）根茎由来精油の生理活性について

Physiologically activity of *Coptis japonica* Makino root derived essential oil

○西本 有貴・岡田 芳治・野村 正人（近畿大院・シス工）
○Yuki Nishimoto・Yoshiharu Okada・Masato Nomura(Graduate School of Systems Engineering, Kinki Univ.)

【目的】生薬である黄連（*Coptis* Rhizome）は，国内でも限られた場所に生息し，その根茎部位は，オウレン（*Coptis japonica* Makino）の名称で民間薬として利用されている。その効能については整腸，消炎および止血効果などが知られている。そこで，本研究では越前産オウレンの根茎から抽出した精油成分の抗酸化能活性(DPPHラジカル消去効果，活性酸素阻害)および抗菌活性などの生理活性を検討し，その効果について明らかにすることができたので報告する。
【方法】入手した越前オウレン(平成23年3月・勝山市)の根茎をメタノールに浸漬後，濃縮し粗油分を得た。ついで，ヘキサン，ジエチルエーテルおよび酢酸エチルで順次溶媒分画を行い，各油分に対し，DPPHラジカル消去効果試験，活性酸素阻害試験および抗菌活性試験(ペーパーディスク法)を行なった。DPPHラジカル消去効果試験および活性酸素阻害試験は，既報[1)]に準じて行なった。また，抗菌活性試験では，一般細菌である枯草菌(*Bacillus subtilis* NBRC3134)，大腸菌(*Escherichia coli* NBRC3972)，黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus* NBRC13276)および緑膿菌(*Pseudomonas areuginosa* NBRC132759)を用いて，既報[2)]に準じてそれぞれの分画油分を20μL，40μLおよび60μLを滴下し，35℃で24時間培養後，生育阻止円の半径を求め抗菌活性を評価した。
【結果】溶媒分画した油分に対して，DPPHラジカル消去効果試験および活性酸素阻害試験(SOD)を行なったところ，ジエチルエーテル分画油分および酢酸エチル分画油分において，比較物質であるα-トコフェロール値(95.0，SOD=7.8)と同等の高い数値(ジエチルエーテル分画油分:90.2，SOD=7.7，酢酸エチル分画油分:89.2，SOD=10.7)が得られたことから高い抗酸化能があることを確認できた。一方，今回行った抗菌活性試験においては，各々の細菌の生育阻止円から，とくに黄色ブドウ球菌に対して，ヘキサン分画油分および酢酸エチル分画油分は，試料濃度が60μLから抗菌活性が発現し，低濃度に調整した40μL濃度においても抗菌剤として，その効果が十分に発現することを確認できた。

文献　1)Abe,T.，Nomura,M.，*Aroma Research*，**7**，56-62(2006).
2)Ueda,S.,Yamashita,H.,Nakajima,M.，*Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*，**29**，111-116(1982).

Keyword: *Coptis japonica* Makino, physiologically activity, essential oil

講演番号：4A06a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ A校舎06会場

フェノールカルボン酸類のラジカル消去機構(32)―プロトカテキュ酸の酸化によるナフタレン骨格形成反応―

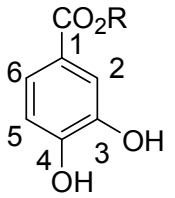
Radical-scavenging mechanism of phenolic carboxylic acids(32)–Forming of naphthalene derivatives by the oxidation of protocatechuic acid–

○武田 直樹、上杉 信太郎[1]、加藤 英介[1]、川端 潤[1] （北大農、[1]北大院農）
○Naoki Takeda, Shintaro Uesugi[1], Eisuke Kato[1], Jun Kawabata[1] (Fac. Agr. Hokkaido Univ., [1]Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ.)

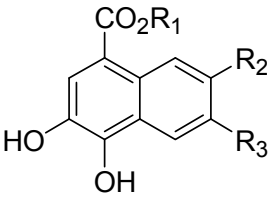
目的：プロトカテキュ酸（**1**）およびそのメチルエステル（**2**）は、ラジカル消去反応の過程で条件によりさまざまな酸化生成物を与え、また遊離酸とエステルでは異なった反応挙動を示すなど、興味深い点をこれまで明らかにしてきた。前回は **1** および **2** をジアセトキシヨードベンゼン（DAIB）酸化して得たキノン体に水を加えたところ、ナフタレン骨格を有する新規酸化二量体（**3**,**4**）が生成することを報告した。[1)] 今回は、さらに酸化反応生成物の探索およびこれらの生成経路の解明のための反応の初期過程の解析を試みた。

方法および結果：メタノール中で **2** をDAIBにより酸化し、得られたキノン体に水を加えた反応液をODSカラムクロマトおよび逆相HPLCで順次精製して酸化生成物を分離したところ、すでに報告したナフタレン型二量体（**4**）の異性体 **5** を単離した。エステル基の置換位置の異なる **4** と **5** が生成したことから、これらのナフタレン誘導体は **2** のキノン体がDiels-Alder型の付加により二量化した中間体が水分子の攻撃により開環、脱カルボニルによって生成したものであり、**4** と **5** は付加物生成の際のジエノフィルの結合向きの違いによるものであると推定された。このことを確認するためにメタノール、アセトニトリルなど種々の溶媒系で **1** および **2** をDAIB酸化し、反応物中からDiels-Alder二量化中間体の探索を行ったところ、酸化生成物はキノン－二量体間の平衡にあり、生成した二量体は不安定で水分子の存在で即座にナフタレン環へと変換されるらしいことがわかった。現在さらに酸化中間体の解析をすすめている。

1）上杉ら、農化東北北海道合同支部会、2010.9、仙台、要旨集p.55。



1:R=H
2:R=Me



3:R_1=H, R_2=H, R_3=CO_2H
4:R_1=Me, R_2=H, R_3=CO_2Me
5:R_1=Me, R_2=CO_2Me, R_3=H

phenolic acid, phenol oxidation, antioxidant

講演番号：4A06a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ A校舎06会場

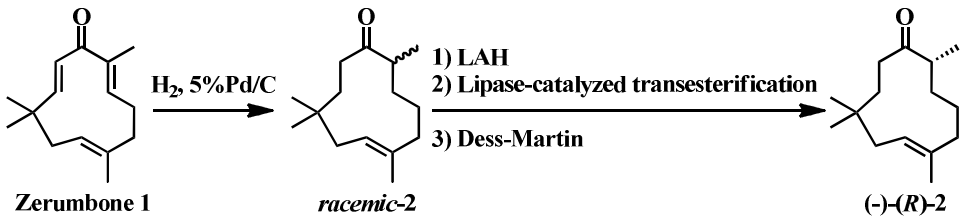
香気性光学活性テトラヒドロゼルンボンの効率的合成

Efficient synthesis of optically active tetrahydrozerumbone with balmy fragrance

○斉藤　あゆみ、太田　佐昌、北山　隆（近畿大院農バイオ）
○Ayumi Saito, Sayo Ohta, Takashi Kitayama (Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric., Kinki Univ.)

【目的】ハナショウガ（*Zingiber zerumbet* Smith）の根茎部から乾燥重量当たり3～4%と多量に含まれるゼルンボン **1** は、11員環のセスキテルペンで、環内に共役二重結合、孤立二重結合、共役カルボニル基を含む特徴的な構造をしており、多様な反応性や様々な生理活性を示すことから「多様な反応性をもつ天然材料を利用した有機合成」（*NMRDOS*）の材料として優れている。**1** は生理活性の1つとして、それ自身が草様の香気を有しているが、**1** をPd触媒下で接触還元したテトラヒドロゼルンボン **2** は、**1** とは全く異なる新規の甘く爽やかな「みどりの香り」と表現される香気をもっている。香料原体としての利用が期待できるが、2位のメチル基が不斉をもつため香気の本体を特定する必要がある。そこで、**2** を還元後、2種類のジアステレオマーを分離し、それぞれについてリパーゼ触媒を用いた速度論的光学分割によって、高い不斉収率でそれぞれのエナンチオマーを得た。これらをDess-Martin酸化によって **2** の光学活性体をそれぞれ得たところ、甘く爽やかな強い香気の本体は*R* 体であることが明らかとなった。しかしリパーゼ触媒を用いた光学分割の反応時間が非常に長いため、香料開発を行う場合、効率性に問題が生じる。そこで、本研究ではリパーゼ触媒を用いたトランスエステル化の反応条件を検討するとともに、特異な立体選択性を利用し、光学活性体 **3** の効率的な合成法の確立を目指した。

【方法および結果】リパーゼ触媒を用いた反応条件について、水分含有率、アシルドナー、溶媒効果、濃度など詳細に検討した結果、リパーゼMeito QLM存在下、アシルドナーに酢酸イソプロペニル、溶媒にヘキサンなどの疎水性溶媒を使用し、35℃で反応を行うことで、高い反応性とともに高い選択性を維持し、反応時間を大幅に短縮することに成功した。また、興味深いことに、本反応では2-メチル基の立体化学が、トランスエステル化の立体選択性に影響を与えることが分かった。そこで、ジアステレオマー混合物で反応を行うことで、さらに効率的に光学活性体 **3** を得ることに成功した。



Zerumbone, asymmetric synthesis, lipase

講演番号：4A06a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ A校舎06会場

中員環骨格をもつ光学活性アレンゼルンボンの合成

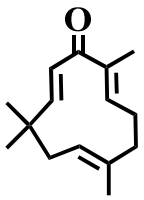
Synthesis of optically active allene-zerumbone

○亀尾 昌樹[1]、斉藤 あゆみ[1]、萩原 敏春[2]、河合 靖[3]、北山 隆[1,2]（[1]近畿大院農・バイオ、[2]近畿大農・バイオ、[3]長浜・バイオ）

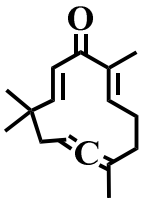
○Masaki Kameo[1], Ayumi Saito[1], Toshiharu Hagiwara[2], Takashi Kitayama[1,2] (Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric., Kinki Univ., Fac. Agric., Adv. Biosci., Kinki Univ., Nagahama Inst. Bio-Sci. Tech.)

【目的】ゼルンボン **1** は熱帯地方付近で栽培が行われているハナショウガの根茎部に含まれる11員環のセスキテルペンで、水蒸気蒸留と再結晶により容易に精製が可能な天然物である。**1** は環内に共役カルボニル基、2 つの共役二重結合、そして孤立二重結合をもっているため、「多様な反応性をもつ天然材料を利用した有機合成」(*NMRDOS*)の材料として優れている。この化合物 **1** を出発物質として、 4 ステップで得られるアレン型ゼルンボン **2** は、**1** の環状骨格を 1 炭素増加した12員環ケトンである。アレン基は高い反応活性を有するとともに、軸不斉が存在するため、キラルビルディングブロックとして活用することにより、有用天然物合成への応用が期待できる。そのためには、 **2** の光学活性体の構築が不可欠となる。そこで本研究では **2** の還元体であるアレンゼルンボールを利用し、リパーゼ触媒を用いたトランスエステル化による光学活性アレンゼルンボール **3** の合成、それに続く酸化反応による光学活性体 **2** の合成を試みた。

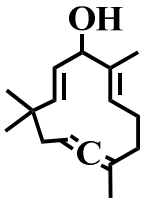
【方法および結果】アレン型ゼルンボール **3** は 2 種類のジアステレオマーが存在するため、HPLCを用いたそれらの分離条件を種々検討した。脂溶性側鎖をもつ長鎖アルキル修飾型カラム、あるいはπ－π相互作用を示すナフチル修飾型カラムを用いたところ、ジアステレオマーの分離はまったく確認できなかったが、ステロイド修飾型カラムを用いると良好な分離を示すことが分かり、それぞれのジアステレオマーの単離に成功した。続いてリパーゼ触媒を用いたトランスエステル化による速度論的光学分割を試みた。リパーゼ触媒、溶媒、アシルドナーを種々検討した結果、高立体選択的に **3** を得る条件を見いだした。これを酸化することにより、光学活性アレン型ゼルンボン **2** を得ることに初めて成功した。



ゼルンボン **1**



アレン型ゼルンボン **2**



アレン型ゼルンボール **3**

Zerumbone, Allene, optically activity

講演番号：4A06a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ A校舎06会場

ジンゲロンおよびラズベリーケトン誘導体の合成とその生理活性

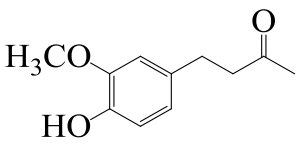
Synthesis of zingerone and raspberry ketone derivatives and their biological activity

○礒森 幸子[1]、関本 杏奈[2]、中村 薫[3]、北山 隆[1, 2]（近畿大院農バイオ[1]、近畿大農バイオ[2]、神戸大院環境[3]）

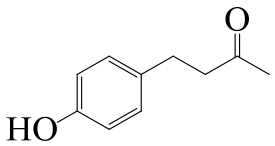
○Sachiko Isomori[1], Anna Sekimoto[2], Kaoru Nakamura[3], Takashi Kitayama[1, 2] (Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric., Kinki Univ.[1], Fac. Agric., Adv. Biosci., Kinki Univ.[2], Grad. Sch. Human Dev. Env., Fac. Human Dev., Kobe Univ.[3])

【目的】生姜（*Zingiber officinale* Roscoe）から得られるジンゲロン 1 およびラズベリー（*Rubus idaeus*）から得られるラズベリーケトン 2 は、ベンジルアセトンを主骨格にもつ特徴的な構造をしており、1 は抗癌作用[1)]、2 はNO産生抑制[2)]などの多様な生理活性を有することが知られている。本研究では、これら入手容易な天然物の有効利用と新たな生理機能の開発を目的として、各種誘導化し、さらにそれらの生理活性についても検討した。

【方法・結果】1 および 2 を水素化ホウ素ナトリウムで還元して得られたアルコールは不斉炭素を有する。これらを基質として、リパーゼを用いたトランスエステル化によって、光学活性なアルコール、アセテート、ジアセテートを得た。さらに別途誘導化検討を行い、これらの化合物を含む10種類以上の化合物を得ることに成功した。本研究では、調製した一連の化合物のチロシナーゼ活性を測定したところ、非常に強い阻害効果のみならず、活性効果を有する誘導体を見いだすことに成功した。この結果から、置換基の位置および構造がチロシナーゼとの親和性に重要な役割をもつことが示唆されたため、さらに構造活性相関研究を進めたので、これらについても報告する。



ジンゲロン 1



ラズベリーケトン 2

【文献】

1) T. Mustafa. *et al.*, *J. Drug Dev.*, **1993**, 125-139.

2) H. K. Byung. *et al.*, *Biomolecules & Therapeutics*, **2009**, 17, 79-85.

zingerone, raspberry ketone, biological activity

講演番号：4A06a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ A校舎06会場

ロドデンドロール配糖体の化学合成と生理活性評価

Chemical synthesis and biological evaluation of rododendrol glycoside

○岩舘　丈央、柏倉　裕[1]、二瓶　賢一（宇都宮大農・生物生産，[1]フジグリーン）
○Takehiro Iwadate, Yutaka Kashiwakura[1], Ken-ich Nihei (Utsunomiya Univ., [1]Fuji Green)

【目的】

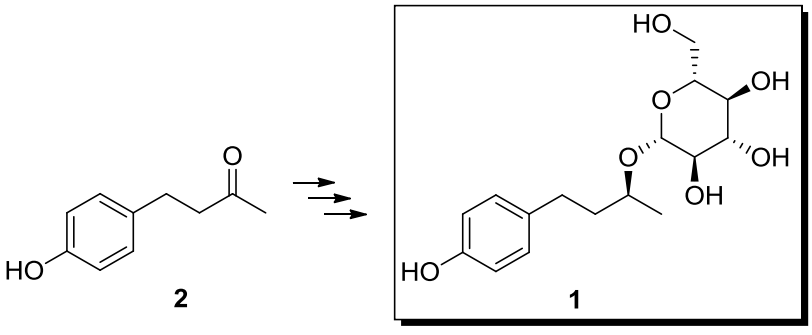
日本固有種であるメグスリノキ(*Acer nikoense*)は中世以降，眼病に対する民間薬として珍重されている．このメグスリノキに含まれる主要な生理活性物質であるロドデンドロール配糖体**1**は，抗炎症性および殺菌性を示す．構造的な特徴から，**1**はフリーラジカルの捕捉剤およびポリフェノールオキシダーゼなどの酸化酵素の基質として作用するのではないかと予測される．

そこで本研究では，トリクロロアセトイミデート法によるアグリコンの配糖体化を鍵反応に用いて，**1**とその誘導体を化学合成し，さらに得られた化合物のラジカル捕捉活性および酸化酵素阻害活性の評価を行って，ロドデンドロール配糖体を分子基盤とする新規抗酸化性物質の開発を目指した．

【結果および考察】

出発原料にラズベリーケトン(**2**)を選択し，そのカルボニル基をヒドリド還元してトリクロロアセトイミデート法による配糖体化を行った．得られた配糖体の保護基を，加水素分解およびエステル交換反応により除去し，天然物**1**を化学合成した(5段階，総収率18%)．

さらに種々のヒドロキシベンズアルデヒドを出発原料に，アルドール縮合を行い，対応するエノンを得た．これらのエノンの二重結合およびカルボニル基を還元し，得られたアルコールの配糖体化を行って複数のロドデンドロール誘導体を合成した．現在，これら誘導体の生理活性評価を行っている．



antioxidant, enzyme inhibitor, rhododendrol

講演番号：4A06a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ A校舎06会場

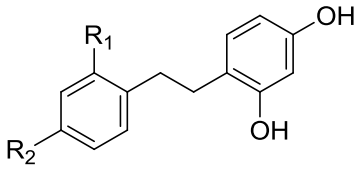
天然ビベンジル構造を基盤としたチロシナーゼ阻害剤の分子設計

Molecular design of tyrosinase inhibitor based on naturally-occurring bibenzyl structure

〇大貫　沙弥香、二瓶　賢一（宇都宮大農・生物生産）
〇Sayaka Ohnuki, Ken-ichi Nihei (Utsunomiya Univ.)

【目的】

配糖体**1**は，ユリ科の熱帯植物，*Chlorophytum arundinaceum*に含まれるビベンジル型のチロシナーゼ阻害剤である(Fig. 1)．その誘導体合成および阻害活性に関する研究の結果，代表的なチロシナーゼ阻害剤であるコウジ酸の約17倍の活性を示す阻害剤として，新しく配糖体**2**が開発された．しかしながら，**2**の化学合成では，10段階程度の反応工程とR_2部分をキシロシル化する位置選択的反応が必須であった．そこで本研究では，Wittig反応とトリクロロアセトイミデート法を鍵反応に用いて，**2**の構造を単純化した**3**およびその誘導体の化学合成を行った．



1: R_1 = O-Xyl, R_2 = OH
2: R_1 = OH, R_2 = O-Xyl
3: R_1 = H, R_2 = O-Xyl

Fig. 1. Structure of bibenzyl xylosides **1-3**.

【結果および考察】

出発物質の2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドをベンジル化し，水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元して得られたアルコールからホスホニウム塩を調製した．次に*p*-ヒドロキシベンズアルデヒドの水酸基を保護し，上記ホスホニウム塩とWittig反応させることにより，スチルベンを合成した(Fig. 2).

このスチルベンの二重結合を還元後，MOM基を除去し，ビベンジル構造を構築した．トリクロロアセトイミデート法を用いて，ビベンジルとキシロース部分をカップリングし，**3**の保護体へと誘導した．最後に，全ての保護基を除去して，ビベンジル配糖体**3**を合成した(7段階，総収率15%).

現在，**3**の構造をさらに単純化した誘導体の合成およびそれらの生理活性評価を行っている．

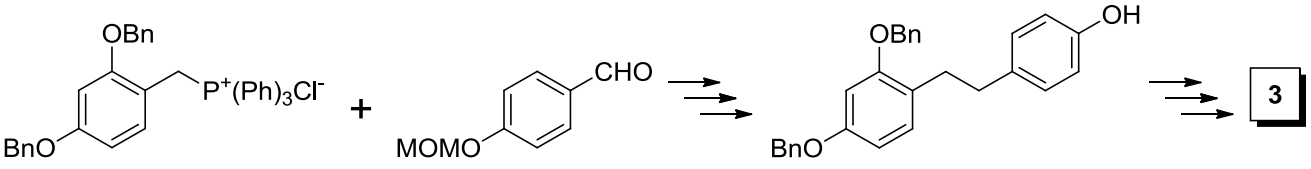


Fig. 2. Synthesis of **3** (simple overview).

bibenzyl, Wittig reaction, glycosylation

講演番号：4A06a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ A校舎06会場

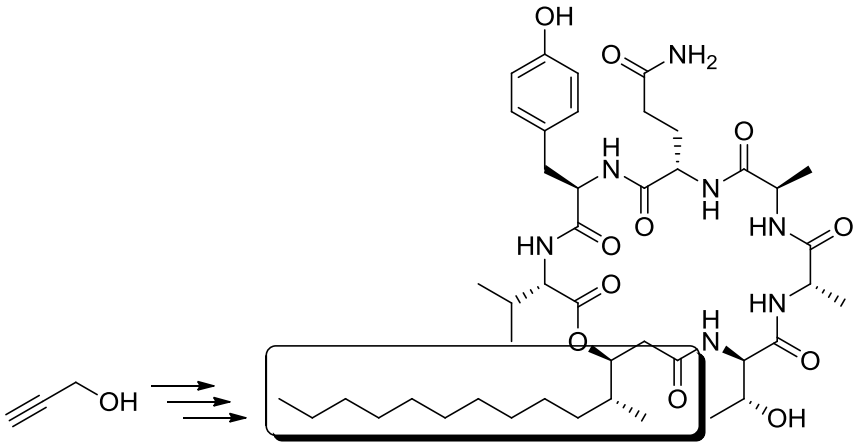
抗真菌性シクロデプシペプチド，W493 Aの合成研究

Synthetic study of W493 A, an antifungal cyclodepsipeptide

○太田　裕太郎、附田　勇也、高森　啓介、二瓶　賢一（宇都宮大農・生物生産）
○Yutaro Ota, Yuya Tsukuda, Keisuke Takamori, Ken-ichi Nihei (Utsunomiya Univ.)

【目的】

W493 Aは，*Fusarium* sp.から単離された長鎖脂肪酸骨格を含むシクロデプシペプチドである．この化合物はイネごま葉枯病菌(*Cochiobolus miyabeanus*)の菌糸に球状の形態異常を誘導し抗真菌性を示すので，有用な抗真菌性農薬の開発における重要分子の一つと考えられる．ところが現段階ではその構造決定が行われたのみであり，作用機序の詳細については明らかではない．そこで，効率的な誘導体の化学合成経路の開拓と構造−活性相関の解析を目指して，W493 Aの全合成研究を行った．



【方法および結果】

W493 Aは，6つのアミノ酸と3-ヒドロキシ-4-メチルテトラデカン酸(HMTA)のフラグメントに分かれる．HMTA合成では，出発物質としてプロパルギルアルコールを用い，初めにそのヒドロキシ基をTHP基で保護した．次に*n*-BuLiによってアセチリド化した後，1-ブロモデカンを加えてアルキル化した．得られたアルキンからTHP基を除去し，Red-Alにより還元することで，トランス型アリルアルコールに変換した．このアリルアルコールをシャープレス酸化し，形成された不斉エポキシ環をMe_3Alで開環してジオールに導いた．このジオールの第一級水酸基に，メチシレンスルフォニル基を導入し，増炭反応を行ってニトリルを合成した．このニトリルを加水分解して，HMTAに変換した．

現在，得られたHMPAと6つのアミノ酸を用いて，W493 Aの固相合成の検討を行っている．

W493 A, cyclodepsipeptide, Sharpless asymmetric epoxidation

講演番号:4A06a12
講演日時、会場:3月25日11:21～ A校舎06会場

シコニンの紫外線保護効果における作用機構の特徴

Protection of CHO cell from UVB-induced damage by Shikonin

○伊藤 由加里、若生 豊[1]（八戸工大院機械・生化工）
○Yukari Itoh, Yutaka Wako[1] (Hachinohekoudai)

【目的】オゾン層破壊に伴い紫外線照射量の増大への対応が求められている。紫外線対策はサンスクリーンのみならず内因的に作用する成分の利用も進められている。シコニンの紫外線保護作用は抗炎症によることが示されているが不明の部分も多い。紫外線に対するシコニンの保護作用をビタミンC、アスタキサンチン等の作用と比較しシコニンの紫外線保護作用の特徴を明らかにすることを目的とする。
【方法】保護作用は培養細胞系（CHO）にて検討した。セミコンフルエントの細胞へ培地を除いた状態でクロスリンカーにより312nmの所定エネルギー量の紫外線を照射した。その後、細胞を試料含む培地で培養し保護作用を検討した。細胞活性はMTT法にて評価し、DNA損傷はアガロースゲル電気泳動によるラダー観察およびゲノム中の8-OHｄGの存在比率により評価した。生細胞全体の活性型カスパーゼを蛍光抗体色素により観察した。また、試験試料の抗炎症作用はRAW細胞によるLPS刺激NO産生に対する抑制活性より評価した。活性酸素（･OH）消去活性の評価はDNA酸化傷害抑制試験、およびデオキシリボース法により行い、一重項酸素消去活性はリノール酸のメチレンブルー光増感酸化を観る簡易法にて測定した。
【結果】シコニンの新たな薬理作用である紫外線保護作用の特徴を検討した。シコニンは約100ng/ml以下の範囲では紫外線保護作用を示すが、それ以上の濃度では細胞毒性が優勢となった。紫外線保護に対する容量作用比は他のビタミンCなどの保護物質と比較し、10～10^3 倍低い 。紫外線保護をもたらす特徴的な要因はシコニンの有する抗炎症作用が重要であることが示唆された。紫外線照射後６ｈ、カスパーゼの活性化が観察され、シコニン添加により抑制する傾向が示された。紫外線を照射した細胞ではDNAの低分子化が認められた。しかしDNA電気泳動では試料の紫外線保護効果を反映する低分子化の抑制は観察されなかった。また試験管内でシコニンおよびビタミンC、アスタキサンチン等の抗酸化作用をin vitro で観察した結果、これらにはDNA酸化傷害抑制試験による･OH抑制活性が認められた。一重項酸素消去はアスタキサンチンが顕著な活性を示すが、シコニンには認められなかった。DNA酸化傷害抑制作用について8-OHｄGでレベルからも評価する予定である。

Keyword1, Keyword2, Keyword3　Shikonin, ultraviolet radiation, DNA damage

講演番号：4A06a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ A校舎06会場

キノロン関連化合物の合成とその生物活性

Synthesis of quinolone-related compounds and their bioactivity

○丸山 尚見[1]，川井 悟[1]，常盤野 哲生[2]，中澤 伸重[2]，吉澤 結子[2]
([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Naomi Maruyama[1], Satoru Kawaii[1], Tetsuo Tokiwano[2], Nobushige Nakazawa[2],
Yuko Yoshizawa[2] ([1] Tokyo Denki Univ., [2] Akita Pref. Univ.)

【目的】近年、生物活性物質が標的とする生体分子を特定するために出芽酵母の遺伝子破壊株コレクションがさかんに利用されている。遺伝子破壊株では姉妹染色体のうち一方に変異が起っているが、もう一方の染色体により補われるため増殖可能である。しかし、遺伝子破壊株における当該遺伝子産物タンパク質の量は野生株より少なく、当該タンパク質の阻害物質に対する感受性は高い。一方，当該タンパク質以外の阻害物質に対する感受性については野生株と遺伝子破壊株の間で差異はない。すなわち、遺伝子破壊株の薬物感受性は野生株よりも高く、薬剤添加することによりハプロ不全が表現型として表れることになる。この現象を利用して化合物ライブラリーのスクリーニングを行うことで、特定遺伝子産物に特異的な阻害物質を選抜することが可能となる。演者らは多剤耐性化阻害物質を探索するため、これまでにフラボノイド類やクマリン類などをモデル化合物とした化合物ライブラリーの構築・拡充をはかっている。

本研究では、MTTを用いた出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*の増殖測定法の定量性を高めるとともに、代表的抗菌薬の基本骨格であるキノロン類をモデル化合物として、多剤耐性化阻害物質を探索的に合成することを目的としている。キノロン系抗菌薬は幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を有しており、さらに組織移行性が優れていることから、各種感染症に広く使用されており、現在も新規キノロン系抗菌薬の開発が進められている。

【方法】アニリン類とジエチルメチレンマロン酸ジエチルとの反応により、アニリノジエチルマロン酸ジエチルを合成し、これをジフェニルエーテル溶媒中で加熱することで閉環させ 3 位にエトキシカルボニル基を持つ化合物を合成した。これを塩基性条件下で脱保護することにより、3 位にカルボキシル基を持つキノロン類を得た。生物試験には出芽酵母 BY4743（野生株）および多剤耐性関連遺伝子破壊株（pdr）6 種を用いた。96 穴マイクロプレートに各遺伝子破壊株懸濁液と試料を加え、30 °C で 23 時間培養した。培養後、各ウェルに MTT 溶液を加えて、さらに 1 時間培養した。これを遠心分離して上清を除き、沈殿したホルマザンを DMSO に溶解して、マイクロプレートリーダーによりで吸光度（570 nm）を測定し、増殖率を算出した。

【結果】主に芳香環にアルキル基とハロゲン基を導入したキノロン類を合成し、その生物活性を調べた。その結果、特定の遺伝子破壊株に対して増殖抑制を示す化合物を得ることができた。

quinolone, haploinsufficiency

講演番号：4A06a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ A校舎06会場

フラボノイド関連化合物の合成とノックアウト酵母に対する増殖抑制効果

Synthesis of the flavonoid-related compounds and their growth-inhibitory activity of several knockout Yeast strains.

○田島知子[1]，川井悟 ，常盤野哲生[2]，中澤伸重[2]，吉澤結子[2] ([1]東電大院理工・生命理 ，[2]秋田県大生資科・応生科)

○ Tomoko Tajima[1], Satoru Kawaii, Tetsuo Tokiwano[2], Nobushige Nakazawa[2], Yuko Yoshizawa[2] ([1] Tokyo Denki Univ., [2] Akita Pref. Univ.)

【目的】多くの生物は、生体防御の一環として代謝反応による薬剤を無毒化や細胞外排出を行っている。薬剤の細胞外排出には、膜タンパクによる輸送が関与している。薬物代謝に関与する膜タンパクの特徴の一つに広い基質特異性があり、共通点のない様々な薬剤を基質として認識し、細胞外に排出する。この薬剤排出が、がん治療や真菌治療を困難にしている原因の一つとなっている。真菌や植物の保有する膜タンパク遺伝子pdrはABCトランスポーターをコードする遺伝子の一種であり、多剤耐性に関与していると考えられている。しかし、詳細な機能についてはまだ不明な点も多く、その機能解明が待たれている。フラボノイド類には真菌の多剤耐性を阻害し、増殖抑制効果を示すものも報告されていることから、多剤耐性のメカニズムを解明するためのツールとなることが期待されている。本研究では、種々のフラボノイド類縁体を合成し、一連の多剤耐性遺伝子破壊酵母株に対する増殖抑制効果を調べることで、多剤耐性遺伝子の機能解明の一助とすることを目的とした。

【方法】フラボノイド類の化合物ライブラリーを効率的に構築するために、代表的フラボノイド骨格であるフラバノン，フラボンおよび3-フラボノールそれぞれを、共通中間体となる2'-ヒドロキシカルコン類から合成するための反応条件を検討した。なお、2'-ヒドロキシカルコン類はσ-ヒドロキシアセトフェノン類とベンズアルデヒド類のClaisen-Schmidt縮合により調製した。その結果、2'-ヒドロキシカルコン類をH_2O_2，NaOH存在下で反応させ3-フラボノール骨格を構築した。また、同じく2'-ヒドロキシカルコン類を酢酸ナトリウム存在下で環化させてフラバノン類を合成した。さらに、2'-ヒドロキシカルコン類をI_2存在下で処理することによりフラボン類を合成した。薬剤感受性試験には出芽酵母*Saccharomyces cerevisia*の野生株と6種のpdr遺伝子破壊株を使用し、MTTによる吸光光度法分析法により増殖率を求めた。

【結果】今回は特にフラボノイド骨格B環に種々のハロゲン基を導入した化合物を中心に化合物ライブラリーの拡充をはかった。化合物ライブラリーの生物活性を調べたところ、特定の遺伝子破壊株の増殖を選択的に抑制するフラボノイド数種類が確認できた。中でも、pdr1ノックアウト株の増殖を選択的に抑制する化合物が比較的多く得られたことから、pdr1遺伝子が多剤耐性に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、B環にフルオロ基を持つフラボノイドは多くのノックアウト株に顕著な増殖抑制効果を示したが、フルオロ基以外のハロゲン基には増殖抑制効果を示さないことが明らかとなった。

Flavonoids, S.cerevisia, KnockoutYeast

講演番号：4A06a15
講演日時、会場：3月25日11:54～ A校舎06会場

スチルベノイドの合成と遺伝子破壊出芽酵母に対する影響

Synthesis of stilbenoids and their antiproliferative activity on the gene-knockout strains of *Saccharomyces cerevisiae*

○倉持晴樹[1]、潮見あずさ[1]、山本夕貴[1]、川井悟[1]、常盤野哲生[2]、中澤伸重[2]、吉澤結子[2]（[1]東電大理工、[2]秋田県大生資科）

○Haruki Kuramochi, Azusa Shiomi[1], Yuki Yamamoto[1], Satoru Kawaii[1], Tetuo Tokiwano[2], Nobushige Nakazawa[2], Yuko Yoshizawa[2] ([1] Tokyo Denki Univ., [2] Akita Pref. Univ.)

【目的】病原菌の多剤耐性化は、真菌症化学療法における克服すべき問題である。病原菌の多剤排出トランスポーターが、化学構造や作用機序の異なる多様な薬剤を細胞外へ排出することで多剤耐性化することが知られている。しかし一種類の多剤排出トランスポーターが様々な薬剤を排出することは、生物学では例外的現象であり、その本質解明が期待されている。そこで本研究では、病原菌の薬剤耐性化のメカニズム解明の一助となるため、出芽酵母の遺伝子破壊コレクションを用いたスクリーニング法により、多剤排出トランスポーター阻害物質の探索・創製と、阻害物質が標的としている細胞内分子の同定を進めている。

この一環としてスチルベノイド類をモデル化合物とし、多様な官能基や複素環を導入したスチルベノイドを系統的に合成し、多剤耐性化遺伝子破壊株に対する増殖抑制効果を調べている。スチルベノイド類はラン科植物などに含有され、レスベラトールの抗炎症、抗がん、抗菌、抗酸化作用などの興味深い生物活性を示すことが報告されている。

【方法】スチルベノイド類のシス・トランス異性体間の生物活性差に興味があること、また多様な様式で多種の官能基や複素環を導入させるために二つの芳香環を異なる出発物質に求めることができることの理由により、スチルベノイド類の合成にはWittig反応を採用した。ハロゲン化ベンジル類から調製したホスホニウム塩とベンズアルデヒド類を塩基性条件下で反応させ、シス体とトランス体の混合物としてスチルベノイドを合成し、その後カラムクロマトグラフィーにより両異性体を分離した。またアミノスチルベン類の合成では、まずニトロスチルベン類を合成し、酸性下で亜鉛により還元することで、二重結合を残したままニトロ基のみ選択的に還元してアミノスチルベン類とした。出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*ホモ二倍体株および多剤耐性化遺伝子破壊株6種に対する増殖抑制活性により、合成したスチルベノイドの生物活性を評価した。

【結果】OH基、アルキル基、ハロゲン基、ニトロ基、アミノ基、複素環などの導入を試み、約60種のスチルベノイドを合成した。それぞれの化合物に対し増殖抑制試験を行った結果、一方のベンゼン環にのみOH基を導入したスチルベノイドが顕著な活性を示す傾向にあった。アミノスチルベン類は、pdr1Δ株およびpdr16Δ株に選択的活性を示した。またピリジル環を導入したスチルベノイドはpdr1Δ株に選択的活性を示した。さらに、各遺伝子破壊株に対する増殖抑制活性（IC_{50}）をもとにした主成分分析により、構造と活性に関する知見が得られたので、あわせて報告する。

Stilbenoids, Wittig reaction, *Saccharomyces cerevisiae*,

講演番号：4A07a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ A校舎07会場

抗菌ペプチド「アピデシン」の可変領域への変異導入とその抗菌活性への影響

Variation region mutants and the effects to antimicrobial activitiy of antimicrobial peptide “Apidaecin”.

○三宅 政裕、岩村 雄太、松本 謙一郎、橋本 茂樹[1]、大井 俊彦、田口 精一（北大院・工・生機高、[1]東理大・基礎工）

○Masahiro Miyake, Yuta Iwamura, Ken’ichiro Matsumoto, Shigeki Hashimoto[1], Toshihiko Ooi, Seiichi Taguchi (Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.、 [1]Fac. Ind. Sci. Tech., Tokyo Univ. Sci.)

【目的・背景】

抗菌ペプチドは生物が持つ自然免疫を担う分子の一種であり、既存の抗菌剤である抗生物質に比して人体や環境に対する負荷が少ない新しい抗菌物質として注目されている。本研究において研究対象としている「アピデシン」はミツバチ由来の抗菌ペプチドであり、大腸菌をはじめとするグラム陰性菌に対して静菌的に作用する。アピデシンは標的となる菌の細胞膜を破壊することなく細胞内に導入し、細胞内の何らかの標的と相互作用を起こし、菌の成長を止めると考えられている。アピデシンはGNNRPVYVIPQPRPPHPRLという18のアミノ酸残基から構成され、N末端の1～3残基および6～8残基（下線部）は、アピデシンと相同性を有する他の抗菌ペプチドとの間で保存性が低く、可変領域と考えられている。これまでの研究で、可変領域の一部であるN末端3残基に変異を導入することで、大腸菌に対して約10倍の抗菌活性を有するアピデシンRVR変異体を取得することに成功していた。また、このアピデシンのRVR変異体を蛍光標識し、細胞内導入量を測定したところ、野生型に比べ細胞内導入量が増加したことが分かったため、この変異体は細胞内導入効率の上昇によって活性が強くなったと考えられた。本研究では、さらなる高活性変異体の取得を目的として、他の可変領域である6～8残基の領域のうち、アピデシン類似体との間で最も保存性の低いN末端7残基目に変異を導入して高活性体取得を試みた。

【方法と結果】

アピデシンのN末端7残基目を他のアミノ酸残基に置換したアピデシン変異体を10種作製し、大腸菌に対する抗菌活性を最小発育阻止濃度（MIC）の測定により評価した。その結果、野生型に比べて抗菌活性が4倍に上昇した変異体を取得することができた。また、一部の変異体では逆に活性が低下または消失した。作製した変異体の大腸菌細胞内への導入量を調査したところ、活性を失った変異体も細胞内に導入されていたことから、抗菌活性の低下は作用標的との相互作用が弱まったためと推定された。次に、N末端3残基の変異と7残基目の変異を組み合わせることによる活性への影響を調べた。組み合わせた変異体の大腸菌に対する活性を測定したところ、相乗効果により最大で16倍の活性上昇がみられた。さらに、本研究によって得られたアピデシン変異体の抗菌スペクトル解析のため、数種の被検菌に対して抗菌活性測定を行った。その結果、変異導入により抗菌スペクトルが大きく変化することが分かった。

antimicrobial peptides, natural immunity, bacteria

講演番号：4A07a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ A校舎07会場

セリン構造を利用したSARS 3CL protease 阻害剤の合成と評価

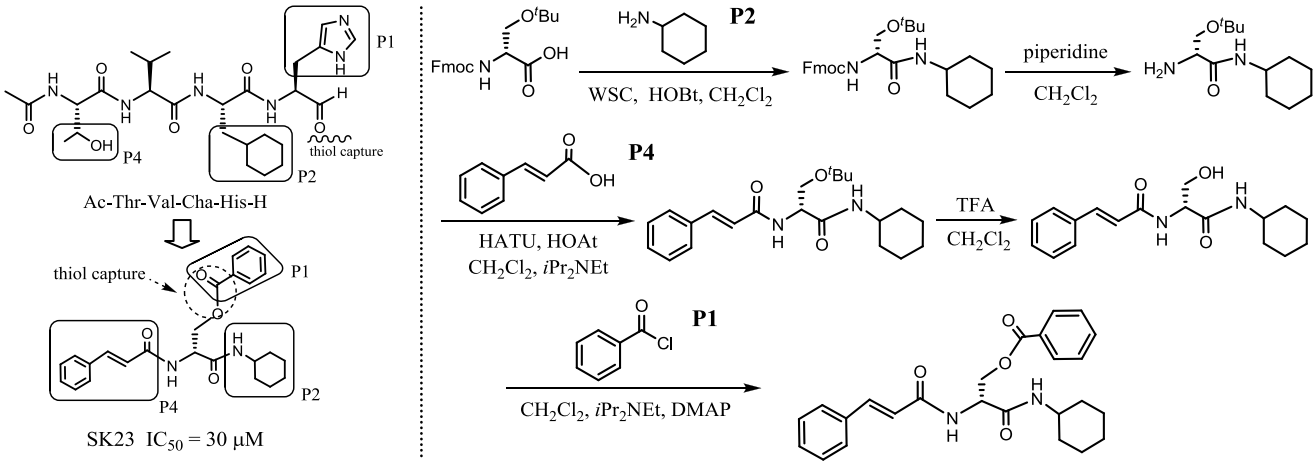
Synthesis and evaluation of SARS 3CL protease inhibitors using the serine template

○ 高沼　大樹，石井　学，赤路　健一[1]，今野　博行（山形大院理工・バイオ化学、[1]京都薬大）
○ Daiki Takanuma, Manabu Ishii, [1]Kenichi Akaji, Hiroyuki Konno (Yamagatadai, [1]Kyotoyakudai)

【目的】重症急性呼吸器症候群（Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS）は SARS コロナウィルスにより引き起こされる新型肺炎である。このウィルスが宿主細胞で増殖に必須なプロテアーゼである SARS-CoV 3CL protease は抗 SARS 薬開発における重要な標的蛋白質である。演者らの研究グループは 3CL protease の安定性を高めた R188I mutant の作成と簡便で精度の高い評価系の確立を行い [1)]，さらに強力な阻害活性を有するペプチドアルデヒド（Ac-Thr-Val-Cha-His-H : IC_{50} = 98 nM）の開発に成功している [2)]。しかしながらチオールキャプチャーとしてアルデヒドをもつため，酵素選択性や化合物安定性に改良の余地があった。そこで演者らは新しいコンセプトに基づいたエステル系阻害剤の開発を行うことにした。

【方法】阻害剤のデザインはセリンをテンプレートにして，演者らが最適化した P1, P2, P4 の各部位を修飾した。阻害剤 Ac-Thr-Val-Cha-His-H の構造を基に低分子化を試み，構造と合成の簡略化を図った。すなわち合成法は Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH を原料としカルボン酸部分を P2，アミン部分を P4，水酸基部分を P1 にそれぞれ導入し，全５工程とした。今回は P1 ならびに P2 部分を中心に構造活性相関を行った。合成した化合物の阻害活性評価は，R188I mutant を用いて行った。

【結果】様々な官能基を導入した化合物の合成とアッセイを検討した結果，P1 位には Bz 基または 2-メチル-6-ニトロベンゾイル基が，P4 位には trans-桂皮酸が有効であった（SK23 : IC_{50} = 30 μM）。現在は P2 位修飾を検討しており，その詳細を報告する。



1) Akaji K. Konno H. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 9400-9408.
2) Akaji K. Konno H. *et al. J. Med.Chem.* in press

SARS, 3CL protease inhibitor, serine template

講演番号：4A07a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ A校舎07会場

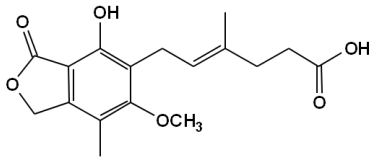
ミコフェノール酸6’位誘導体化による新規HDAC阻害剤開発の検討(2)

Synthetic study of mycophenolic acid derivatives as novel HDAC inhibitors

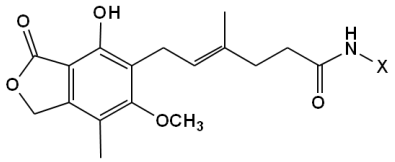
○春原　和宏、重冨　顕吾、三橋　進也、生方　信（北大院農）
○Kazuhiro Sunohara, Kengo shigetomi, Shinya Mitsuhashi, Makoto Ubukata (Hokudai)

【目的】ミコフェノール酸(Mycophenolic acid, MPA, **1**)は*Penicillium* sp.から単離構造決定された生理活性物質である。MPAはイノシン一リン酸脱水素酵素(IMPDH)を阻害することで免疫抑制剤として用いられている。当研究室の研究ではMPAの6’位をヒドロキサム酸に誘導体化したミコフェノールヒドロキサム酸(MPHA, **2**)がヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)を阻害することを明らかにした。しかしMPHAのHDAC阻害活性は代表的なHDAC阻害剤に比べ弱い。従って本研究では活性中心の亜鉛イオンとの親和性に着目し、HSAB則や他の亜鉛イオンを含む酵素阻害剤の構造を基に硫黄原子や窒素、硫黄を含むヘテロ環を導入した亜鉛配位子官能基を持つミコフェノールメルカプタム酸(MPMA, **3**)および各種ヘテロ環化合物(**4**-**8**)の合成を行った。

【実験方法・結果】各化合物を合成するに際して、最初にMPAの7位フェノール性水酸基をTBSで保護し、6’位カルボキシル基の化学修飾を試みた。**3**についてはまず得られた7-*O*-TBS-MPAと$TrSNH_2$との縮合を行った。EDC、クロロ炭酸エチル、CDIによるカルボキシル基の活性化では**3**を合成できなかったため、オキサリルクロライドを用い酸クロライドとすることで縮合を達成した。そしてTBAFによる脱TBS、Tr基の脱保護により**3**の合成を目指した。Tr基の脱保護はまず一般的な条件である過剰量のTFA、トリエチルシランにより行った。この条件ではMPMA生成後、さらに還元が進み、ミコフェノールアミドが生成した。またTFAによる条件では**3**の生成後溶存酸素などによる酸化が進行することで2量体とその過酸化物が生成した。したがって現在凍結脱気処理後等量反応での脱保護を検討中である。**4**-**8**は7-*O*-TBS-MPAをクロロ炭酸エチル、CDI、オキサリルクロライドを用い活性化した後、各種ヘテロ環化合物との縮合を行った。得られた化合物をTBAFにより脱保護し各化合物の合成を達成した。得られた化合物を用いた細胞増殖抑制試験を現在検討中である。



Mycophenolic acid (MPA,**1**)



2 X =OH (MPHA)
3 X =SH (MPMA)
4 X =3-amino-1,2,4-triazole
5 X =4-amino-1,2,4-triazole
6 X =2-aminothiazole
7 X =2-amino-1,3,4-thiadiazole
8 X =5-aminotetrazole

The structure of MPA derivatives

Mycophenolic acid, Histone deacetylase

講演番号：4A07a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ A校舎07会場

アスパラギン合成酵素の新規阻害剤の創製－ガン化学療法への新展開－

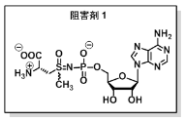
Development of Novel Inhibitors of Human Asparagine Synthetase -A New Paradigm for Cancer Chemotherapy-

○池内 秀幸、Ahn Yong-Mo*、音川 拓哉、渡辺 文太、Richards G. J. N.*、平竹 潤（京大化研、*フロリダ大学）

○Ikeuchi, H; Ahn, Yong-Mo*; Otokawa T; Watanabe, B; Richards, G. J. N.*; Hiratake, J (ICR, Kyoto Univ., *Univ. of Florida, USA)

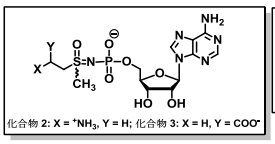
【目的】

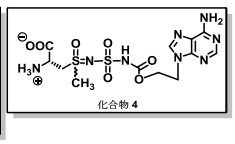
急性リンパ性白血病（ALL） に対する化学治療の第一選択肢にアスパラギナーゼ療法がある。これは血中Asn濃度を下げることで腫瘍細胞の増殖を阻害する化学療法であるが、ヒトのアスパラギン合成酵素（hAS）を高発現している腫瘍細胞に対しては効果が薄く、十数%の割合で**再発**を招く。その原因のひとつに、腫瘍細胞による hAS の誘導と高発現が指摘されている。そこで、hAS の特異的阻害剤は、ALLに対するアスパラギナーゼ療法の治療効果を高め、**再発の克服**が可能となるばかりでなく、hAS 発現量の高い他のガン種（卵巣ガン等）に対しても、本治療法の適用範囲を拡張することができる。本酵素反応の遷移状態に基づいて開発された阻害剤 **1** は、*in vitro* でhASを強く阻害したが（K_I^* = 24 nM）、白血病細胞の増殖阻害活性は十分ではなかった（IC_{50} = 1 mM）。これは、多数の親水性基のため、**1** の細胞膜透過性に問題があると思われる。そこで、**1** のファーマコフォアを残しつつ、親水性官能基を除去した類縁体を合成し、hASに対する阻害作用とガン細胞に対する効果を調べた。



【実験方法】

阻害剤 **1** のα-カルボキシおよびα-アミノ基を除去した化合物 **2**、**3** および、リン酸基を*N*-アシルスルファミド基に改変した化合物 **4** をそれぞれ合成し、hASに対する阻害活性とアスパラギナーゼ耐性ガン細胞増殖阻害試験で評価した。





【結果と考察】

カルボキシ基を欠く化合物 **2** は、予想に反し、非常に強い hAS 阻害活性を示した（K_I^* = 7.6 nM）。一方、アミノ基を欠く化合物 **3** の阻害活性は、**1** よりかなり低下した（K_I^* = 141 nM）。このことより、hASは、α-アミノ基を強く認識するが、α-カルボキシ基はあまり認識していないことが示唆され、モデリングにより、実験事実が支持された。また、化合物 **2** は阻害剤 **1** よりも低濃度で細胞増殖を阻害したばかりでなく（IC_{50} = 0.1 mM）、アスパラギナーゼの有無に関わらず、細胞死を引き起こすことが確認された。化合物 **2** は、分子全体の電荷がゼロであるため、阻害剤 **1** よりも細胞膜透過性に優れ、強い活性を示したと考えられる。細胞死が引き起こされた事実は、hASが抗ガン剤の新たな標的となる可能性を示唆する結果である。一方、化合物 **4** には阻害活性がなく、*N*-アシルスルファミド基はリン酸基のミミックとならないことが示された。

leukemia, human asparagine synthetase, transition-state analog inhibitors

講演番号:4A07a05
講演日時、会場:3月25日09:44～ A校舎07会場

抗腫瘍活性分子Nitidineの光照射による活性増大

Enhancement of tumor selective cytotoxicity of Nitidine by photoirradiation

○岩崎 公典、屋 宏典（琉大・熱生研）
○Hironori Iwasaki, Hirosuke Oku (Ryudai)

【目的】　植物アルカロイドのNitidine (NTD)は、ヒト肺腺がん細胞（A549）に対する特異性が高いことが明らかにされており、その特異性には細胞内NTD蓄積量が大きく関係している。　NTDはミトコンドリア内に特異的に蓄積することも明らかになっており、その蛍光観察像から、NTDはほぼ飽和濃度でミトコンドリア内に存在していることが明らかになっている。　一般的に蛍光物質は励起光によるエネルギーを蛍光として放出するほかに、内部転換により熱エネルギーとしても放出することが知られている。　NTDはミトコンドリア内に高濃度に蓄積しており、励起光を照射することで、熱ストレスを発生させる可能性が示唆された。　近年、化学療法と光療法の併用は極めて低副作用の複合療法として注目されており、創薬において光-分子間相互作用は重要な研究テーマとなりつつある。　そこで本研究では、NTD蓄積細胞への励起光照射による細胞毒性の増大を評価することを目的とした。
【方法】　A549細胞及び正常ヒト肺線維芽細胞(WI-38)にNTD処理を施し、励起波長に相当する370nm付近の紫外光を照射した。　24時間後に細胞毒性を測定し、NTD存在下における紫外線照射の影響を評価した。
【結果】　実験の結果、培地中に溶存しているNTDは紫外線照射による細胞毒性の増大を示さなかった。　一方、NTDが蓄積したA549細胞では、紫外線照射時間の増加にともない、顕著に細胞毒性が増大した。　NTD単独処理では細胞毒性を示さなかった濃度域においても、紫外線照射により著しい細胞毒性の増大が認められた。　NTD未処理のA549細胞では紫外線照射のみによる細胞毒性は観察されていない。　また、NTDの細胞内蓄積をほとんど示さないWI-38細胞では、いずれの条件においても細胞毒性は観察されなかった。　これらの結果から細胞内に蓄積したNTDは、紫外光励起により細胞毒性を増大させることが明らかになった。　今回の実験条件では、紫外線照射は数分以内であり、非常に短時間に細胞毒性が発現していると考えられた。　すなわち、NTDの細胞内蓄積による細胞毒性はNTDの化学的性質に起因しているが、紫外線照射により増大した細胞毒性はおそらく物理的な要因によるものであると考察された。

cytotoxicity, optical treatment, chemotherapy

講演番号：4A07a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ A校舎07会場

アミノピリジンを用いた非ペプチド性低分子BACE1阻害剤の設計と合成

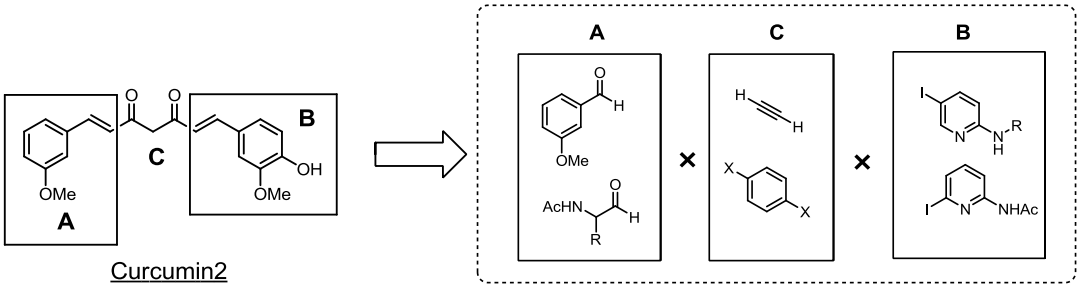
Design and synthesis of non-peptidyl BACE1 inhibitors with the aminopyridine moiety.

○齋藤　悠冴、青木　英郎、遠藤　仁、赤路　健一[1]、三城　明[2]、今野　博行（山形大院理工・バイオ化学、[1]京都薬大、[2]プロテインウェーブ）

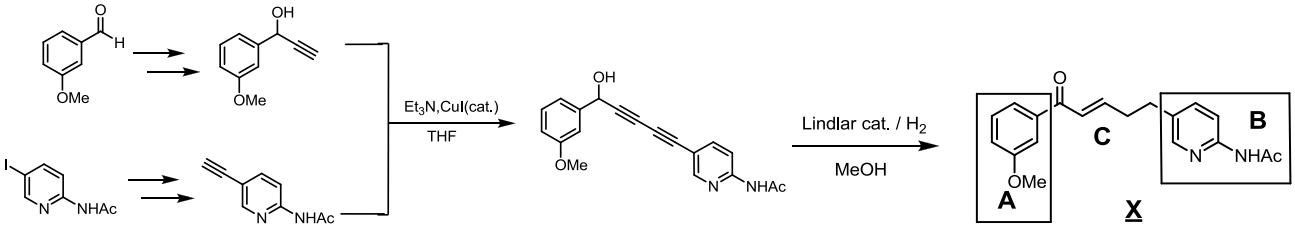
○Yugo Saito, Hideo Aoki, Hitoshi Endo, Keniti Akaji[1], Akira Sanjho[2], Hiroyuki Konno (Yamagatadai, [1]Kyotoyakudai, [2]Proteinwave)

【目的】アルツハイマー病（AD）の一つの原因として、amyloid β（Aβ）が脳内で凝集し、沈着することがあげられる。この Aβ 生産に深く関連しているプロテアーゼが BACE1（β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme type 1)であり、現在 BACE1 に対する阻害剤開発が AD 治療薬として最も期待されている。我々はクルクミン 2[1)] とアミノピリジン誘導体[2)] が、BACE1 阻害に少なからず有効であることに着目した。これを基にアミノピリジン誘導体を持つクルクミン類似化合物の分子設計, 合成ならびに阻害能評価を行うことにした。

【方法と結果】クルクミン 2 を 3 つのパーツに分け、A は P_4 ポケットを意識し主にクルクミン由来の芳香環部またはアミノ酸、B には P_1 ポケットと相互作用が期待できるアミノピリジン由来の誘導体、この 2 つを繋ぐリンカーとして脂肪鎖または芳香環 C を導入した。



デザインした化合物を A と B 別途調製し主に園頭反応やグレーサー反応を用いるカップリング反応で目的化合物へと導いた。また活性の向上を期待し、縮合反応によりアミノ酸やその類似体を縮合した。



次に、合成した化合物に対しリコンビナント BACE1 を用いてアッセイ試験を行い、阻害能を評価した。その結果、化合物 X が0.4 mM で 60 % の阻害率を示した。合成した他の化合物の阻害能について併せて報告する。

1)F. Yang, *et al. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5892-5901.

2)C. Murray, *et al. J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1116-1123.

Alzheimer Diseases, BACE1 inhibitor, Amyloid β

講演番号：4A07a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ A校舎07会場

非ステロイド性抗炎症薬のプロドラッグ化修飾と皮膚透過性の評価

Prodrug derivatization of non-steroidal anti-inflammatory drugs and evaluation of their skin permeability.

○森　亮貴[1]、柴田　将義[1]、守金　大蔵[2]、高橋　秀久[3]、稲垣　穣[1]
([1]三重大院・生資、[2]ダイヤ製薬株式会社、[3]ＡＴＭ株式会社)
○Akitaka Mori[1], Masayoshi Shibata[1], Daizou Morikane[2], Hidehisa Takahashi[3], Minoru Inagaki[1]
([1]Faculty of Bioresources, Mie university, [2]DIA Pharmaceutical Co., Ltd., [3]ＡＴＭ Co., Ltd.)

【目的】皮膚は角質層、表皮、真皮、皮下組織から成る多層構造を有しており、角質層では水溶性物質、その内側の表皮では脂溶性物質の侵入・拡散を阻むバリヤー機能を有する。しかし、そのようなバリヤー機能にも関わらず一部の化合物が皮膚を透過し、さらに血管中にまで浸透する経皮吸収が起こる例があり、安全な薬剤の投与法のひとつとして注目されている。そこで本研究では、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の分子構造を化学的に修飾した誘導体を合成し、それらの皮膚透過性を評価することで経皮吸収が可能なプロドラッグを見出すことを目的とした。
【方法】NSAIDs のジクロフェナクやインドメタシンなどを選択し、様々なエステル誘導体を合成した。次にヘアレスマウス皮膚を用いた透過実験(Fig. 1)を行った。上部のドナー液から皮膚を通過して下部のレセプター液に浸透した化合物を HPLC で分析し、透過量を計測した(Table 1)。
【結果】レセプター液からエステルが切断された薬剤のみが検出されたことから、誘導体がプロドラッグとして機能することが分かった。皮膚透過の傾向として、分配係数が大きくなるほど透過性が低下し、分配係数がジクロフェナクより小さい、あるいは近い誘導体で透過性の低下が抑えられていた。そのため、ジクロフェナクでは親水性の高いアルコールによる修飾が有効であると考えられた。また、そのような誘導体は母体の薬剤よりドナー液中の濃度を高めることができるため、透過量を高めることが可能であった。それに対し、インドメタシン誘導体では分配係数と透過性の間に一定の傾向が認めにくく、ある種の化合物(エチレングリコールやオクタノールなど)のエステルで高い透過性が見られた。

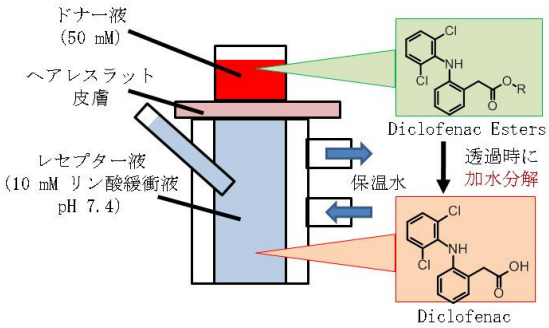


Fig. 1　皮膚透過実験の模式図

Table 1　ジクロフェナク誘導体の皮膚透過実験結果

R-OH	分子量	分配係数	ドナー液の基材	6時間後のレセプター液濃度(μM)	相対透過率* (%)
H	295	4.1	Dioxane/Propylene Glycol = 1/1	7.44 ±1.32	100
Methanol	309	4.3	〃	3.42 ±0.40	46
Ethanol	323	4.6	〃	2.06 ±0.24	28
1-Butanol	351	5.6	〃	1.68 ±0.08	23
1-Octanol	407	8.2	〃	0.63 ±0.18	9
1-Tetradecanol	491	—	〃	—	0
Cyclohexanol	377	5.3	〃	0.13 ±0.01	2
Piconol	386	4.5	〃	2.33 ±0.36	31
(-)-Borneol	431	5.2	〃	0.65 ±0.02	9
l-Menthol	433	—	〃	0.10 ±0.01	1
Ethylene Glycol	339	3.5	Ethanol/Propylene Glycol = 1/1	4.99 ±0.06	67
Propylene Glycol	353	4.5	〃	4.25 ±0.46	57
Butylene Glycol	367	4.5	〃	3.78 ±0.37	51

＊ ジクロフェナクの透過量を100とした場合の各誘導体の相対透過率

skin permeation, NSAIDs, prodrug

講演番号：4A07a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ A校舎07会場

基質ポケット近傍の相互作用を利用したデオキシノジリマイシン型アミラーゼ阻害剤の合成と活性

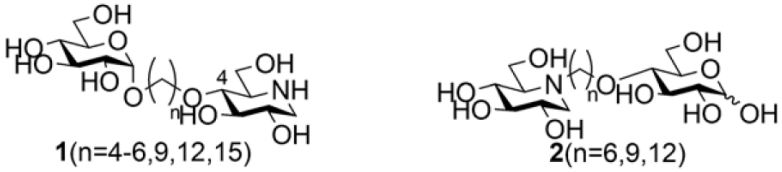
Synthesis and Activity of Deoxynojirimycin Based Amylase Inhibitor Utilizing Properties of Substrate Pocket

○野澤裕介、山田有二、加藤英介[1]、川端　潤[1]（北大農、[1]北大院農）

○Yusuke Nozawa, Yuji Yamada, Eisuke Kato[1], Jun Kawabata[1] (Fac. Agr. Hokkaido Univ., [1]Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ.)

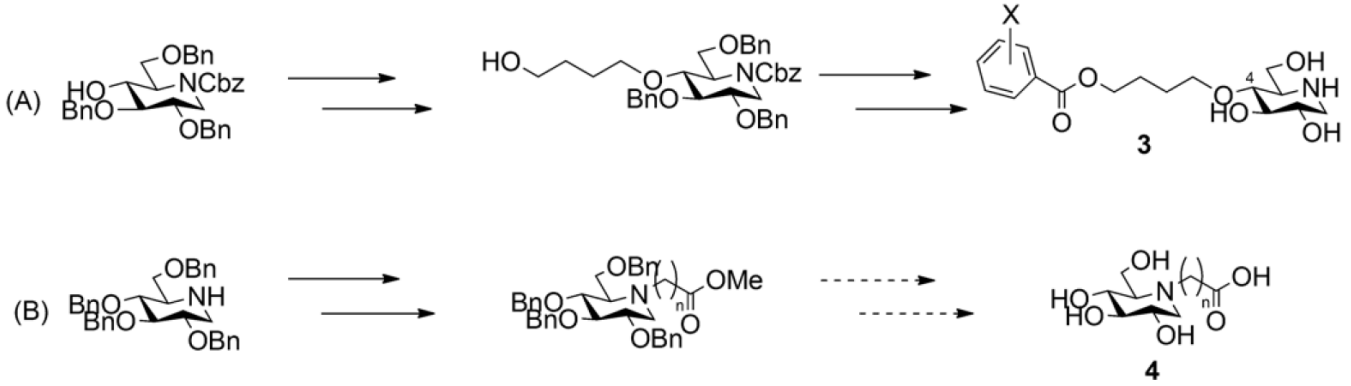
【目的】

我々は、近年世界規模で増加している二型糖尿病の治療や病態改善に有用な低分子α-アミラーゼ阻害剤の合成を行っている。以前の研究では、1-deoxynojirimycin(DNJ)の 4 位の水酸基又は窒素原子にリンカーを介してグルコースを繋いだ化合物 **1**，**2** の合成を行った。その結果、**1** はリンカーを長くすると阻害活性が上がることから疎水性相互作用が阻害に寄与する事が分かった。一方、**2** は非常に弱い阻害活性しか示さなかった。そこで、本研究では **1** のように疎水性相互作用を利用した阻害剤 **3** を設計した。また、アミラーゼの結晶構造より、DNJの窒素側に酸性官能基を結合させるとアミラーゼの塩基性アミノ酸残基と相互作用すると考えられたため、**4** も設計した。



【方法・結果】

化合物 **3** はDNJの 4 位水酸基にリンカーをつけ、そこに各種置換基を有した安息香酸を縮合させることにより合成した(Scheme A)。置換基としては無置換、フッ素、ヒドロキシ基などを選んだ。化合物 **4** はDNJとアルデヒドを還元的条件下縮合して合成している(Scheme B)。現在、各化合物のアミラーゼ阻害試験を行っている。



Scheme

1-deoxynojirimycin, alpha-amylase inhibitor, diabetes

講演番号：4A07a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ A校舎07会場

甘草エキス薬効評価のためのメタボローム解析の活用

Application of metabolome analysis for drug evaluation of Kanzo (licorice)

○原田 和生、小田 知佳、平田 收正　(阪大院・薬)
○Kazuo Harada, Tomoka Oda, Kazumasa Hirata (Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)

【目的】

生薬は複数成分の相互作用による薬効発現が特徴的である．しかし，成分プロファイルが均一な材料の大量調達は困難であり，同一種の生薬を用いても薬効にばらつきが生じやすく，未だに生薬を敬遠する医療関係者も多い．そのため，異なった成分プロファイルパターンをもつ生薬の薬効を予測する評価系の開発が求められている．本研究では，特に供給不足が懸念されている甘草を題材とし，抽出エキス成分のメタボロームデータと培養細胞を用いたアッセイによる薬効評価データとの相関解析により，単一成分ではなく，網羅的な成分パターンを用いた新規生薬品質評価法の開発を目的としている．

【方法と結果】

サンプルは市販されている甘草エキスと当研究室で栽培したウラル甘草(*Glycyrrhiza uralensis*，栽培期間，0.5，1，2年)から熱湯抽出したエキスを使用した．これらのエキスをLC/PDA/MSを用いたメタボローム解析とマウスマクロファージRAW 264.7を用いたアッセイに供した．後者は抗炎症作用の指標として用いられるNO産生抑制率を測定した．得られたメタボロームデータを説明変数，NO産生抑制率を目的変数として，projection to latent structures regression (PLS)を行った．その結果，UV 254 nmのクロマトグラムのパターン，およびMZ mineにより作成したMS検出ピークリストを用いた際に，非常に高い精度でNO産生抑制率を予測することが可能であった．さらにリグレッションベクトルを確認したところ，甘草の主要成分であるglycyrrhizic acid，liquiritinの他にいくつかの化合物の寄与も確認された．これらの化合物は，単に甘草の根においてglycyrrhizic acid，liquiritinの含量と相関が高い為，寄与しているように見えたのか，それとも真に抗炎症作用を有しているのか，について詳細な検討が必要である．

licorice, metabolome, macrophage

講演番号：4A07a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ A校舎07会場

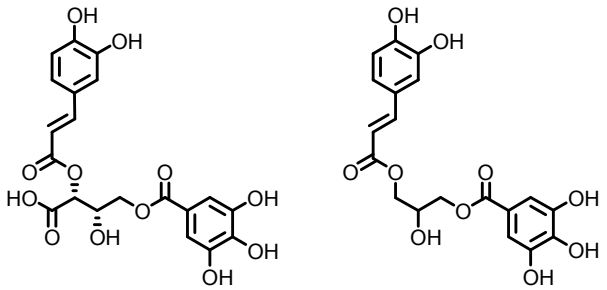
トリグリセリドを模倣したポリフェノールエステル誘導体の合成とリパーゼ阻害活性

Synthesis and pancreatic lipase inhibitory activity of the polyphenol ester derivative which mimics triglyceride

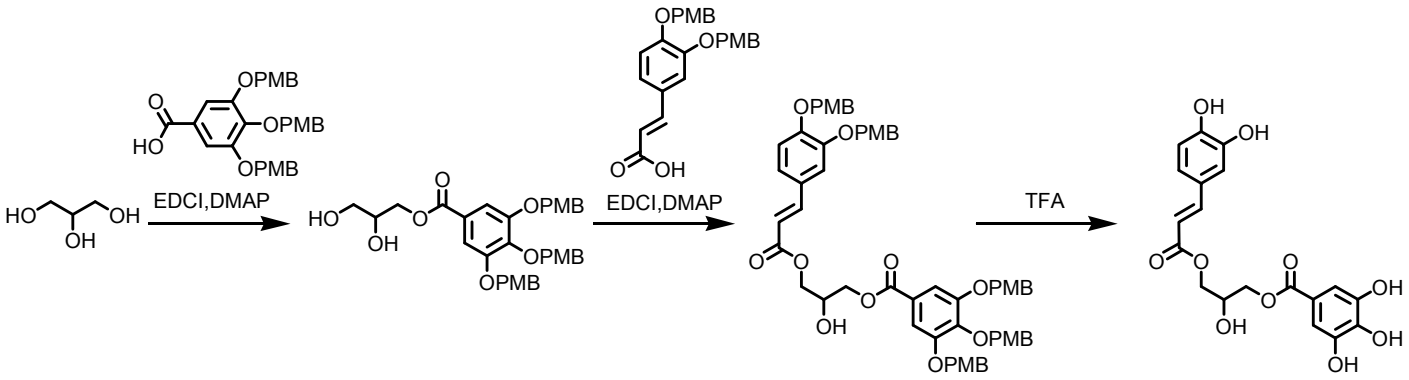
○米本　龍太、加藤　英介[1]、川端　潤[1]（北大農、[1]北大院農）
○Ryuta Yonemoto , Eisuke Kato [1] , Jun Kawabata [1]　（Fac. Agr. Hokkaido Univ. , [1]Grad. Sch. Agr.）

【目的】近年、食事の高脂肪化が顕著になってきており、脂質吸収予防、改善を目的とした食品成分が注目されている。食事に含まれる脂質の主成分であるトリグリセリドは、摂取されると膵臓から分泌されるリパーゼによって加水分解され、小腸で吸収される。このリパーゼの働きを阻害すれば、脂質は小腸で吸収されずに体外に排出される。リパーゼを阻害する薬剤は存在するが、副作用があり、使用には難もある。オニシモツケ(*Filipendula camtschatica*)から単離された化合物**1**は高いリパーゼ阻害活性を示し、この化合物は脂質に類似した構造をしているため、簡略化した**2**にもリパーゼ阻害活性が期待できる。そこで、**2**を合成してリパーゼ阻害活性を調べることとした。

【方法・結果】化合物**2**の合成は、glycerolとgallic acid、caffeic acidを順にエステル化により連結させるスキームによって行った。現在、活性について検討中である。また、エステル結合部位の位置異性体についても合成している。



1　　**2**



Scheme

Lipase inhibitor , pancreatic lipase , metabolic syndrome

講演番号：4A07a11
講演日時、会場：3月25日11:00～ A校舎07会場

希少糖とそれらの脂肪酸エステル誘導体の抗線虫活性

Anthelmintic activities of rare sugars and their fatty acid ester derivatives

○砂古口博文、川浪康弘、何森　健[1]、佐藤正資（香川大・農、[1]香川大・希少糖研究セ）
○Hirofumi Sakoguchi, Yasuhiro Kawanami, Ken Izumori, Masashi Sato (Fac. of Agric., Kagawa Univ., [1] Rare Sugar Res. Center, Kagawa Univ.)

【目的】人や家畜の寄生線虫症治療薬（抗線虫薬）に対する薬剤耐性虫の出現が深刻な問題となっている。そのため，従来の抗線虫薬とは全く異なる作用モードを持つ薬剤の開発が望まれている。演者らは自然界に微量しか存在しない糖（希少糖）の抗線虫活性を，モデル生物である*Caenorhabditis elegans*を用いて探索してきた。すでにD-グルコースのC-3エピマーであるD-アロースに成長阻害活性があることを報告している。今回，D-アロースの脂肪酸エステルの抗線虫活性について検討を行なった。糖をリード化合物とした抗線虫薬はなく，新しいクラスの薬剤の開発につながる可能性がある。

【方法および結果】同調培養によって得られた*C. elegans* 第一期(L1)幼虫をバイオアッセイに用いた。試験容器には24ウェルプレートを用い，液体培地中20℃で培養を行った。72時間後の死亡率からLC_{50}値を計算し，抗線虫活性の評価を行った。D-アロースと炭素鎖長の違う直鎖脂肪酸（C8, C10, C12）を，リパーゼを用いた位置選択的エステル化によって6-*O*-脂肪酸エステル(All-C8, All-C10, All-C12）とした。LC_{50}値はAll-C8 が 204 μM ,All-C12 が 343 μMであった。All-C10には1.25mMでも抗線虫活性が認められなかった。短鎖脂肪酸には抗線虫活性が報告されているが，演者らの方法でグルコース-C8エステルのアッセイを行ったところ抗線虫活性は認められなかったため，加水分解された短鎖脂肪酸が活性の本体であるという可能性は否定できた。D-アロースそのものの抗線虫活性は非常に弱いが脂肪酸エステル化によって活性が大幅に上昇した。これは誘導体化により，これらの物質の線虫体内への透過性が向上したためと考えられた。

Anthelmintic activity, rare sugar, *Caenorhabditis elegans*

講演番号：4A08a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ A校舎08会場

卵白リゾチーム由来抗菌ペプチドに関する研究

Antimicrobial peptides derived from egg white lysozymes

○荒木 朋洋、岡本 大、秋草 憲弥[1]、青木 秀男[1]、ソンポン タマシリラク[2]（東海大・農、[1]ドーモコーポレーション、[2]コンケン大・理）

○Tomohiro Araki, Dai Okamoto, Kenya Akigusa[1], Hideo Aoki[1], Sompong Thammasirirak[2] (Tokai Univ., DOMO Corp. [1], Khon Kaen Univ. [2])

【目的】リゾチームはN-アセチルムラミン酸とN-アセチルグルコサミン間のグリコシド結合を加水分解するムラミダーゼで，細菌の細胞壁を溶解することから溶菌酵素として知られている．このことから，リゾチームは生体防御タンパク質と考えられている．しかし，最近，リゾチームの熱処理標品や，酵素処理標品に抗菌活性が見出されたことから，この活性は非酵素的抗菌活性を示すペプチドの遊離の結果であると考えられている．一方，卵白には，比較的多量のリゾチームを含むものがあり，酵素的溶菌作用を期待するには量比がそぐわないケースも見られる．そこで，非酵素的抗菌活性のメカニズムとその利用を目的として，卵白リゾチーム由来の抗菌ペプチドの生成および諸性質について調べた．

【方法】グース卵白リゾチームは3倍量の0.05 Mリン酸緩衝液pH 7で抽出後，CMトヨパールで精製を行った．溶菌活性はM. Luteus を，キチナーゼ活性はグライコールキチンを基質に用いた．グースリゾチームの酵素処理は，リゾチームを80度C20分熱処理後，1/50 (W/W) のペプシンを用いて，pH2，37度C２時間消化を行った．断片化ペプチドの分離はC18逆相カラムを用い，TFA-アセトニトリル系溶媒，pH2で行い，リン酸―アセトニトリル系溶媒，pH6でリクロマトを行った．ペプチドの抗菌活性は，96穴マイクロタイタープレート上で100μlの菌体懸濁液と同容量のペプチド溶液を混合し，37度Cで3時間ごとに24時間550nmにおける吸光度を測定した．ペプチドのアミノ酸配列分析はLC-MS-MSデノボシークエンスとアミノ酸配列分析機を両用して行った．スッポン卵白および同リゾチームは，人工胃液（0.2%食塩，0.04%ペプシン，pH２）で分解を行った．

【結果】グースリゾチームのペプシン分解ペプチド画分で抗菌活性を示した部分についてペプチドを精製した．その結果2つのペプチドが強い抗菌活性を示した．これらのペプチドの抗菌作用を走査電顕で確認したところ，*Staphylococcus epidermidis* および*Vibrio cholerae* で菌体表面に突起を伴う変質が観察された．これらのペプチドのうち1つについてはアミノ酸配列を決定し，20-28番目の部分であることを明らかにした．この部分は立体構造上ヘリックス-ターン-ループ構造部分に相当した．一方，卵白の主成分がリゾチームであるスッポン卵は卵白の人工胃液に対する分解性を検討した結果，ニワトリ卵白と比較して早く分解を受けることがわかった．また，これは卵白アルブミンによる保護効果ではなかった．したがって，スッポン卵白リゾチームは速やかに抗菌ペプチドを遊離していることが示唆された．

Lysozyme, Antimicrobial peptide, Egg white

講演番号：4A08a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ A校舎08会場

アネキシンA4のCa^{2+}とpHによる機能調節メカニズムにはカルシウム結合サイトが関与する

Ca^{2+}- and pH-dependent regulation of Annexin A4 involves its calcium-binding sites

○三ッ橋 象平[1]、佛下 康平[1]、三宅 奈菜[1], 今関 はる奈[1], 川島 麗[1], 福岡 伸一[1], 阿部 文快[1,2]
([1]青山学院大・理工、[2]北里大・医療、[3]海洋研究開発機構)
○ Shohei Mitsuhashi, Kohei Butsushita, Nana Miyake, Haruna Imazeki, Rei Kawashima, Shin-ichi Fukuoka, Fumiyoshi Abe ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]Kitazato Univ., [3]JAMSTEC)

【目的】 アネキシンA4（Anxa4）はCa^{2+}とpHに依存して細胞膜に結合し、小胞輸送、エンドサイトーシス、エキソサイトーシスに関与するタンパク質である。Anxa4は約70アミノ酸からなるαヘリックスが4回繰り返した構造をとり、各繰り返しドメインにはカルシウム結合サイト（CBS）が存在する。Anxa4はCa^{2+}とpH依存的に酸性リン脂質と結合し膜融合活性を示すが、これら2つの要因による機能調節の生化学的意義は明らかになっていない。そこで本研究では、Ca^{2+}とpHに依存したAnxa4の機能調節機構の解明を目指した。

【方法】 Anxa4のCBS変異体の作製と精製:Anxa4のGlu70, Asp142, Glu226, Asp301を部位特異的変異導入によりAlaへ変異させ、それぞれCBS1, 2, 3, 4変異体とした。リポソーム結合実験: 100 μM Ca^{2+}を含む中性条件または酸性条件（pH4.0）で多重膜顆粒（MLV, Phosphatidylserine : Phosphatidylchorine = 1:1）と各タンパクを混合し、上澄画分と沈殿画分のタンパク量から結合量を測定した。リポソーム融合実験: NBD-PE, Rh-PEで蛍光標識したMLVと非標識MLVを100 μM Ca^{2+}を含む中性条件または酸性条件で各タンパクと混合し、530 nm (NBD)と588 nm (Rh)の蛍光強度から膜融合活性を算定した。リポソーム透過実験: NBD-PEで蛍光標識したMLVと各タンパクを100 μM Ca^{2+}を含む中性条件または酸性条件で混合し、亜ジチオン酸ナトリウムを添加した時の530 nmの蛍光強度の時間変化を100秒間測定した。円偏光二色性スペクトル測定: pH変化とCa^{2+}、リン脂質添加による各タンパクの円偏光二色性 (CD) スペクトル変化を測定した。

【結果】Anxa4はCa^{2+}存在下で酸性リン脂質と強く相互作用し、この相互作用にはCBS1とCBS4が関与していることが示唆された。しかしCa^{2+}による膜融合活性は示さなかった。一方、酸性条件下で膜融合が確認されたことから、pH変化の重要性が示唆された。Anxa4は酸性条件下で膜透過性を示した。よって、膜融合過程ではAnxa4が膜を透過するものと考えられる。酸性条件下でCBS3変異体の膜結合量は増加したが、膜融合活性は低下していた。CDスペクトル測定から、酸性条件下ではCBS3変異体の立体構造が大きく変化することが明らかとなった。以上の結果から次のような作業仮説を提唱する。すなわち、Anxa4は生体内でCa^{2+}シグナルにより膜へと誘導され、引き続き膜近傍での局所的なpH変化によりその立体構造を変化させる。この立体構造変化により膜融合活性を獲得したAnxa4が、エキソサイトーシスを作動するというモデルである。

Annexin A4, calcium binding sites, membrane fusion

講演番号：4A08a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ A校舎08会場

醸造発酵粕からの天然ヒト型セラミドの分析

Determination of natural human type ceramides from residues of fermented food production

〇柚木 恵太（(株) ジェヌイン R&D)
〇Keita Yunoki (Genuine R&D, Co. Ltd.)

【目的】ヒト表皮最外層には、地上の乾燥ストレスなどに対抗するための生体バリアである角質層が構築されている。角質細胞の細胞間脂質の主成分は遊離セラミド（N-アシルスフィンゴイド塩基）であり、構造的に9種類に大分類されることが分かっている。皮膚外用剤としてのセラミドの有効性は広く認知されているが、ヒト角質セラミドと構造の類似した天然由来のヒト型セラミドはなく、これまで化学合成品のみが利用されてきた。遊離セラミドはグルコシルセラミドやスフィンゴミエリンなどの合成系の中間代謝物であり、遊離形態では自然界には広く薄くは存在するものの、その含量は非常に低値でこれまで素材としては実用化されていない。本研究では、日本の伝統的醸造発酵食品の粕に含まれる遊離セラミドを分析し、皮膚外用剤としての応用を検討した。
【方法】醤油粕、焼酎蒸留粕および酒粕等の醸造発酵粕から脂質抽出を行った。クロロホルム/メタノール（2:1）で繰り返し脂質を抽出し、Folch法により水洗し脂質画分を得た。脂質画分は、ケイ酸TLC分析、HPLC分析およびMS分析に供した。また、醤油粕からのアルコール抽出による高純度セラミドの大量試作も行った。
【結果】醤油粕と焼酎粕には、スフィンゴ脂質としてグルコシルセラミド（GlcCer）がそれぞれ80mgおよび180mg/100gDW、遊離セラミド（Cer）が380および275mg/100gDW検出され、GlcCerの4倍以上もCerが含まれるものもあった。醤油粕中のGlcCerには、麹菌に特徴的なセラミド種である18h:0と18h:1脂肪酸結合型が約半分の割合で含まれていた。Cerの脂肪酸としては、2-ヒドロキシ酸、2,3-ジヒドロキシ酸およびノルマル酸結合型で構成されており、2-ヒドロキシ酸が70%以上を占めていた。構成スフィンゴイド塩基としては、4-ヒドロキシスフィンガニン（フィトスフィンゴシン)、4-ヒドロキシ-8-トランス-スフィンゲニン（t18:1）およびC20-フィトスフィンゴシンが主要構成分であった。これらのデータから、醸造発酵粕から得られるCerは、フィトスフィンゴシン-2-ヒドロキシ脂肪酸（セラミド6）を主体とし、他にフィトスフィンゴシン-ノルマル脂肪酸（セラミド3）からなるヒト角質型セラミドであることが分かった。なお、発酵粕から調製された本Cerのt18:1は、6-ヒドロキシ-4-トランス-スフィンゲニンからなるヒト角質セラミド（セラミド7と8）のt18:1とは、水酸基と二重結合の位置が異なる類似型であった。また、植物性グルコシルセラミドと合成セラミドを比較対照として、醤油粕から抽出・精製した高純度Cerを用いて経皮水分蒸散量の改善効果を測定した。

Natural free ceramides, Sphingolipid, Skin care

講演番号：4A08a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ A校舎08会場

β-グルコシルセラミドによる腫瘍転移抑制

Therapeutic potential of β-glucosylceramide for the prevention of tumor metastasis

○稲福　征志、屋　宏典（琉球大・熱生研）
○Masashi Inafuku, Hirosuke Oku (Univ. Ryukyus, TBRC)

【目的】近年ではβ-グルコシルセラミド（β-GlcCer）の自然免疫賦活化作用が注目されている。当研究室では、これまでにビール粕由来のβ-GlcCerは腫瘍細胞の細胞死を誘導すること、さらにはマウスにβ-GlcCerを腹腔内投与することで肝臓への腫瘍転移が抑制されることを報告してきた。本研究ではβ-GlcCer投与による腫瘍転移抑制機構について検討した。
【方法】PBSに懸濁したβ-GlcCerを投与したマウスより肝臓リンパ球を単離し、インターフェロン（IFN）-γの産生、活性化マーカーの発現および腫瘍細胞に対する細胞傷害性を指標として肝臓リンパ球の活性化について検証した。さらには、CD1d分子をまたはJα18分子を欠損したマウスにおけるβ-GlcCerの腫瘍転移抑制作用について検証した。
【結果】β-GlcCerをマウスに腹腔内投与することによって、肝臓の$CD3^+NK1.1^+$細胞の減少とナチュラルキラー（NK）細胞の活性化マーカー発現の亢進が認められた。β-GlcCerを投与したマウスにおける血中IFN-γレベルの変動は認められなかったが、肝臓リンパ球のIFN-γ放出ならびに肝臓の$CD3^+NK1.1^+$細胞におけるIFN-γのmRNA発現が亢進していた。また、β-GlcCer投与は肝臓リンパ球の腫瘍細胞に対する細胞傷害性も亢進していた。さらに、β-GlcCerの腹腔内投与による腫瘍転移抑制作用は、正常なマウスでは認められるが、*CD1d*$^{-/-}$マウスおよび*Jα18*$^{-/-}$マウスでは認められないことが明らかとなった。これらの結果から、β-GlcCerをマウスの腹腔内に投与することによって、肝臓の自然免疫が活性化されること、ならびにβ-GlcCer腹腔内投与による腫瘍転移抑制作用においてはNKT細胞の存在が重要であることが示唆された。

be-ta-glucosylceramide, tumor metastasis

講演番号：4A08a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ A校舎08会場

脂肪酸分析による化学合成生態系の解明：Lucinidae科二枚貝*Mesolinga soliditesta*の脂肪酸組成

Lipid and fatty acids of *Mesolinga soliditesta*

○齋藤 洋昭・村田昌一（中央水産研究所）
Hiroaki Saito, Masakazu Murata (Natl. Res. Inst. Fish. Sci.)

【目的】化学合成細菌を共生し、それらから栄養を得ている深海性二枚貝フクスケツキガイ(*Mesolinga soliditesta*)の脂質を明らかにする。

【方法】遠州灘金州の瀬331 mの深海で採集した本種の脂質クラスや脂肪酸組成をGCなどにより明らかにした。未知成分は、GC-MSにより、化学構造を決定した。

【結果】本種の脂質クラスは、蓄積脂質ではトリアシルグリセロール、組織脂質ではホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルコリンなどのリン脂質が主成分であり、通常の表層に生息する二枚貝の脂質に類似していた。一方、主要脂肪酸は、各クラスとも、16:0、18:0、16:1n-7、18:1n-7、20:1n-7などの飽和酸やモノエン酸、22:2n-7(8),15などの非メチレン中断型ジエン酸(non methylene-interrupted dienoic fatty acids: NMID)が中心で、少量の20:3n-7,10,13などのn-4族PUFAおよび、20:4n-6やEPA（20:5n-3）などのn-3、n-6PUFAで構成されていた。また、ドコサヘキサエン酸（22:6n-3、DHA）はほとんど見出されなかった。これらの特異な脂肪酸組成は表層に生息する他の二枚貝類と大きく異なり、その共生細菌の影響を受けていることが推定された。

講演番号：4A08a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ A校舎08会場

リノール酸酸化を指標とした食品機能成分の抗酸化評価法

The evaluation method of antioxidant ability of food composition using the linoleic acid oxidation.

○木村 ふみ子、Zheng Tie-song[1]、周 秀瑩、高橋 寛基、西内 美香、宮澤 陽夫（東北大院・農・機能分子、[1]南京師範大学）

○Fumiko Kimura, Zheng Tie-song[1], Chou Hsiu-Ying, Takahashi Tomoki, Nishiuchi Mika, Miyazawa Teruo (Tohoku Univ, [1]Nanjing Normal Univ)

【目的】食品の劣化や生体内の望ましくない脂質過酸化反応を抑制する抗酸化作用は、食品成分の重要な機能の一つである。食品成分の抗酸化作用の評価方法には、遷移金属や人工ラジカルに対する還元能によって評価する方法や、人工基質を用いた酸化モデルへの水素供与力によって評価する方法が、近年、頻用されている。これらの方法は操作が簡便なため、多検体の比較に有効であるが、実際の脂質酸化反応とは、基質、基質と抗酸化剤の割合、酸化開始剤の利用などが大きく異なるため、最終的には、油脂を基質とし抗酸化物質を混合した条件で、酸化劣化度を測定し評価する必要がある。発表者らは、これまで、脂溶性と水溶性の抗酸化物質を同一条件で評価できる方法として、界面活性剤で水溶性抗酸化剤を基質に可溶化し、油脂安定性評価で使われる重量法を応用する方法を検討してきた。本発表では、この重量法による食品機能成分の抗酸化評価について、基質、反応温度等の条件検討結果と、得られた酸化曲線の解析、さらにモデル抗酸化剤としてdl-α-トコフェロール添加した場合の結果について報告する。

【方法】油脂とtritonX-100の比を9:1としたものを酸化基質とし、油脂は、リノール酸、オレイン酸またはオレイン酸とリノール酸の1:1混合物を用いた。脂質酸化の評価は基準油脂分析試験法の参考試験、“2.5-1996の自動酸化に対する安定性試験オーブン法(重量法)”に基づき行った。すなわち内径41mmのガラスシャーレに試験油1gを入れ恒温槽にて加温による酸化促進を行い、1日1回重量を計測し、酸化に伴う酸素付加に基づく重量増加率を求め、酸化の指標とした。加温温度は40℃と60℃とした。モデル抗酸化剤として、dl-α-トコフェロールを基質に対し、0.1、1、10、100、1000、10000mg/kgの濃度で添加した。

【結果】60℃の加温酸化条件では、酸化が急激に進行し、測定開始一日後から3%以上の重量増加がみられ、一日一回の計測では誘導期が観測されなかった。40℃の条件では、一日一回の測定で良好なシグモイド曲線が得られ、非線形回帰モデルでの解析が可能になった。基質に用いたリノール酸とオレイン酸の違いは、酸化速度と重量増加率の最大値に影響を与えたが、誘導期に差はみられなかった。10 mg/kg以上の濃度の dl-α-トコフェロールの添加により、濃度依存的な誘導期の遅延がみられた。以上の結果より、リノール酸を基質として用い、40℃で加熱酸化促進を行い、酸化の誘導期により評価することで、重量法による抗酸化剤の評価が可能であると考えられた。

Keyword1 lipid oxidation, Keyword2 antioxidant, Keyword3 linoleic acid

講演番号：4A08a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ A校舎08会場

リン脂質ヒドロペルオキシドによる血管新生の亢進：動脈硬化への関与分子機構

Phospholipid hydroperoxide stimulates angiogenesis, implicating a role of lipid peroxidation in the development of atherosclerosis

○仲川 清隆、齊藤 達弥、加藤 俊治、宮澤 陽夫
（東北大院農・機能分子解析学）
○Kiyotaka Nakagawa, Tatsuya Saito, Shunji Kato, Teruo Miyazawa
(Food Biodyn. Chem. Lab., Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】
動脈硬化病変には“血管新生”が見られ、プラークの破綻や血栓形成に関わる。一方、酸化低密度リポタンパク（酸化LDL）は、内皮細胞や平滑筋細胞に細胞障害を招き動脈硬化に関わるとされているが、近年、酸化LDLによる血管新生促進が報告され（Dandapat et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 27, 2435-2442, 2007; Bochkov et al., Antioxid. Redox Signal, 12, 1009-1059, 2010)、新たな動脈硬化の進展機構として注目されている。LDL膜リン脂質（ホスファチジルコリン, PC）の過酸化物が、血管新生促進の原因と予想されているものの、未だ原因化合物は特定されていない。そこで本研究では、PCの酸化一次生成物であるPCヒドロペルオキシド（PCOOH）の高純度品を調製し1)、その血管新生促進作用を明らかにしようとした2)。

【方法と結果】
ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）へ血管内皮細胞増殖因子（VEGF）を処理するとHUVECの遊走・増殖・遊走・管腔形成が見られ、この系にPCOOHを加えるとこうした血管新生に特徴的な現象がさらに亢進することがわかった。PCOOHの血管新生促進作用は、ラット大動脈によるex vivo評価でも認められ、そのメカニズムは内皮細胞への酸化ストレス誘発やPI3K/Akt経路の活性化と考えられた。これらの結果と、動脈硬化症者血漿への顕著なPCOOHの蓄積を踏まえると、LDLの過酸化でPCOOHが生じ、その細胞障害性に加えて、血管新生の促進による動脈硬化の進展が新たに示唆された。

1) D. Ibusuki, K. Nakagawa, T. Miyazawa, et al., Preparation of pure lipid hydroperoxides. J. Lipid Res., 49, 2668-2677, 2008.
2) K. Nakagawa, T. Saito, S. Kato, T. Miyazawa, et al., Phosphatidylcholine hydroperoxide promotes VEGF-induced angiogenesis in endothelial cells and rat aorta ring cultures. Biochim. Biophys. Acta., 1810, 1205-1211, 2011.

Oxidized phospholipid, Angiogenesis, Atherosclerosis

講演番号：4A08a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ A校舎08会場

アスタキサンチン摂取時の中高齢者の血中カロテノイド組成と抗過酸化脂質機能

○[1]宮澤 大樹、[1]仲川 清隆、[1]木村 ふみ子、[2]佐藤 朗、[1]宮澤 陽夫（[1]東北大院・農・機能分子解析学、[2]ヤマハ発動機株式会社）

【目的】当研究室では、ホスファチジルコリンヒドロペルオキシドやホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシドを高感度かつ選択的に定量できる化学発光（CL）-HPLC 法を開発し、脂質過酸化と疾病の関係解明を主にヒト介入試験で進めてきている。この方法を用いて認知症者には高濃度の過酸化リン脂質が蓄積した老化赤血球が多いことを明らかにした。赤血球膜で過酸化リン脂質が増加すると、血液レオロジーが悪化し、赤血球が運ぶ酸化ヘモグロビンからの酸素の解離が阻害され、脳や筋肉等に酸素を十分に供給できなくなると考えられ、アルツハイマー病の発症や増悪化の一つの要因と推定している。こうした理由から、赤血球膜脂質の主要成分であるカロテノイドを測定する方法を開発し、ヒトの赤血球にはキサントフィルが多いことを明らかにした。更に、その主成分であるルテインの補給がヒト赤血球の膜脂質過酸化を抑制する作用があることをヒト試験で明らかにした。これらの結果から、より強力な抗酸化作用を持つ食品成分にも興味がもたれ、キサントフィルであるアスタキサンチンのヒトにおける抗酸化試験を行った。
【方法】40歳以上69歳以下の男性で、総コレステロール値が200mg/dl～260mg/dlでありLDLコレステロール値が120mg/dl～180mg/dl程度のボランテイアに、アスタキサンチンを1mgまたは3mgを含むカプセルを毎日1回12週間摂取してもらい血中過酸化リン脂質に与える影響を、プラセボ群を対照とした二重盲検試験により検証した。赤血球と血漿の総脂質を抽出し、過酸化リン脂質をCL-HPLC装置で定量した。また、赤血球と血漿のカロテノイドを抽出し、アスタキサンチンをLC-MS/MS法で、その他のカロテノイドを多波長UV-HPLC法で測定した[1,2]。
【結果】アスタキサンチンを毎日1mgまたは3mg摂取することで、赤血球、血漿のアスタキサンチン濃度は有意に上昇したが、過酸化脂質の濃度に影響は無かった。以前行ったアスタキサンチンの6mgまたは12mgの投与試験では過酸化脂質の濃度が有意に減少することを確認しており、一定濃度のアスタキサンチン摂取が赤血球の過酸化脂質の濃度を低く抑えることに必要であることが明らかになった。

1) T. Miyazawa, et.al., *J. Oleo Sci.*, 60 (10) 495-499 (2011)
2) T. Miyazawa, et.al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75 (9) 1856-1858 (2011)

astaxanthin, lipid peroxidation, human blood

講演番号：4A08a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ A校舎08会場

Tocotrienol attenuates triglyceride accumulation via multiple lipogenic genes signaling regulation in animal and cell culture studies

○Gregor Burdeos, Kiyotaka Nakagawa, Fumiko Kimura, Teruo Miyazawa (Grad. Sch. Agr. Sci. Tohoku Univ.)

【Introduction】Tocotrienol (T3) is an important phytonutrient found in palm oil and rice bran. T3 has been reported to inhibit 3-hydroxy-3-methyl-CoA reductase and thereby reduces plasma cholesterol (Cho) level. Recently, we found that dietary T3 decreases triglyceride (TG) concentrations in blood plasma and liver of rats. We investigated then the mechanism(s) on how T3 decreases TG concentration in both animal and cell culture studies.
【Methods】High fat diet with T3 (mainly γ-T3) was fed to F344 rats (5 or 10 mg T3/day/rat). After 3 weeks of feeding, lipid, oxidative, and inflammatory parameters in plasma and liver were measured. In cell culture study, HepG2 cells were incubated in normal or fat-loaded medium containing 0-50 μM γ-T3 in 24 h. After 24 h of incubation, TG concentrations were measured. For both animal and cell culture studies, gene expressions concerning lipid biosynthesis and β-oxidation were investigated by RT-PCR.
【Results】High fat diet caused lipids (Cho and TG) accumulation and oxidative stress (e.g., phopholipid hydroperoxide (PLOOH)) in plasma and liver of rat. T3 supplementation ameliorated the increase of TG and PLOOH, while T3 did not affect Cho level. Therefore, T3 has the potential to attenuate TG levels than Cho thereby decreasing fat-inducible oxidative stress. Similarly, in the cell culture study, T3 (γ-T3) inhibited TG accumulation, especially in fat-loaded condition. These manifestations were supported by gene expressions results. Consequently, these in vivo and in vitro results provide a new information and mechanism of T3 for its TG-lowering effect.

Tocotrienol, Triglyceride, β-oxidation

講演番号：4A08a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ A校舎08会場

LC-MS/MSによるヒト血中PCOOH分子種の高感度定量分析

LC-MS/MS determination of phosphatidylcholine hydroperoxide in human plasma

○加藤俊治、仲川清隆、宮澤陽夫（東北大院・農・機能分子解析学）
○Shunji Kato, Kiyotaka Nakagawa, Teruo Miyazawa(Food Biodyn. Chem. Lab., Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】生体内の酸化ストレスを評価するため、当研究室ではヒト血中の過酸化脂質（ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド, PCOOH）を高感度に分析できるCL-HPLC法を開発し、近年では構造情報に基づく解析が可能なLC-MS/MS法を開発した。これら両分析法を用いて、生体膜リン脂質の過酸化と疾病との関係解明を進めてきている。最近では、心臓の左前下行枝（狭窄頻度が最も高い冠動脈）に狭窄ができはじめると、血漿のPCOOH濃度が顕著に高まることから、PCOOHは動脈硬化に深く関わると考えられ、この解明を進めている。しかし、LC-MS/MS法によるPCOOHの定量は幾つかの要因に大きく左右される。本研究では、血漿PCOOHの定量性に深く関わる要因として、①標品純度、②血漿からのPCOOH回収率、③PCOOHに特異的なMS/MS MRM検出、④MS/MSのイオンサプレッション回避による定量性の担保について検討し、LC-MS/MSによるヒト血漿PCOOHの精密定量を目指した。
【方法と結果】①2-メトキシプロペンを用いて、2位にリノール酸ヒドロペルオキシドを有する高純度PCOOHを調製し、PCOOHの精密定量の標品に使用した。②PCOOHの添加回収試験では、抽出過程にPCOOHの分解がみられたので、その分解を回避できる抽出法を検討し、高い回収率（83%）が得られるようになった。③MS/MS法ではヒドロペルオキシドに高選択的なフラグメントを新たに発見し、このMRMを用いたヒト血液分析では、ヒドロペルオキシド以外のピークは全く検出されなかった。④これらの抽出・分析法を組み合わせたところ、イオンサプレッションは完全に回避できており、正確な定量性が得られていることを確認した。健常者の血漿PCOOHを分析したところ、平均20 pmol/mLであった。現在、これらの方法を用いて動脈硬化症などの血液のPCOOH精密定量を行い、生体脂質過酸化と疾病の分子機構解明を進めている。

Oxidized phospholipid, LC-MS/MS

講演番号:4A08a11
講演日時、会場:3月25日11:10～ A校舎08会場

アミロース・脂質複合体の水酸化カルシウム処理・炭酸ガス中和処理時における構造変化

Structural change of amylose-lipid complex upon treatment with calcium hydroxide and subsequent carbonation

○松木順子、城間　力、池　正和、徳安　健（農研機構・食総研）
○Junko Matsuki, Riki Shiroma, Masakazu Ike, Ken Tokuyasu (NFRI, NARO)

【目的】演者らは、澱粉、ショ糖等の易分解性糖質を含む稲わらからの効率的なバイオエタノール製造のため、$Ca(OH)_2$前処理を利用したCaCCO法やその改良法を開発してきた。CaCCO法では、稲わらを$Ca(OH)_2$で処理した後にCO_2で中和し、糖化に供するが、稲わらに含まれる澱粉を効率的に利用するために、CaCCO処理時の澱粉の挙動を知る必要がある。$Ca(OH)_2$存在下における米澱粉のDSC糊化特性の解析を進める中で、アミロース脂質複合体(ALC)として観察されるピークが$Ca(OH)_2$処理によって消失していることが見いだされた。そこで、本研究では、さらにこの現象の解析を進めるために、ALCを用いて、$Ca(OH)_2$存在下におけるアミロースの挙動を解析し、CaCCO法のさらなる改良の可能性を検討した。
【方法】ALCのモデル物質として、アミロース試薬とパルミチン酸の複合体を作成した。基質濃度2.5%、$Ca(OH)_2$濃度は基質に対して0～10%とした。室温7日間、50℃24時間、120℃1時間処理を行った後に、CO_2で中和した。得られた処理ALCについて、DSC糊化特性およびα-アミラーゼによる糖化性を測定した。
【結果】ALCと水を1:3で混合してDSC測定を行ったときには、ALCのピークは95℃付近に観察された。$Ca(OH)_2$存在下においては、濃度依存的にALCのピークは低温側にシフトして、10%のときには60℃であった。これをCO_2で中和した後の測定では、ALCのピークは90℃付近に観察されたことに加えて、130℃付近に新たなピークが出現した。$Ca(OH)_2$で処理した後にCO_2で中和し、糖化性を比較したところ、50℃処理したALCの24時間後の糖化率は、室温で処理した場合に比べて70%程度であった。また、120℃処理では30%程度まで低下した。120℃処理後には溶液が着色しており、アミロースが分解していると考えられた。澱粉を多く含む試料をCaCCO法で処理する場合、脂質存在下では難糊化性のアミロースが生じ、糖化に影響を及ぼす可能性がある。

amylose, DSC gelatinization, calcium hydroxide

講演番号：4A08a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ A校舎08会場

酢酸菌の種々の培養条件におけるセルロース及び水溶性多糖の生産

Production of cellulose and water soluble polysaccharides in various culture condition of *Gluconacetobacter* strain

○小竹 宏美、水野 正浩、渡辺 博哉[1]、野﨑 功一、天野 良彦（信州大院工・物質工、[1]内堀醸造㈱）

○Hiromi Kotake, Masahiro Mizuno, Hiroya Watanabe[1], Kouichi Nozaki, Yoshihiko Amano (Shinshuu Univ., [1]Uchibori Vinegar Inc.)

【目的】我々は、柿の発酵液及び食酢の醸造環境からセルロース生産能を有する微生物の単離に成功し、いずれも16s rDNA配列解析より*Gluconacetobacter*属であることが明らかとなっている。しかし、両菌の詳細なセルロース生産能は明らかとなっていない。そこで本研究では、両菌について培地中の炭素源を変更させた場合と回転培養を行った際のセルロース生産能についての試験を行った。さらに、培養液中への水溶性多糖の生産能についても確認を行った。

【方法】菌株には、2種類の新規酢酸菌及び、標準菌株である*G. xylinus* AY201（ATCC23769）及び*G. xylinus* NQ5（ATCC53582）を使用し、培地にはグルコースを炭素源として含むSH培地を基本培地として用いた。炭素源を変更する場合は、グルコースのみを他の糖源に変更させた。炭素源を変更させた場合のセルロース生産試験は20 mlの培地をシャーレに添加し、静置培養によってセルロース生産を行った。回転培養におけるセルロース生産試験は、100 ml容三角フラスコに30 mlもしくは80 mlの培地を添加し120、150、200 rpmでの回転培養を行った。どちらの場合も生産されたセルロースは2% SDS水溶液による洗浄を行った後、乾燥させセルロース生産量を測定した。水溶性多糖については100 mlの培地を用い115 rpmで振盪培養を5日間行った後、培養上清からエタノール沈殿によって回収、凍結乾燥を行った。回収粉末を、トリフルオロ酢酸によって酸分解し、薄層クロマトグラフィー（TLC）によって分解物を確認した。

【結果】2種類の新規酢酸菌はどちらもセルロース生産を行い、中でも柿の発酵液中から単離してきた菌株は、炭素源としてグルコースを用いた際にセルロースへの変換率が約30%という非常に高い数値を示した。さらに、pHの変化を見てみるとグルコースを炭素源に用いた場合に、柿の発酵液中から単離してきた菌株は培養2日目まではpHの降下は見られたものの、3日目に急激な上昇を見せ、4日目には培養前のpHまで戻った。一方、食酢の醸造環境から単離してきた菌株は培養1日目にpHの急激な降下が見られた後、大きな変化は見られなかった。以上の結果より、両菌株では糖の代謝経路に違いを持つことが示唆された。また、両菌株ともに回転培養でもセルロース生産を行うことは可能であったが、それぞれを静置培養と比較をするとほとんどの場合で生産量が半分以下にまで減少する結果となった。培養上清のエタノール沈殿を行った結果、いずれの菌株からも沈殿物を得ることができ、TLCによって酸分解物の確認を行った結果、グルコースやグルクロン酸、マンノースのスポットが見られたことから、両菌株ともアセタンを生産していることが示唆された。

Gluconacetobacter, bacteria cellulose, water soluble polysaccharides

講演番号：4A08a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ A校舎08会場

*Thiothrix nivea*由来のβ-1,4グルコサミノグルカンの高次構造

Molecular conformation of β-1,4-linked glucosaminoglucan prepared from *Thiothrix nivea*

○近藤 敬子、澄川 愛美、武田 穣、小泉 淳一、上田 一義（横国大院・工）
○Keiko Kondo, Manami Sumikawa, Minoru Takeda, Jun-ichi Koizumi, Kazuyoshi Ueda (Yokohama National Univ.)

【目的】β-1,4-グルコサミノグルカンは、β-1,4-D-グルコースとβ-1,4-D-グルコサミンの交互共重合体であり、鞘形成硫黄酸化細菌*Thiothrix nivea*の鞘（マイクロチューブ状菌体外構造体）の構成成分として見出された[1)]。低分子量（10糖程度）のグルコサミノグルカンは化学合成によって得られるが[2)]、高分子（約8万）のものは*T. nivea*以外からは得られないのが現状である。本共重合体はセルロースとキチン・キトサンの中間的性状を示す素材と予想されるが、検討はなされていない。そこで今回は、その端緒として共重合体の酵素分解性の検討と計算機化学的手法による高次構造の予測を試みた。
【方法】*T. nivea*を溶菌して得た鞘に無水ヒドラジンを作用させて脱アセチル化した後、塩酸による部分分解を施した。塩基性下での沈殿としてグルコサミノグルカンを回収し、必要に応じて*N*-アセチル化した。脱アセチル重合体に対してはキトサナーゼ、*N*-アセチル重合体に対してはリゾチーム、キチナーゼおよびセルラーゼをそれぞれ添加して分解の有無を調べた。一方、分子力学計算プログラムおよび量子化学計算プログラムを使用して*N*-アセチル重合体の安定な立体構造を求めた。GlcとGlcNAc間の2種のグリコシド結合に関してそれぞれポテンシャルエネルギーマップを作製し、2糖単位での安定構造を探索した。各候補構造に対し量子化学計算による構造最適化を行った後、得られた最安定構造を連結して共重合体の立体構造を求めた。
【結果】脱アセチルおよび*N*-アセチルグルコサミノグルカンは、セルロースないしキチン・キトサンを基質とする酵素による分解を受けないことがわかった。また高次構造解析の結果、高分子量の*N*-アセチルグルコサミノグルカンは5残基で1回りの螺旋構造を形成し、螺旋の間隔は約7Åであることが示唆された。セルロース、キチンがともに直線性の高い分子構造をとるのとは対照的である。分解酵素の活性部位は共重合体の分子鎖による立体障害でグリコシド結合領域に接近できないと思われる。β-1,4-グルコサミノグルカンは少なくとも立体構造の面からセルロースやキチンとは明確に区別できることから、当初の予想とは異なり、これら2種のホモ多糖の中間的素材ではないと考えられる。

1) Takeda et. al., Int. J. Biol. Macromol. in press.
2) Kobayashi et. al., Biomacromol. 7, 1644-1656 (2006).

Thiothrix nivea, glucosaminoglucan, molecular conformation

講演番号：4A08a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ A校舎08会場

ミズナ種子由来粘性物質の性質

Properties of the seed coat mucilage of Mizuna (*Brassica rapa* L. var. *laciniifolia* Kitam.)

○喜多　由香、坂本 正弘、東　順一（京大院農・地域環境科学）
○Yuka Kita, Masahiro Sakamoto, Jun-ichi Azuma (Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ.)

【目的】植物の種子には、水に浸すと種皮表面から粘性物質を生成するものがある。京都の伝統野菜であるミズナ（水菜、*Brassica rapa* L. var. *laciniifolia* Kitam.）の種子もその一つである。このような種子由来の粘性物質は多糖類からなることがわかっている。粘性多糖は吸水性、透過性、増粘性などを示すことから、食品の増粘剤や化粧品など多岐にわたり応用されている。粘性多糖の化学構造や物性の理解は、その新規機能性材料としての利用のために重要であり、多糖産業の発展につながると考えられる。本研究は、ミズナ種子由来の粘性多糖について化学的分析を行うことで、その新規多糖素材としての有効利用の可能性を探ることを目的とする。
【方法】ミズナの種子を水中で膨潤させて粘性多糖を分取した。この粘性多糖をアルカリ処理によりアルカリ可溶成分とアルカリ不溶成分に分離した。さらに、アルカリ可溶成分を陰イオン交換クロマトグラフィーにより中性多糖と酸性多糖に分離した。各分画について、中性糖含量測定、ウロン酸含量測定、HPAECによる中性糖組成分析を行った。アルカリ不溶成分についてはX線回折も行った。
【結果】ミズナ種子から得られる粘性物質は、アルカリ不溶成分のX線回折結果からセルロースを含むコンポジットであることがわかった。多糖類のほかに、デンプン、タンパク質、灰分も含まれていた。また、糖組成分析結果からアルカリ不溶成分にはアラビノガラクタンとセルロース由来のグルコースが存在することがわかった。アルカリ不溶成分にはタンパク質が含まれていなかったため、このアラビノガラクタンが糖タンパクである可能性は無いと考えられる。アラビノガラクタンは、セルロースとの親和性が低いという報告があるが、ミズナ種子由来の粘性多糖においては高濃度のアルカリ処理を施しても多量のアラビノガラクタンがセルロースと結合したまま残り、アラビノガラクタンとセルロースの親和性が高い可能性が示唆された。アルカリ可溶成分については、酸性多糖が97%を占めており、その中にマンノースが含まれていることがわかった。酸性マンナン系多糖が種子由来の粘性多糖に含まれているという報告は今までに無いため、新たな糖鎖構造が粘性多糖の形成に寄与している可能性が示唆された。今後、粘性多糖の構造についてさらに詳しく分析を行う予定である。

Seed mucilage, Polysaccharide, Cellulose

講演番号：4A08a15
講演日時、会場：3月25日11:54～ A校舎08会場

キチン6及び7糖の選択的合成とその自己組織化の解明

Selective enzymatic synthesis of chitin hexa- and hepta-oligosaccharides and their self-assembly

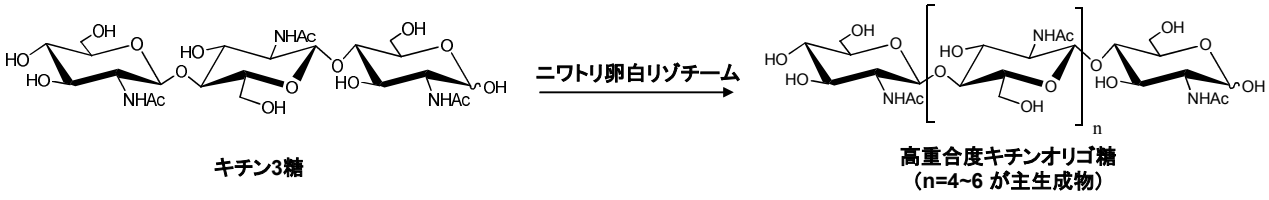
○道下 宏祐、服部 武史[1]、Aditya Kulkarni、尾形 慎[1]、碓氷 泰市[1] (静大院農、[1]静大院・創科技)

○Kousuke Michishita, Takeshi Hattori[1], Aditya Kulkarni, Makoto Ogata[1], Taichi Usui[1] (Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [1]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【背景・目的】我々は、既にニワトリ卵白リゾチームを触媒素子とした高重合度キチンオリゴ糖（DP：2～15）の酵素合成法を確立している[1)]。ここでは、本反応を応用したキチン6糖及び7糖の選択的合成法の確立とその単離精製を行った。さらに、各種重合度（DP：2～7）のキチンオリゴ糖に対する物性評価及びキチン6糖特異的な熱可逆的自己組織化メカニズムの解明を試みた。

【方法・結果】キチン3糖を30%硫酸アンモニウム含有酢酸緩衝液（pH 3.8）に高基質濃度で溶解し、ニワトリ卵白リゾチームを添加後、40℃で反応を行った。反応の進行に伴って沈殿物が生成し蓄積した。酵素失活処理後、遠心して沈殿部を回収し、50%エタノールで洗浄後、凍結乾燥した。本生成物を活性炭-セライトカラムに供し、エタノール濃度勾配法を用いて目的物の分画を行った。続いて、目的物をNMR・HPLC・MALDI-TOFMS等を用いて分析し、キチン6・7糖の純度及び構造確認を行った。収率は、キチン6糖および7糖がそれぞれ4%、9%であった。次に、今回得られたキチン6糖および7糖に加え、重合度2～5のキチンオリゴ糖に対する物性解析を行った。その結果、キチン6糖のみがハイドロゲルとして特有の熱可逆的応答性を示すことが判明した。この現象を解明するため、各重合度のキチンオリゴ糖を動的光散乱法に基づく粒子径測定を行ったところ、一定の条件下においてキチン6糖が温度依存的な粒子径の推移を示した。一方、その他のキチンオリゴ糖（2～5糖および7糖）ではこのような温度に伴う粒子径の変化は確認されなかった。また、キチン2～5糖と7糖とでは、水溶液中における挙動に違いがみられ、キチン7糖は分子会合状態で存在する可能性が示唆された。これらの結果から、キチン6および7糖を境界にしてキチン様の構造特性を持ち始めると推察した。

1) T. Hattori *et al.*, *Carbohydr. Res.*, (2012) in press.



chitin, lysozyme, self-assembly

講演番号：4C09a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ C校舎09会場

サーモライシンのN末端ドメインへの部位特異的変異導入が熱安定性に与える効果

Effects of Site-directed Mutagenesis in the N-terminal Domain of Thermolysin on its Stability

○川崎 雄一、保川 清、井上 國世（京大院・農）
○Yuichi Kawasaki, Kiyoshi Yasukawa, Kuniyo Inouye (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】サーモライシン（thermolysin、TLN）は、*Bacillus thermoproteolyticus*由来の好熱性中性亜鉛プロテイナーゼである。TLNに部位特異的変異Gly8→Cys/Asn60→Cys/Ser65→Proを導入すると熱安定性が向上する[1)]。本研究では、この変異によるTLNの熱安定化機構の解明を目的とした。
【方法】S-S結合の定量：Dithiothreitol（DTT）存在下あるいは非存在下で熱変性させた野生型TLN（WT）、G8C/N60C（M2）、G8C/N60C/S65P（M3）を5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)（DTNB）と反応させた。生じたthiobis(2-nitrobenzoic acid)アニオンをA_{412}（ε_{412}=13.6 $mM^{-1}cm^{-1}$）により定量した。熱安定性の測定：TLN（200 nM）を40 mM HEPES-NaOH, 1－100 mM $CaCl_2$, pH 7.5において70－95ºCで2－120 分間熱処理した。その後、25ºCで*N*-[3-(2-furyl)acryloyl]-Gly-L-Leu amide加水分解活性を測定した。熱処理前のk_{cat}/K_mに対する熱処理後のk_{cat}/K_mの相対値を熱処理時間に対してプロットすることにより、一次の熱失活速度定数（k_{obs}）を求めた。
【結果】S-S結合：DTT存在下と非存在下で熱処理を行ったTLNにDTNBを作用させた時の反応液（[TLN] = 8 μM）のA_{412}の差は、WTでは0、M2とM3では0.21（16 μMのSH基に相当）であった。これより、WTではS-S結合が架かっていないが、M2とM3では全分子において導入したCys8とCys60の間にS-S結合が架かっていることが示唆された。熱安定性：WT、M2、S65P、M3のT_{50}はそれぞれ77、85、79、86ºCであり、M3 ≈ M2 > S65P ≈ WTであった。また、いずれのTLNも$CaCl_2$濃度の増加に伴いk_{obs}が減少し、すべての$CaCl_2$濃度においてk_{obs}はWT > S65P > M2 ≈ M3であった。Ca^{2+}がTLNの熱安定性に与える効果を調べるために、熱失活を以下のスキームで解析した。

$$N \overset{K_d}{\rightleftharpoons} N^* \xrightarrow{k_{den}} U^*$$

NはCa^{2+}を保持したTLN、N*はCa^{2+}が解離したTLN、U*は不可逆的に熱失活したTLNを示す。K_dはN*とCa^{2+}の解離定数、k_{den}はN*の熱失活速度定数を表す。これより式1が得られる。

$$1/k_{obs} = (1/k_{den}) + [Ca^{2+}] / (K_d\, k_{den}) \quad (1)$$

$1/k_{obs}$を$CaCl_2$濃度に対してプロットし、k_{den}とK_dを求めた。WT、M2、S65P、M3のk_{den}はそれぞれ5.1、4.1、5.7、4.9 × 10^4 s^{-1}であり、大きな差はなかった。一方、K_dはそれぞれ47、8.9、17、7.2 mMであり、WT > S65P > M2 ≈ M3であった。
【考察】TLNに対するGly8→Cys/Asn60→Cysの熱安定化効果はSer65→Proよりも大きい。この2種類の変異を組み合わせたときの熱安定化効果はGly8→Cys/Asn60→Cys単独と同程度である。Gly8→Cys/Asn60→CysとSer65→Proはともに構造を安定化するものと考えられてきたが、それに加えてTLNのCa^{2+}との親和性を上げることで熱安定性を向上させている可能性が示唆された。

1) Yasukawa, K. and Inouye, K. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* **1774**, 1281-1288

calcium ion, stability, thermolysin

講演番号：4C09a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ C校舎09会場

サーモライシンのC末端領域への部位特異的変異導入が酵素活性および安定性に及ぼす影響

Effects of site-directed mutagenesis in the C-teminal region of thermolysin on its catalytic activity and stability

中田 博己、○兒島　憲二、 井上 國世（京大院・農）
Hiroki Nakata, ○Kenji Kojima, Kuniyo Inouye (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】サーモライシン（TLN）は*Bacillus thermoproteolyticus*が菌体外に分泌する好熱性の中性金属プロテアーゼである．TLNは316アミノ酸残基から成り，そのN末端領域はβ-シート構造で，C末端領域はα-ヘリックス構造で構成される．本研究の目的は，TLNのC末端領域に部位特異的変異を行い，組換え大腸菌におけるTLNの発現，酵素活性，および安定性に与える影響を検討することである．
【方法】野生型TLN (WT) および変異型TLNの発現には，大腸菌を宿主として分子内シャペロンであるプロペプチドと酵素活性を有する成熟TLNタンパク質を独立して発現させる系を用いた．TLNの発現は，形質転換した大腸菌を37℃で2日間培養した後の培養上清について SDS-PAGE およびカゼイン加水分解活性の二通りの方法で評価した．培養上清において発現を確認できた変異型TLNについてはカラムクロマトグラフィーにより精製した．TLNの二次構造は200-250 nmの円二色性（CD）スペクトルにより評価した．TLNの加水分解活性は，基質としてカゼインおよび合成ペプチド基質*N*-[3-(2-furyl)acryloyl]-Gly-L-Leu amide (FAGLA) を用い，pH7.5, 25℃において測定した．TLNの熱安定性は，円二色性分散計を用い石英セル内で2.5 μMのTLN溶液を70℃から100℃にかけて1分間あたり0.5℃の割合で昇温させ，222 nmにおける楕円率の変化から50%のTLNが二次構造を消失する温度T_mを算出し，T_m値により熱安定性を比較した．
【結果】TLNのC末端からアミノ酸残基を1残基ずつ欠失した変異型TLNを作製し，組換え大腸菌における発現を調べた．TLNのC末端アミノ酸残基であるLys316を欠失した変異型TLNはWTと同程度発現したが，Val315およびLys316を欠失した変異型TLNは発現しなかった．また，Gly314からLys316およびVal313からLys316を欠失した変異型TLNも発現しなかった．次に，部位特異的変異導入によりVal315をGly, Ala, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, およびArgに置換した変異型TLNを作製し，それらの発現を調べた．Gly, Trp, Asn, および荷電性アミノ酸に置換した変異体はほとんど発現しなかった．培養上清において発現が確認できたV315A, V315L, V315I, V315F, V315Y, V315Q, V315S, およびV315Tを精製し，カゼインおよびFAGLAに対する加水分解活性を調べたところ，全ての変異体において酵素活性はWTと同等であった．CDスペクトルより算出したヘリックス構造の割合はWTが36%であるのに対してV315Qは30%であり，それ以外の変異型TLNはWTと同様であった．50%のTLNが二次構造を消失する温度T_mはWTが88.8℃であり，V315Sは86.6℃，V315Qは83.8℃に低下した．以上のことから，TLNのC末端領域にある315位のアミノ酸残基は酵素活性に影響を与えないが，酵素タンパク質の発現および熱安定性に影響を与えることが示された．

thermolysin, site-directed mutagenesis, C-terminal

講演番号：4C09a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ C校舎09会場

ANS と MMP-7 の相互作用に関する MMP-7 の活性と ANS の蛍光の測定による解析

Interaction of 8-anilinonaphtalene 1-sulfonate (ANS) and human matrix metalloproteinase 7 (MMP-7) as examined by MMP-7 activity and ANS fluorescence

○Vimbai Samukange、保川 清、井上國世（京大院・農）
○Vimbai Samukange, Kiyoshi Yasukawa, Kuniyo Inouye (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

[Introduction] MMP-7 is the smallest matrix metalloproteinase. It plays important roles in tumor invasion and metastasis. ANS is a fluorescent probe. It emits a large fluorescence energy when the anilinonaphtalene group binds with proteins through hydrophobic interaction, while it does not emit fluorescence when the sulfonic group binds with proteins through electrostatic interaction.
[Objective] The objective of this research is to examine the interaction of ANS and MMP-7.
[Methods] (i) Preparation of MMP-7: Mature MMP-7 (Tyr78-Lys250) was expressed in *Escherichia coli* in the forms of inclusion bodies, solubilized with 6 M guanidine HCl, refolded with 1 M L-arginine, and purified by ammonium sulfate precipitation and heparin affinity column-chromatography. (ii) Enzyme reaction: After pre-incubation of MMP-7 and ANS for 10 min at 25°C, the reaction was initiated at 25°C by adding the substrate 7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl-L-Pro-L-Leu-Gly-L-Leu-[N^3-(2,4-dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl]-L-Ala-L-Arg-NH_2.
Fluorometric analysis was done by measuring the fluorescence intensity of the reaction solution at 393 nm with excitation at 328 nm for 1 min. HPLC analysis was done by applying the reaction solution to reversed-phase HPLC. (iii) ANS fluoroscence: After the pre-incubation for 10 min, the fluorescence spectra were measured with excitation at 380 nm and emission at 400-600 nm at 25°C.
[Results] (i) Inhibition of MMP-7 activity by ANS: At pH 4.5-9.5, the initial reaction rates (v_o) decreased with increasing the ANS concentration (0-500 μM). At pH 3.5, MMP-7 did not exhibit activity. The ANS concentrations giving 50% inhibition (IC_{50} values) at pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, and 9.5 were 120, 64, 90, 96, 92, and 135 μM, respectively. At 50 μM ANS, the v_o decreased with increasing pre-incubation time and reached the minimum at 10 min, indicating that ANS exhibits slow-binding inhibition of MMP-7. The k_{cat} and K_m values at pH 7.5 without ANS were 2.0 ± 0.1 s^{-1} and 53 ± 7 μM, respectively, and those with 100 μM ANS were 0.8 ± 0.1 s^{-1} and 52 ± 9 μM, suggesting that the inhibition is non-competitive. (ii) Effects of MMP-7 on ANS fluorescence: At pH 4.5-9.5, the ANS fluorescence was not changed by 500 nM MMP-7. At pH 3.5, the fluorescence intensity at 490 nm with 500 nM MMP-7 was 300 % of that without it, and the wavelength giving the maximum fluorescence with 500 nM MMP-7 was shorter by 16 nm than without it.
[Discussion] These results suggest that at pH 4.5-9.5, the sulfonic group of ANS binds with MMP-7 through electrostatic interaction, while at pH 3.5, the anilinonaphtalene group of ANS binds with MMP-7 through hydrophobic interaction.

ANS; metalloproteinase; MMP-7.

講演番号：4C09a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎09会場

タイトル *Coniochaeta* sp. NISL9330由来Fructosyl peptide oxidaseの基質特異性の改変

Title Improvement of substrate specificity of fructosyl peptide oxidase from *Coniochaeta* sp. NISL9330

○一柳 敦、五味 恵子、中津 亨[1]、加藤 博章[1]（キッコーマン・研本、[1]京大院・薬）

○Atsushi Ichiyanagi, Keiko Gomi, Toru Nakatsu[1], Hiroaki Kato[1]

(R&D Div., Kikkoman Corp., [1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

【目的】糖尿病患者数は増加の一途を辿っており、2007年の統計によると国内の患者数は予備軍を含め2210万人に達している。また、世界の患者数は2011年の3億6620万人から、2030年までに5億5180万人に達する見通しがある。その中で、国内では2010年7月に糖尿病診断基準が改定され、糖尿病診断の生体マーカーとしてHbA1cが非常に重要視されることとなった。HbA1cはヘモグロビンのβ鎖N末端のバリン残基に血中のグルコースが結合し、アマドリ転移して生成する糖化タンパク質であり、血中のHbA1c量は過去1～2ヶ月の平均血糖値を反映する。我々はこれまでに、HbA1cのβ鎖N末端から遊離されるN^{α}-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-valyl-L-histidine (F-VH)を酸化的に脱糖化する酵素Fructosyl peptide oxidase (FPOX)を発見し、世界初の酵素によるHbA1c測定法を開発した。本研究では、HbA1c測定キットの更なる性能向上を目指して、部位特異的変異導入によるFPOXの基質特異性の改変を行った。

【方法】*Coniochaeta* sp. NISL9330由来FPOX(FPOX-C)と*Eupenicillium terrenum* ATCC18547由来FPOX(FPOX-E)では、異なる基質特異性を示すことが既に明らかにされている(1)。そこで、FPOX-CとFPOX-Eそれぞれの耐熱型酵素であるFPOX-CETとFPOX-EETの結晶構造を比較し、基質認識に関与するアミノ酸残基を推定した。続いて、これらのアミノ酸残基を置換した変異型FPOX-CETを各種作製し、基質特異性を評価した。

【結果】FPOX-CETとFPOX-EETの結晶構造を比較した結果、予想される基質結合部位周辺では4ヶ所のアミノ酸残基が両FPOX間で保存されておらず、両FPOXの基質特異性の違いに寄与していることが示唆された。そこで、これらのアミノ酸残基をFPOX-EETと同一のアミノ酸残基に置換した変異型FPOX-CETを各種作製して基質特異性を評価した。その結果、一部の変異体では側鎖の電荷のチャージが変わることで基質特異性が向上し、よりF-VH特異的なFPOXへと変換された。続いて、両FPOX間で保存されている基質結合部位周辺のアミノ酸残基を対象として、側鎖のチャージを変更するアミノ酸置換を導入した変異型FPOX-CETを作製したところ、いずれのアミノ酸置換も基質特異性の改善に有効であった。これらの基質特異性改善効果を示すアミノ酸置換を組み合わせることで、高い基質特異性を示し、かつF-VHに対する高い反応性を備えた変異型FPOX-CETの獲得に成功した。

(1)Hirokawa, K., et al. Biochem Biophys Res Commun. 311 104-11(2003)

Fructosyl peptide oxidase, Substrate specificity, Site-directed mutagenesis

講演番号：4C09a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎09会場

エタノールアミン型リン脂質のγ-セクレターゼの*in vitro* 活性への影響

Effect of ethanolamine type phospholipid to *in vitro* activity of γ-secretase

○小野寺　智子[1]、佐々木　広美[2]、二井　勇人[2]、内田　隆史[2]、神尾　好是[3]、金子　淳[1]（[1]東北大院農・生物産業創成、[2]東北大院農・応生科、[3]山形大院・理工）

○Tomoko Onodera[1], Hiromi Sasaki[2], Eugene Futai[2], Takafumi Uchida[2], Yoshiyuki Kamio[3], Jun Kaneko[1]（[1,2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ., [3]Graduate School of Science and Engineering, Yamagata Univ.）

【背景・目的】アルツハイマー型認知症の原因物質としてアミロイドβ（Aβ）タンパク質が重要である。Aβは細胞膜貫通型のアミロイド前駆体タンパク質（APP）が複数のセクレターゼにより分解されて生じるペプチドである。それらのうち、最終的に作用するのが膜酵素複合体であるγ-セクレターゼである。γ-セクレターゼ複合体は活性本体であるpresenilin（PS）と、複合体の成熟に関わるNicastrin, Aph1, Pen2の4種類の膜貫通タンパク質からなる。Yagishitaらは酵母でγ-セクレターゼ構成タンパク質および基質となるAPPのC-末端側断片を発現させた酵母のミクロソーム膜画分を利用したγ-セクレターゼの*in vitro*アッセイ系を確立した。

本研究では、γ-セクレターゼが包埋されている酵母ミクロソーム画分の脂質を様々な生体膜構成リン脂質と置き換えることによるγ-セクレターゼの活性への影響を解析した。

【方法】γ-セクレターゼ各サブユニット及び基質であるAPPのC-末端断片（C99またはC55）を発現する酵母（PJ69-4A株）のミクロソーム膜画分をYagishitaらの方法に従い調製した。このミクロソーム膜画分（タンパク質として40μg～80μg相当）をCHAPSO（終濃度1%）で可溶化した。そこに1% CHAPSO/γbufferに溶かした種々のリン脂質を添加し、緩衝液でCHAPSO濃度を臨界ミセル濃度以下に希釈することで、再構成リポソームを得た。これを37℃で24時間インキュベート後、抗APP抗体によるwestern blottingでAβの産生を検出した。一方、8 Murea を含むポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動によりAβの分子種を解析した。

【結果】一般に酵母ミクロソーム膜の脂質組成はホスファチジルコリン(PC)が5割強、ホスファチジルエタノールアミン（PE）が3割強を占め、残りの大部分はホスファチジルイノシトール(PI)とホスファチジルセリン（PS）である。タンパク質量として40μg相当のミクロソームの全リン脂質は9.2μgであり、その10倍量相当のリン脂質を添加し再構成した。PCのみで再構成した場合、Aβ産生量は酵母ミクロソーム時の約2倍に増加したことから、γ-セクレターゼ及び基質の包埋環境を変化させるとγ-セクレターゼ活性に影響することが示唆された。さらにPCとPEの混合脂質で再構成したところ、PEの割合が高くなるとγ-セクレターゼ活性が抑制された。現在、他の膜構成脂質のγ-セクレターゼの活性に与える影響を検討中である。

参考文献：S. Yagishita, E. Futai, S. Ishiura, In vitro reconstitution of γ-secretase activity using yeast microsomes, Biochem. Biophys. Res. Commun., 377(1), 141-145 (2008).

γ-secretase, amyloid ß peptide, phospholipid

講演番号：4C09a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎09会場

枯草菌からのGABA代謝の転写制御因子であるGabRのX線結晶構造解析

X-ray crystal structure analysis of GabR, transcriptional regulator of GABA metabolism of Bacillus subtilis

○川嶋 進[1]、加藤 志郎[2]、白木 俊介[2]、奥田 啓太[2]、深田 はるみ[3]、伊藤 智和[2]、邊見 久[2]、吉村 徹[2]、後藤 勝[1]（[1]東邦大院・理、[2]名大院・生命農、[3]阪府大院・生命環境）

○Susumu Kawashima[1], Shiro Kato[2], Shunsuke Shiraki[2], Keita Okuda[2], Harumi Fukada[3], Tomokazu Ito[2], Hisashi Hemmi[2], Tohru Yoshimura[2], Masaru Goto[1]（[1]Grad. Sch. Sci., Toho Univ.、[2]Grad. Sch. Biol. Agrc. Sci., Nagoya Univ.、[3]Grad. Sch. of Life Env. Sci., Osaka Pref. Univ.）

【目的】γ-aminobutyric acid（GABA）は、脳の中枢神経系の抑制性神経伝達物質として機能することで知られているアミノ酸の一種であり、細胞内ではGABAアミノ基転移酵素およびコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素によって代謝される。枯草菌ではこれらGABA代謝を担う二つの酵素をコードしているgabTDオペロンの転写をGabRタンパク質が制御しており、GABA濃度の上昇により、転写活性化が引き起こされる。このGabRは、N末端にhelix-turn-helixモチーフを持ったDNA結合ドメイン、C末端にpyridoxal 5'-phosphateを補酵素とするアミノ基転移酵素ドメインを持つキメラタンパク質であり、約50塩基対の両端に存在するATACCA配列に特異的に結合することが報告されている。この様な特徴を持ったGabRはMocR/GabRファミリーのメンバーであり、現在までにこのファミリーに属しているタンパク質の立体構造は決定されていない。本研究では、GabRの立体構造をX線結晶構造解析により明らかにし、その転写調節機構を分子レベルで解明することを目的としている。

【方法】組み換え大腸菌により大量発現させたGabRを精製し、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いることで良質な結晶を得た。位相決定は白金および水銀の重原子誘導体による同型置換法で行い、セレノメチオニン化タンパク質からのデータによるメチオニンの座標を指標としてモデルの構築および精密化を行った。

【結果・考察】GabR結晶より、格子定数はa = 97.89、b = 101.73、c = 213.13 Å、空間群は$P2_12_12_1$であることが判明し、非対称単位胞中には二つのダイマーが含まれていることがわかった。2.35 Å分解能のデータセットを用いて精密化を行った結果、R_{factor}値が23.5 %、R_{free}値が29.9 %の立体構造を得ることに成功した。GabRダイマーは二つのサブユニットのアミノ基転移酵素ドメイン間で相互作用を形成し、一方、DNA結合ドメインは、他方のサブユニットのアミノ基転移酵素ドメインと結合している。同じサブユニットのDNA結合ドメインとアミノ基転移酵素ドメインは離れて存在し、その間を40残基からなる75 Åの長いループが繋いでいる。ダイマーのDNA結合ドメイン間の距離は160 Åであり、GabRが認識するDNAの二つのATACCA配列間の距離と一致していることが明らかとなった。

Keyword1, Crystal structure Keyword2, Transcriptional regulator Keyword3, PLP

講演番号：4C09a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ C校舎09会場

ウド(*Aralia cordata*) 由来レニン阻害物質の精製と同定

Isolation and identification of renin inhibitor from *Aralia cordata* (Udo)

○ 高橋砂織[1]、常盤野哲生[2]、畠恵司[1]、佐藤（保刈）美佳[1]、吉澤結子[2]、後藤　猛[3]
([1]秋田県総合食品研究センター、[2]秋田県立大学・生物資源、[3]秋田大学大学院・工学資源)
○ Saori Takahashi[1], Tetsuo Tokiwano[2], Keishi Hata[1], Mika Satou-Hokari[1], Yuko Yoshizawa[2], and Takeshi Gotoh[3] ([1]Akita Res. Inst. Food & Brew., [2]Biores. Sci., Akita Pref. Univ., [3]Dept. Appl. Chem., Akita Univ.)

【目的】レニンは、レニン・アンギオテンシン系による血圧調節機構において律速酵素として重要な役割を担っている。これまで、活性測定が容易なアンギオテンシン変換酵素を標的として各種食材よりその阻害物質の探索が多数行われてきた。しかしながら、レニンを標的酵素とした食物由来阻害物質の探索は殆ど行われていなかった。我々は食物由来レニン阻害物質の探索系を構築し [1]、これまでに大豆からソヤサポニンI [2]をまた米から遊離脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸を同定した [3]。さらに、各種サポニン類を用いた解析から、グルクロニドサポニンがレニン阻害サポニンであることを明らかとした [4]。今回、各種山菜よりレニン阻害物質を探索した結果、ウド（*Aralia cordata*）にレニン阻害活性のあることを見いだすとともに、阻害物質を単離しその構造を解析した。

【方法】組換え型ヒトレニンは、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系で発現しペプスタチンアフィニティーカラム等で精製した [1]。レニン活性の測定には新規蛍光消光基質 (*N*-methylanthranyl-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu*Val-Ile-Thr-His-*N*$^{\varepsilon}$-2,4-dinitrophenyl-Lys-D-Arg-D-Arg-NH_2) を用いた [1, 2]。各種山菜の凍結乾燥粉末のメタノール抽出液を調製し、レニン阻害検定用に用いた。

【結果】山菜（34 種類）のメタノール抽出液を用いてレニン阻害活性を検定した。その中でウド抽出液が最も強いレニン阻害活性を示した。そこで、ウド凍結乾燥品のメタノール抽出液を用いて阻害物質の精製を行った。精製には、C_{18} 逆相クロマトグラフィー、ゲル濾過や C_{18}PTLC を用いた。C_{18}PTLC において阻害物質は極性の相違により２成分に分離された。構造解析の結果、高極性化合物は(−)-kaur-16-en-19-oilc acid と同定された。低極性化合物は異性体である pimara-8(14), 15-dien-19-olic acid と pimara-9(11), 15-dien-19-olic acid の 4:1 の混合物であることが示された。これらの化合物はヒト型レニン以外にブタ腎臓レニンを阻害したが、他のプロテアーゼには作用を示さず、レニン特異的阻害物質であることが示された。

【参考文献】

[1] Takahashi S. *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **71**, 2610-2613 (2007).
[2] Takahashi S. *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **72**, 3232-3236 (2008).
[3] Takahashi S. *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **74**, 1713-1715 (2010).
[4] Takahashi S. *et al*., *Biomed. Res*., **31**, 155-159 (2010).

Renin, Inhibitor, *Aralia cordata*

講演番号：4C09a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ C校舎09会場

レニン阻害活性を強化した味噌の開発

Development of high renin inhibitory miso

○渡辺 隆幸、佐々木 康子、高橋 砂織（秋田県総食研）
○Takayuki Watanabe, Koko Sasaki, and Saori Takahashi (ARIF)

【背景・目的】

レニンは高血圧の原因酵素であるが、大豆や味噌抽出物にその阻害活性が認められており［1］、またその阻害に大豆中のソヤサポニンⅠが大きく関与していることが明らかになっている［2］。味噌は原料や製造法が多様であることから、本研究では様々な味噌のヒト型レニン阻害活性を検討し、製造条件と阻害活性との関連を調べた。さらに味噌のレニン阻害活性を強化する味噌の開発を目的に大豆胚軸を大豆と代替えした味噌の製造試験を行い、そのレニン阻害活性を調べた。

【方法】

レニンは、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて発現し、ペプスタチンアフィニティーカラムで精製した。レニン活性は新規レニン活性測定用蛍光消光基質を用いて測定した［2, 3］。味噌（10g)に蒸留水 100 ml を加えホモゲナズ後 105℃、10 分間のオートクレーブ処理をした。遠心上清を ODS カラムに添加し、蒸留水で十分に洗浄後 100ml のメタノールで溶出した。溶出液を減圧乾燥後、秤量し DMSO に溶解して阻害検定に用いた。

【結果】

味噌のサンプルとした全国の市販味噌 73 点、全国味噌鑑評会優秀見本味噌 7 点、秋田県味噌醤油品評会出品味噌 16 点の味噌の抽出物はいずれもレニン阻害活性を示し、味噌には普遍的にレニンの働きを阻害する物質が含まれていることが示された。また小仕込み試験により、麹菌の違い、酵母、乳酸菌の添加の有無は味噌抽出物のレニン阻害活性に影響を与えないことを認めた。さらにソヤサポニンⅠを多く含むことが予想される大豆胚軸を味噌製造時に大豆の代替えとして使用することにより、最大で 2 倍のレニン阻害活性を有する味噌の製造が可能であることが示唆された。

【参考論文】

1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2913-2918 (2006).
2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232-3226 (2008).
3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007).

【謝辞】本研究は、平成 22 年度社団法人中央味噌研究所研究助成により行われました。

講演番号：4C09a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ C校舎09会場

アンギオテンシン I 変換酵素およびカルボキシペプチダーゼ Y の新規蛍光消光基質の開発

Novel internally quenched fluorescent substrates for angiotensin I-converting enzyme and carboxypeptidase Y

高橋砂織，小野洋輝[1]，○後藤　猛[1]，熊谷（芳澤）久美子[2]，杉山俊博[3]（秋田県総食研セ，[1]秋田大院・工資，[2]（株）ペプチド研，[3]秋田大院・医）

Saori Takahashi, Hiroki Ono[1], ○Takeshi Gotoh[1], Kumiko Yoshizawa-Kumagaye[2], and Toshihiro Sugiyama[3] (Akita Res. Inst. Food & Brew., [1]Dept. Appl. Chem. Akita Univ., [2]Peptide Inst. Inc. [3]Dept. Biochem. Akita Univ. Med.)

【目的】

レニン・アンギオテンシン系は，哺乳類で最も研究が進んでいる血圧調節機構である。その中でアンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) は古くから研究が行われており，本酵素の代表的阻害剤としてカプトプリルやリシノプリルが知られている。また，食材由来の各種 ACE 阻害物質の探索が数多く報告されており，特定保健用食品開発につながったケースも数多く見受けられる。

ACE の活性測定には，Hippuryl (Hip)-His-Leu が広く用いられており，加水分解産物の Hippuric acid を抽出して分光学的手法で測定するか，His-Leu を蛍光標識して測定する方法が一般的である。今回，ACE の迅速活性測定用新規蛍光消光基質を開発したので報告する。さらに，本基質を用いることで，カルボキシペプチダーゼ Y (CPY) の活性測定も簡便・迅速に行えることが判明したので併せて報告する。

【方法】

ACE の生理基質であるアンギオテンシン I の N 末端アミノ酸配列を基にして，N 末端側に蛍光物質である *N*-メチルアントラニル酸 (Nma) を，また C 末端に蛍光消光物質であるジニトロフェニル基(Dnp)をリジンのεアミノ基に導入した Lys(Dnp)を有する新規蛍光消光基質 Nma-Phe-His-Lys(Dnp) を合成した。また，C 末端に Pro を導入することで ACE の基質結合能が強まるとの報告があることから，C 末端に Pro を導入した Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro も併せて合成した。これら新規合成基質および Hip-His-Leu とウサギ肺由来 ACE (Rab-ACE)，組換え型ヒト ACE (Rh-ACE) および CPY を用いて反応動力学的解析を行った。

【結果】

Nma-Phe-His-Lys(Dnp)，Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro，Hip-His-Leu を基質として用い場合の Rab-ACE および Rh-ACE に対する k_{cat}/K_m 値はそれぞれ 5.12, 1.90, 0.80 μM^{-1} s^{-1} および 16.0, 7.36, 0.30 μM^{-1} s^{-1} と求められた。したがって，これらの基質の中で，Nma-Phe-His-Lys(Dnp) が Rh-ACE の優れた基質であることが示された。また，本基質は，CPY の基質としても有用であることが示された。

Angiotensin I-converting enzyme (ACE), carboxypeptidase Y

講演番号：4C09a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ C校舎09会場

サルナシ果実システインプロテアーゼの酸で誘起される変性について

Acid-induced denaturation of cysteine protease of Actinidia arguta

木股 浩貴，中根 裕子，水野 仁[1]，鈴木 淳巨[1]，○杉山 康雄（名大・遺伝子，[1]名大院・工）
Hiroki Kimata, Yuko Nakane, Jin Mizuno[1], Atsuo Suzuki[1], ○Yasuo Sugiyama (Nagoya Univ, Cent Gene Res., and Nagoya Univ, Grad. Sch. Engi.[1])

【目的】パパインやブロメラインなどの植物プロテアーゼは古くから駆虫剤や抗炎症剤として用いられている。我々はサルナシ果実プロテアーゼアイソフォームの有効利用を目指して，それらの立体構造やコードする遺伝子（部分配列）を解析してきた。本研究では，（１）アイソフォームをコードする完全長cDNAを単離し，それらの大腸菌発現系を構築すること，（２）プロテアーゼの酸や熱に対する安定性を調べ，経口薬として活用する上での課題を得ることを目的とした。
【方法】サルナシ果実からRNAを抽出し，RT-PCRを行った。PCRプライマーはキウイフルーツアクチニジン遺伝子の塩基配列を基に設計した。サルナシ果実に含まれるプロテアーゼアイソフォーム１（saru-A-1）を精製し，その構造と酵素活性の熱安定性を調べた。
【結果】
１．RT-PCRによって多数の完全長cDNAクローンを得た。それらは少なくとも8種類のアイソフォームに分類できた。従って，果実には多数のプロテアーゼアイソフォームが発現している。そこで，アイソフォームの大腸菌発現系を構築し，それらの物性を比較評価する準備を始めた。
２．アクチニジンやパパインなどの精製プロテアーゼは70℃2分の加熱後も活性を保持していることが知られている。一方，サルナシ果汁中のプロテアーゼは45℃2分の加熱で失活した。そこで，果汁中でプロテアーゼの熱安定性が低下する原因を探った。
３．果汁のpHが3.5であることから，精製プロテアーゼsaru-A-1をpH3.5の緩衝液中で熱処理したところ，処理時間に依存して失活が起こった。失活速度は，pHが低いほど早くなった。従って，果汁中に特異的プロテアーゼ阻害剤が存在するのではなく，果汁由来のpHの低下によってプロテアーゼが失活すると考えられた。また，酸性pHで精製プロテアーゼsaru-A-1は部分的に凝集した。
４．pH3.5の緩衝液中で熱処理して失活させた精製saru-A-1の構造を調べた。骨格領域と芳香族領域でCDスペクトルはこの熱処理前後で殆ど変化はなく，また，失活プロテアーゼは結晶となり，その構造も熱処理前後で殆ど変化はなかった。
【考察】
精製saru-A-1プロテアーゼは，立体構造の変化を伴わずに不可逆的に失活したと思われる。失活の原因はおそらく活性部位のSH基の酸化であろう。今後，大腸菌発現系を使って，酸による変性の程度が軽減した変異導入プロテアーゼなどをデザインする予定である。

cysteine protease, stability, inactivation

講演番号：4C09a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ C校舎09会場

パパイヤ抽出液における微弱なL/D-ペプチドイソメラーゼ活性の検出

Detection of weak L/D-peptide isomerase activity in aqueous extract of papaya fruit

○荒川 健佑[1,2]、Jennifer M. S. Koh[1]、Ben Crossett[1]、Allan M. Torres[3]、Philip W. Kuchel[1,4]
([1]シドニー大、[2]岡山大院自科、[3]西シドニー大、[4]シンガポール科技研SBIC)
○Kensuke Arakawa[1,2], Jennifer M. S. Koh[1]、Ben Crossett[1]、Allan M. Torres[3]、Philip W. Kuchel[1,4]
([1]Univ. Sydney, [2]Okayama Univ., [3]Univ. Western Sydney, [4]SBIC A*STAR)

【目的】生物によってリボソーム上で生合成されるタンパク質・ペプチドは、基本的にL-アミノ酸で構成される。しかしながら、いくつかの生物活性ペプチドは、翻訳後変換によって構成アミノ酸にD-アミノ酸を含むことが知られている。この翻訳後変換を触媒する酵素はL/D-ペプチドイソメラーゼと呼ばれ、カモノハシなどいくつかの動物において見出されている。本研究では、L/D-ペプチドイソメラーゼ活性を植物において初めて検出することを目的とした。
【方法】材料として、様々な酵素を含むことが知られる未熟および完熟のパパイヤ（*Carica papaya* L.）の果肉および種子を用いた。それぞれ一定量を1%トレハロース水溶液中で細断・懸濁し、遠心上清から限外ろ過処理によって10-30 kDa濃縮画分と30-100 kDa濃縮画分を得た。各画分におけるL/D-ペプチドイソメラーゼ活性の有無は、カモノハシ型ペプチドイソメラーゼ（N-末端から2残基目のアミノ酸を光学異性化する）の合成基質ヘキサペプチドI(Nle)FsrsおよびI(nle)Fsrs（小文字はD-アミノ酸残基を表す）に対する反応を検出することで確認した。反応生成物の検出にはRP-HPLCとMALDI-TOF-MSを用いた。また、パパイヤに含まれると考えられるL/D-ペプチドイソメラーゼの安定性を加熱処理や阻害剤を用いることにより試験した。
【結果】各抽出液を用いて基質I(Nle)Fsrsに対する反応（48 h）を観察したところ、それぞれの30-100 kDa画分において生成物I(nle)Fsrsへの光学異性化の可能性がMALDI-TOF-MSにより確認された。10-30 kDa画分にはL/D-ペプチドイソメラーゼ活性は検出されなかった。I(nle)FsrsからI(Nle)Fsrsへの逆反応は、完熟パパイヤ種子抽出液の30-100 kDa画分のみにわずかに検出されたが、その他の30-100 kDa画分では結果が不明瞭であった。これらの結果より、パパイヤのL/D-ペプチドイソメラーゼは、カモノハシ型と同様、30-100 kDa画分に含まれ、D-to-L-反応よりもL-to-D-反応を見かけ上強く触媒することが示唆された。次に、最も強い活性を示した完熟パパイヤ種子の抽出液に関して、より高濃度の30-100 kDa画分を作製し、基質I(Nle)Fsrsと反応させた。その結果、24-48 h反応後に生成物I(nle)FsrsのピークをRP-HPLCにて検出した。しかし、本反応は、カモノハシ型と比較して、非常に微弱で遅い反応であった。また、本反応は、カモノハシ型と同様に、メタノールによって大きく阻害され、ジエチルピロカーボネートにより一部阻害されたが、カモノハシ型と異なり、熱処理（60℃, 5 min）やアマスタチンによってはほとんど阻害されなかった。以上は、植物におけるL/D-ペプチドイソメラーゼ活性を検出した初めての成果であり、一部の動物だけでなく、あらゆる生物にL/D-ペプチドイソメラーゼが存在する可能性を示唆している。

papaya, L/D-peptide isomerase, D-amino acid

講演番号:4C09a12
講演日時、会場:3月25日11:21～ C校舎09会場

放線菌由来D-アミノペプチダーゼ：ペプチド結合形成反応におけるアシル受容体認識

Recognition of acyl acceptor in *Streptomyces* D-aminopeptidase

○下根 可奈、森 信寛、永野 真吾[1]、有馬 二朗（鳥取大農・生資環、[1]鳥取大院・工）

○ Kana Shimone, Nobuhiro Mori, Shingo Nagano[1], Jiro Arima (Tottoridai-Nou, Tottoridaiin-Kou)

【目的】ファミリーS12に属するペプチダーゼは、細菌の細胞壁構築に関与すると考えられ、D-アミノ酸を有する化合物に広く反応することで知られる。我々はこれまでに、*Streptmyces* sp.82F2よりアミノリシス活性を有するファミリーS12ペプチダーゼ（D-アミノペプチダーゼ）を見出し、その触媒機能を利用することで、水溶液中1-ポット／1-ステップで、様々なDL配列を持つペプチドを選択的に合成できることを明らかにした。ここで、本酵素の加水分解活性とアミノリシス活性には、基質としての水（加水分解）及びアミン類（アミノリシス）の認識が関与し、その構造的要因に興味が持たれる。本研究では本酵素のアミノリシス反応に着目し、アシル受容体認識の検討を行うとともに、酵素―基質複合体の立体構造解明に向けた結晶化を試みた。
【方法】アシル供与体及び受容体に対するKinetics解析には、D-Phe-OBzl（アシル供与体）及びL-TrpもしくはL-Trp-OMe（アシル受容体）を用い、酵素反応生成物はLC/MSを利用して解析した。本酵素の結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法で行った。
【結果】アシル受容体に対する本酵素のKmは、L-Trpでは約300 mM、L-Trp-OMeでは約8.5 mMであり、そのカルボキシ基の構造に大きく影響を受ける結果となった。更には、アシル供与体に対するKmは存在するアシル受容体の種類で異なり、D-Phe-OBzlに対するKmは加水分解では0.04 mMであったが、L-Trp及びL-Trp-OMeをアシル受容体としたときは、それぞれ約4 mM及び0.4 mMであった。この結果、本酵素はアシル受容体を酵素内に取り込んだ後、アシル供与体と結合して反応が進み、アシル供与体との結合はアシル受容体の構造に影響することが示唆された。上記性質の構造的要因に迫ることを目的に、本酵素の結晶化スクリーニングを行った。その結果、1.6Mクエン酸Na(pH6.0)において針状結晶が得られ、3%1,8-ジアミノオクタンを添加剤として加えると八面体結晶、3%1,6-ジアミノヘキサンを加えるとロッド状の結晶が得られた。また、添加剤のアミン類をアシル受容体として酵素反応を行ったところ、共にアシル受容体として利用することが確認された。さらには得られた八面体結晶についてX線回折を行なったところ、約1.5Å分解能の回折データが得られた。

Keyword1,peptide bond formation; Keyword2, substrate recognition; Keyword3 crystallization

講演番号:4C09a13
講演日時、会場:3月25日11:32～ C校舎09会場

放線菌由来D-アミノペプチダーゼ：アシル供与体認識に関わる残基の同定と機能改変

Residues associated with substrate recognition of *Streptomyces* D-aminopeptidase

○有馬 二朗、橋崎 泰明、森 信寛（鳥取大農・生資環）
○Jiro Arima, Yasuaki Hashizaki, Nobuhiro Mori (Tottoridai-Nou)

【目的】D-アミノ酸を含有するペプチドには、特異な生理活性を示す例があり、多様な機能や生理活性が期待できる素材であると考えられている。しかしそのようなペプチドは、自然界に殆ど存在していないため、その構造と活性との相関は未だ網羅されていない。D-アミノ酸を含有するペプチドを効率的かつ幅広く合成出来る手法があれば、新たな機能ペプチドの同定から生産まで広範囲な応用が期待できる。我々はこれまでに、アミノリシス活性を有するファミリーS12ペプチダーゼ（D-アミノペプチダーゼ）を*Streptomyces* sp. 82F2から見出し、その触媒機能を利用することで、DL配列を持つジペプチドを選択的に合成できることを明らかにした。そこで、合成できるジペプチドの幅を広げるべく、本酵素の基質特異性改変を目的とした変異解析を行った。
【方法】野生型及び変異酵素の生産は、大腸菌を用いた菌体外発現系を利用し、イオン交換スピンカラムに供することで、生成を行った。アシル供与体及び受容体に対する特異性の解析は、D-アミノ酸エステル（アシル供与体）及びL-アミノ酸エステル（アシル受容体）を対象にし、酵素反応生成物はLC/MSを利用して解析した。
【結果】20%の相同性を持つ*Streptomyces* sp. R61株由来 DD-peptidaseの立体構造を参考に、活性中心付近に存在する残基、Lys89、Tyr191、Asn193、His334を特定した。これらの残基に変異を施した結果、Lys89の変異により完全に酵素機能が失われ、Tyr191、His334の変異によって著しい触媒機能の低下がみられた。従って、Lys89は触媒反応には必須であり、Tyr191及びHis334も酵素機能の発現に寄与していることが示唆された。一方で、Asn193をAspに置換すると(N193D)、D-Phe誘導体に対する加水分解活性が野生型より3倍近く増加した。N193Dはアミノリシス活性も野生型酵素と大きく異なり、アシル受容体(合成されるジペプチドのC側のアミノ酸)をL-Leu-OMeに固定してペプチド合成活性を調べた結果、D-His、D-Ser、D-Val誘導体をアシル供与体（合成されるジペプチドのN側のアミノ酸）として利用したときに、飛躍的な合成活性の上昇がみられた。これらの結果、Asn193はアシル供与体基質の側鎖認識に関わる残基であることが考えられ、この残基のランダム変異による様々な特異性を持つ酵素創成への可能性が示された。

Keyword1,aminopeptidase; Keyword2, substrate recognition; Keyword3 aminolysis

講演番号:4C09a14
講演日時、会場:3月25日11:43～ C校舎09会場

DL-配列を有するペプチド類の酵素合成と抗菌性ペプチド類の同定

One-pot enzymatic synthesis of diverse DL-configuration peptides for screening of antibacterial agents

○磯田 佳孝、森 信寛[1]、有馬 二朗[1]（鳥取大院・農学、[1]鳥取大農・生資環 ）
○Yoshitaka Isoda, Nobuhiro Mori[1], Jiro Arima[1] (Tottoridaiin, Tottoridai[1])

【目的】近年、D-アミノ酸に関する研究の進展と共に、優れた機能を有するD-アミノ酸含有ペプチド類が発見されつつある。しかしD-アミノ酸含有ペプチド類に関する研究は歴史が浅く、L-アミノ酸からなるペプチド類と比較すると機能が未同定のペプチドが多数存在していると考えられる。従って、今後は様々な当該ペプチド類を対象とした生理機能に関する研究が進められることが予測される。我々がこれまでに見出したファミリーS12に属するアミノペプチダーゼ（D-アミノペプチダーゼ）は、D-アミノ酸誘導体に対しアミノリシス反応を触媒し、様々なD-アミノ酸含有ペプチド類の安全な合成が可能である。また当酵素はD-アミノ酸誘導体をアシル供与体、L-アミノ酸をアシル受容体として優先的に利用し、D-,L-配列を有するペプチドを高収率に合成する。本研究では、D-,L-配列を有するペプチド類を対象に、新たな有用ジペプチド類を探索することを目的とし、ペプチド類ライブラリーの構築と抗菌活性を有している化合物の同定を行なった。
【方法】ライブラリーは、96穴マイクロプレートにD-アミノペプチダーゼ、D-アミノ酸エステル（アシル供与体）そしてL-アミノ酸誘導体もしくはジペプチド（アシル受容体）を混合し、2時間及び24時間反応を行うことで構築した。また、酵素反応生成物の抗菌活性を評価するにあたり、酵素反応を行っていない基質だけのものを比較対照とした。抗菌活性試験には、グラム陰性菌である緑濃菌およびグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌を用い、96穴培養プレートを用いて各化合物の存在下で各菌を一晩培養し、培養後の濁度測定により生育阻害活性を評価した。
【結果】およそ1400種のD-アミノ酸を含有するジペプチド類を合成し、抗菌活性を評価した。その結果、黄色ブドウ球菌に対し抗菌活性を示すペプチド類が15種類選抜された。これらの化合物にはD-Trpを含むものが多く、それに続く構造として、疎水性の側鎖をもつL-アミノ酸誘導体やジペプチドを擁しているものが殆どであった。一方で、本アッセイからは緑濃菌に対し抗菌活性を有するペプチド類は見いだせなかった。得られた抗菌作用を有するペプチド類のMIC値を算出した結果、およそ0.1～0.15mg/mlであった。現在は得られた化合物の活性と構造との相関について詳細な検討を行っている。

Keyword1, D-amino acid; Keyword2, antimicrobial activity; Keyword3, dipeptide

講演番号：4C09a15
講演日時、会場：3月25日11:54～ C校舎09会場

好熱性細菌 *Thermus* sp. O-3-1 由来耐熱性アミダーゼの特性解析

Molecular Characterization of Thermostable Amidase from *Thermus* sp. O-3-1

○小林 史明，青峰 弘起，大滝 証[1]，尾高 雅文[1]，養王田 正文[1]，水無 渉[2]，湯 不二夫[2]
田村 隆，稲垣 賢二（岡山大院･自然科学，[1]東京農工大院・工，[2]三菱レイヨン株式会社）
○Fumiaki Kobayashi, Hiroki Aomine, Akashi Ohtaki[1], Masafumi Odaka[1], Masafumi Yoda[1], Wataru Mizunashi[2], Fujio Yu[2], Takashi Tamura, and Kenji Inagaki（Grad. Sch. Nat. Sci. Tech., Okayama Univ., [1]Dept. Biotechnol, Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Mitsubishi Rayon Co., Ltd.）

【目的】アミダーゼは，アミド化合物を加水分解反応によってカルボン酸化合物とアンモニアに変換する酵素であり，様々な微生物に存在する。我々はこれまでに，好熱菌 *Thermus* sp. O-3-1 から見出した高い耐熱性を持つアミダーゼを *E.coli* JM109 を用いて組み換えアミダーゼとして発現，精製した。 その精製酵素を用いて X 線結晶構造解析を行った[1)]。活性中心には電子密度の強さから金属原子を 2 つ持つ二核金属構造をしていると考えられた。2 つの金属原子のうち，1 つは水分子と結合していることが分かり，触媒に関与していることが考えられた。今回はこの組み換えアミダーゼの性質や構造特性についての知見を得るために，基質特異性の検討と含有金属の同定を試みた。

【方法】金属の同定を ICP-MS（Inductively Coupled Plasma：誘導結合プラズマ）と Ferrozine 試薬を用いた鉄の定量法を用いて行った。Ferrozine は 2 価の鉄イオンと安定な錯体を形成し，555 nm に特徴的な吸収ピークを生じるため，塩化鉄（Ⅱ）を用いた検量線からアミダーゼが持つ鉄含量を測定した。またアミノアシル *p*−ニトロアニリド試薬を用いて基質特異性の検討を行った。アミダーゼによる加水分解によって生じる *p*−ニトロアニリンを 405 nm の吸収を見ることで活性を算出した。

【結果】ICP-MS によって含有金属の同定を試みた結果，タンパク質 1 mol に対して Fe^{2+}が約 1.8 mol 含まれていることが示唆され，ほかにも Ca^{2+}と Zn^{2+}がタンパク質 1 mol あたり約 1 mol ほど確認された。さらに Ferrozine による鉄の定量でも鉄イオンが確認されたため，本酵素が鉄イオン含有酵素であることが考えられた。基質特異性の検討では本酵素が D-Leu-pNA に対して L-Leu-pNA よりも約 10 倍高い活性を示し，速度論解析を行った結果，k_{cat}/K_m からも D-Leu-pNA が最も良い基質であることが分かり，D 体のアミノ酸誘導体に特異的に作用する性質があることが考えられた。

1)小林ら，第10回日本蛋白質科学会年会プログラム・講演要旨集，p. 99（2010）

amidase, thermostable enzyme, crystal structure

講演番号：4C10a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ C校舎10会場

ジャンボタニシ由来リゾチームの精製および構造解析

Purification and structural analysis of lysozyme from apple snail

○吉村　愛美，中島　智史，荒木　朋洋（東海大・農）
○Itomi Yoshimura, Tomofumi Nakajima, Tomohiro Araki (Tokai Univ.)

【目的】リゾチームは生物界に広く分布する生体防御に関する酵素である．近年，無脊椎動物中から新たなタイプのリゾチームが（i-タイプ）が発見され，ヒトデやアサリなどでi-タイプリゾチームについて報告されている．またホタテからはi-タイプに加え，g-タイプリゾチームが発見されている．巻貝についてはサカマキガイからのg-タイプリゾチームの一次構造の報告のみである．本研究では報告の少ない巻貝のリゾチームの分離・精製・構造解析を目的として行った．
【方法】ジャンボタニシリゾチームの精製は，4倍量の2%酢酸でホモゲナイズ後，上清を粗抽出とし，50%飽和で硫安分画を行った．硫安沈殿物は4倍量の2%酢酸で溶解し，凍結後再溶解し，沈殿物を除去した．上清は100%硫安飽和沈殿物とし，3倍量の2%酢酸で溶解した．溶解液はG3000SWを用いたHPLCでゲルろ過後，活性画分をC4逆相HPLCに供した．精製したリゾチームはカルボキシメチル（Cm）化後トリプシン及びV8プロテアーゼ消化を行った．消化物はC18逆相HPLCで分離し，アミノ酸組成分析及びプロテインシークエンサーによる配列分析を行った．溶菌活性測定は，　*Micrococcus luteus*を用いて行った．分子量はSDS-PAGEを用いて測定した．
【結果】ジャンボニシは2%酢酸でホモゲナイズ後，上清を粗抽出液とした．粗抽出液を用いて溶菌活性測定を行ったところ高い活性が検出され，リゾチームが含まれていることが分かった．精製においては，透析膜での塩の除去やイオン交換クロマトを試みたが，セルラーゼ活性が強く，透析膜や樹脂が分解されたため，粗抽出液を硫安分画，凍結解凍操作，シリカ系樹脂を用いたゲルろ過及び逆相HPLCにより精製を行った．これらの操作により単一のリゾチームを得た．本リゾチームはSDS-PAGEの結果，分子量約20kDaと推定された．精製過程中，凍結解凍を行うことで夾雑タンパク質が選択的に沈殿することを見出し，比活性が上がった．精製したリゾチームはN末端アミノ酸配列分析の結果，ANTCHGNI‐の配列が決定され，サカマキガイ由来のg-タイプリゾチームのN末端配列と相同性を示した．そこで本リゾチームはCm化後トリプシン及びV8プロテアーゼ消化を行った．トリプシン消化では21個，V8プロテアーゼ消化では10個のペプチドを分離した．トリプシン消化ペプチドからは21個，V8プロテアーゼ消化ペプチドからは5個のアミノ酸配列を決定した．配列を決定したペプチドのうち，トリプシンペプチドで５個の，V8プロテアーゼペプチドで３個のペプチドがサカマキガイg-タイプリゾチームと相同性を有することが明らかとなり，これらの配列の相同性は60.2%であった．しかし，相同性が見出されないペプチドも存在することからサカマキガイリゾチームと相同性が低い部分も存在すると推定された．以上の結果から本リゾチームはg-タイプリゾチームであると推定され，巻貝から初めて成熟タンパク質としてg-タイプリゾチームを分離・精製したが，新規のアミノ酸配列を有すると推定された．

lysozyme, invertebrate, snail

講演番号：4C10a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ C校舎10会場

ニワトリ型リゾチームの構造と機能に対する触媒基Asp52が形成する水素結合ネットワークに関与するAsp48の役割

The role of Asp48 in the hydrogen-bonded network involving Asp52 on structure and function of chicken lysozyme

○川口裕也、河村俊介、米田一成、鳥潟隆雄、荒木朋洋（東海大・農）
○Yuya Kawaguchi, Shunsuke Kawamura, Kazunari Yoneda, Takao Torikata, Tomohiro Araki (Tokai Univ.)

【目的】ニワトリ型リゾチーム(HEL)は、N-アセチルムラミン酸(MurNAc)とN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)のヘテロポリマーや、(GlcNAc)のホモポリマーのβ-1,4結合を加水分解する酵素である。HELの触媒基Asp52の側鎖は、周辺のアミノ酸残基（Asn46、Asp48、Ser50、Asn59）と水素結合ネットワークを形成している。本研究では、触媒基Asp52が形成する水素結合ネットワークの役割を調べるため、この水素結合ネットワークに関与するAsp48をAlaに置換した変異体(D48A)を作製し、機能解析及び立体構造解析を行った。
【方法および結果】作製したD48A変異体は、HELと比較することで解析した。変性剤であるグアニジン塩酸に対する構造安定性は－2.65 kcal/molに低下した。また、HELは、6個の基質結合部位(AからF部位)が存在するため、これらの部位の基質結合力を測定した。まず、AからC部位に$(GlcNAc)_3$が結合するため、この解析からAからC部位の結合力の変化を調べた。その結果、結合力に変化はなかった。次に、キチンカラムを用いて、リゾチームの溶出位置からAからF部位全体の基質結合力を定性的に評価した。その結果、キチンカラムに対する親和性は減少した。これらの結果より、D48AではDからF部位の基質結合力の低下が示唆された。また、$(GlcNAc)_5$に対する活性では、HELが20分で基質5量体を完全に分解するのに対し、D48Aは240分で基質が消失した。さらに、活性のコンピューターシミュレーションを行い、基質結合力と反応パラメーターを求めた結果、DからF部位の基質結合力が変化し、触媒活性が低下した。さらに、D48Aと$(GlcNAc)_4$の複合体のX線結晶構造解析を行い、HELと$(GlcNAc)_4$の複合体の構造と比較することで、変異における構造変化を解析した。その結果、主鎖構造に変化は見られなかったが、触媒基Asp52が形成する水素結合ネットワーク周辺の構造は、置換により、Ser50との水素結合が欠失し、Asn59の側鎖の配向変化が見られた。また、触媒基Asp52の配向変化も観察され、水素結合ネットワーク様式がHELと変化していた。さらに、E・F部位の基質結合に関与すると考えられているアミノ酸残基の側鎖の配向変化が見られた。このことから、コンピューターシミュレーションで示されたDからF部位の基質結合力の変化と触媒活性の低下を、立体構造解析で詳細に明らかにした。すなわち、Asp48は、触媒基Asp52の側鎖の配向を規定する水素結合ネットワーク周辺のアミノ酸の側鎖の配向維持に関与していることで触媒基Asp52の触媒作用に重要であることが明らかとなり、さらに、機能解析により、Asp48は、基質結合部位のD-F部位の基質結合力、触媒活性および構造安定性に関与していることが明らかとなった。

Chicken lysozyme, catalytic activity,　hydrogen-bonded network

講演番号：4C10a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ C校舎10会場

リゾチーム遷移状態アナログ阻害剤の設計と加水分解メカニズムの解明

Molecular design of lysozyme transition state analog inhibitor and elucidation of hydrolytic mechanism

○鈴木亜日里、尾形慎[1]、梅本尚之[2]、大沼貴之[2]、深溝慶[2]、碓氷泰市[1]（静岡大農・応生化、[1]静岡大・創科技、[2]近畿大院農・バイオ）

○Akari Suzuki, Makoto Ogata[1], Naoyuki Umemoto[2], Takayuki Ohnuma[2], Tamo Fukamizo[2], Taichi Usui[1] (Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [1]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Advanced Bioscience, Kinki University)

【目的】本研究では、現在までに提唱されているニワトリ卵白リゾチーム（HEWL）の加水分解メカニズムをもとに2種類の*N*-アセチルキトオリゴ糖還元末端誘導体を設計および合成した。さらに、HEWLに対する動力学的解析を行うことで、その阻害効果およびHEWLの水解機構に対する検証を行った。

【方法及び結果】初めに、Phillipsらが提唱したオキソカルボニウムイオン中間体に基づくアナログ阻害剤を我々が開発した還元末端特異的*N*-アセチルグルコサミン構造変換反応などを用いて合成し、還元末端に安定な半いす型構造（2,3-ジデオキシ-1,5-ラクトン体；L）を有するキチンオリゴ糖誘導体（GN_n-L；n=1~3）を合成した。さらに、Koshlandらの推定した遷移状態に基づいて、イス型配座の1-デオキシグルコース環酸素が塩基性アミノ基に置換した1-デオキシノジリマイシン（モラノリン；M）を末端に有するキチンオリゴ糖誘導体（GN_n-M；n=1~3）を酵素法により合成した。これら各阻害剤を以下の3つの相互作用解析に基づいて評価した。

① 50%阻害濃度（IC_{50}）：*Micrococcus lysodeikticus*菌体および*N*-アセチルキトヘキサオース（GN_6）を基質として、前者は濁度法により、後者はHPLCによりIC_{50}を算出した。その結果、*M. lysodeikticus*菌体およびGN_6のどちらの基質に対しても、*N*-アセチルキトテトラオースの還元末端誘導体であるGN_3-Mが最も強い阻害活性を示した。

② 阻害形式：IC_{50}値から阻害活性の強かったGN_3-Mを用いてHEWLに対する阻害形式をLineweaver-Burk plotにより求めた。

③ 等温滴定カロリメトリー（ITC）：各阻害剤の結合親和性をITCにより測定した結果、阻害試験同様GN_3-Mが最も強力な結合親和性（K_d=7.5×10^{-7} M）を示した。また、GN_3-Mを阻害剤に用いた際のリゾチーム熱容量変化（ΔC_p）の値より、HEWLの基質結合サイト内のトリプトファン残基（Trp62）とGN_3-Mとのスタッキング相互作用によると思われる熱容量変化が観察された。

以上の結果より、本阻害剤の中で末端にイス型配座を有するGN_3-MがHEWLに対して最も高い結合親和性を示し、本相互作用にはモラノリン残基が大きく関与していることが示された。更なる確証を得るために、現在HEWLとGN_3-Mとの共結晶構造解析を試みている。

lysozyme, inhibitor, mechanism

講演番号：4C10a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎10会場

固定化セロビオース 2-エピメラーゼによるエピラクトースの合成

Efficient Production of Epilactose with Immobilized Cellobiose 2-Epimerase

佐藤 央基、○佐分利 亘、小島 晃代[1]、田口 秀典、森 春英、松井 博和（北大院農・応生科、[1]日食化工）

Hiroki Sato, ○Wataru Saburi, Teruyo Ojima[1], Hidenori Taguchi, Haruhide Mori, Hirokazu Matsui (Hokkaido University, [1]Nihon Shokuhin Kako)

【目的】エピラクトース（4-*O*-β-D-galacotosyl-D-mannose）は、優れたプレバイオティクス効果を有するオリゴ糖であり、新しい機能性食品素材として期待されている。本糖質は、セロビオース 2-エピメラーゼ（β-1,4結合からなるオリゴ糖の還元末端のグルコース残基をマンノース残基に変換、以下CE）をラクトースに作用させることで効率的に合成できる。我々はこれまでに好気性好熱性細菌*Rhodothermus marinus* JCM9785より工業的反応でよく用いられる温度（50～60℃）でも十分使用可能なCE（RmCE）を取得し、酵素化学的諸性質を明らかにした[1)]。本研究では、実用的形態である固定化RmCEを用いたエピラクトースの合成法を確立することを目的とした。

【方法】RmCEには、大腸菌により生産した組換え酵素を用いた。固定化担体にはイオン交換樹脂Duolite A568を使用した。Duolite A568に種々の酵素量のRmCEを添加し、4℃にて24時間保持することでRmCEを吸着させた。初期添加量と上清のタンパク質量の差から樹脂への酵素吸着量を求めた。固定化酵素を十分に洗浄した後、酵素活性を測定した。グルタルアルデヒド（GA）処理により架橋構造が導入され、固定化酵素の安定性が向上することが知られていることから、GA処理試料の耐熱性を未処理試料と比較した。また、pHおよび温度活性曲線および安定性を遊離酵素と比較した.

【結果および考察】Duolite A568へのRmCE添加量は、9.6 mg/g-resinまでは80%程度の吸着率で添加量に依らずほぼ一定であり、固定化酵素の活性は添加量依存的に上昇した。これ以上の添加量では、活性は変化せず、吸着率は低下した。このことから、添加量は9.6 mg/g-resinが最適であると考えられた。吸着量は7.3 mg/g-resinであり、活性は187 U/g-resinであった。遊離酵素の比活性が36.5 U/mgであることから、樹脂に吸着した酵素の比活性は遊離酵素の70%と見積もられた。以後、この条件で固定化酵素を調製した。次に、酵素活性に影響がなかった0.2% GAにて固定化酵素を処理し、架橋を導入した（GA酵素）。温度安定性をGA処理の有無で比較した。60℃にて7日間保持した後の残存活性は、未処理酵素では30%であったが、GA酵素では60%であり、GA処理による熱安定性の向上が認められた。GA酵素において、50℃以下では7日間の処理後に活性が減少しなかったことから、長期間の反応では50℃での反応が好ましいと考えられた。GA酵素は、pH 4.5～9.8で最大活性の90%の活性を示し、遊離酵素より広範なpHで高活性であった。

1) Ojima T, Saburi W, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 2162-2168 (2011).

cellobiose 2-epimerase、 epilactose、 immobilized enzyme

講演番号：4C10a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎10会場

Penicillium chrysogenum 由来 3 種のβ-ガラクトシダーゼの反応特性解析

Characterization of three β-galactosidases from *Penicillium chrysogenum*

○西村　勇一、笠井　尚哉、阪本　龍司（大阪府立大院・生環科）
○Yuichi Nishimura, Naoya Kasai, Tatsuji Sakamoto (Osaka Prefecture University)

【目的】食品産業から発生する非可食部の有効利用は現代社会における課題となっている。中でも甜菜粕はペクチン含量が高く（約 55%）発生量が多いが（年間 230万/トン）、現在は家畜の飼料といった安価な利用法しか確立されていない。

ペクチンは植物細胞壁において最も複雑な糖鎖構造を有するヘテロ多糖類である。主に、ガラクチュロン酸の重合体から成るホモガラクチュロナン領域およびラムノースとガラクチュロン酸の繰り返し構造から成るラムノガラクチュロナン（RG）領域から構成されている。RG 中のラムノース残基には側鎖として L-アラビナンやβ-1,4-ガラクタンを主鎖とする I型アラビノガラクタンが結合しており、それらがフェルラ酸を介して架橋重合することによって非常に強固な構造を形成している。

本研究グループでは甜菜粕の高度利用化を目指し、甜菜ペクチン分解酵素高生産菌である *P. chrysogenum* 31B 株を単離し、本菌由来の様々なペクチン分解酵素の諸性質を解析してきた。今回は 3 種のβ-ガラクトシダーゼ（BGAL 35A、35B、35C）遺伝子のクローニングと組換え酵素の反応特性について報告する。

【方法・結果】*P. chrysogenum* Wisconsin 株のゲノム情報を基にプライマーを作成し、3 種の遺伝子を獲得した。組換え酵素生産は、BGAL35A については pMAL-c2X/*E. coli* Rosetta gamiB (DE3) pLysS 系で、BGAL35Bと35Cについては pPICZαA/*Pichia pastoris* KM71H 系で行った。

至適温度は 3 種とも 40℃であり、至適 pH は pH 3.0 (BGAL35A)、pH 5.0 (BGAL35B)、 pH 6.0 (BGAL35C) であった。温度安定性は 3 種とも40℃であり、pH 安定性は pH 3.0-9.0 (BGAL35A)、pH 5.0-9.0 (BGAL35B)、pH 3.0-8.0 (BGAL35C) であった。

pNP-β-D-Gal (pNPG) やガラクトース (Gal) 含有糖質に対する基質特異性はそれぞれ大きく異なった。BGAL35A は pNPG および Galオリゴ糖側鎖を持つ RG に活性を示したことから、本酵素は RG 分解に関与するものと推測した。BGAL35B は pNPG の他、β-1,3- および β-1,6-Galオリゴ糖に強く作用したことから β-1,3/1,6 Gal結合を基本構造とする II 型アラビノガラクタンの分解を補助する酵素であると判断した。BGAL35C は pNPGやβ-1,3/1,6-Galオリゴ糖に対する活性は微弱であり、β-1,4-ガラクタンやβ-1,4-Galオリゴ糖を特異的に分解し、Galを遊離させた。このことより、本酵素はエキソ-β-1,4-ガラクタナーゼであることが明らかとなった。

次に、*P. chrysogenum* 由来エンド-β-1,4-ガラクタナーゼ (PcGal1) を用いて、β-1,4-ガラクタン分解における各酵素との相乗効果を検討した。いずれの酵素においても Gal 遊離量は増加したが、特に BGAL35C において高い相乗効果が認められた。

β-galactosidase, galactanase, pectin

講演番号：4C10a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎10会場

ヒト関連細菌由来グリコサミノグリカン分解遺伝子クラスターにおけるヘパラン硫酸リアーゼ

Heparan sulfate lyase encoded in gene cluster for glycosaminoglycans degradation in human-related bacteria

○橋本 渉、丸山 如江、中道 優介、村田 幸作（京大院・農）
○Wataru Hashimoto, Yukie Maruyama, Yusuke Nakamichi, Kousaku Murata (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】グリコサミノグリカン（GAG）はウロン酸とアミノ糖から成る二糖の繰り返し配列をもつ多糖であり、哺乳類の細胞外マトリックスの重要な構成成分の一つである。構成糖、グリコシド結合様式、及び硫酸化の相違により、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸などに分類される。病原性細菌による宿主細胞の接着や侵入に関してGAGが標的となることが示されているため、細菌によるGAGの結合や分解に関する分子機構の理解が重要である。これまでに、病原性連鎖球菌（*Streptococcus*）は、ヒアルロン酸リアーゼ（Hyal：ファミリーPL-8）と不飽和グルクロニルヒドロラーゼ（UGL：ファミリーGH-88）の協調作用によりヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸を単糖（不飽和ウロン酸とアミノ糖）にまで分解し、宿主細胞に侵入感染することを示唆してきた。また、その分解と代謝に関わる遺伝子群（UGL遺伝子クラスター）がゲノム上で集約されていることも明らかにした。一方、そのクラスターによるヘパリンとヘパラン硫酸の分解については不明である。本研究では、UGL遺伝子クラスターにコードされるヘパラナーゼ（ヘパラン硫酸リアーゼHepC：ファミリーPL-12）について解析した。

【方法と結果】連鎖球菌を始めとする病原性細菌（*Clostridium*や*Enterococcus*など）のゲノムを調べた結果、UGL遺伝子の近傍に土壌分離細菌*Pedobacter heparinus*由来ヘパラナーゼ（PheHepC）と低い相同性（16% identity）を示すオープンリーディングフレームを見出した。また、UGL遺伝子クラスターは病原性細菌のみならず、*Lactobacillus*や*Bacteroides*などの腸内細菌にも分布していた。連鎖球菌（*S. agalactiae*、*S. pneumoniae*、*S. pyogenes*）と乳酸菌（*Lactobacillus rhamnosus*）のHepCホモログの発現系を大腸菌内で構築したところ、乳酸菌タンパク質のみ発現することが可能であった。乳酸菌HepCホモログは、ヘパラン硫酸存在下で、235 nmの吸光度（C=C二重結合に相当）を示す反応産物（不飽和糖）を生じたことから、加水分解酵素ではなく脱離酵素（リアーゼ）として機能することが確認された。本酵素はヘパラン硫酸を最良の基質とし、ヘパリンにも作用した。一方、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸は全く分解されなかった。ヘパラン硫酸リアーゼの構造と機能との相関を明らかにするため、結晶化とX線回折実験を行った。PheHepCにおいて分解能2.2 ÅまでのX線回折データを与える結晶が得られ、本結晶は斜方晶系$P2_12_12_1$の空間群に属することが分かった。

【考察】UGLは各種GAG由来の不飽和糖を分解する。従って、新たに見出したヘパラン硫酸リアーゼの存在は、UGL遺伝子クラスターが全GAGの分解と代謝に重要であることを示している。

Glycosaminoglycan, Heparan sulfate lyase, *Lactobacillus*

講演番号：4C10a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ C校舎10会場

グリコサミノグリカン分解に関わる細菌由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼの基質認識機構

Substrate recognition mechanism of bacterial unsaturated glucuronyl hydrolases involved in degradation of glycosaminoglycans

○中道 優介、丸山 如江、橋本 渉、村田 幸作（京大院・農）
○Yusuke Nakamichi, Yukie Maruyama, Wataru Hashimoto, Kousaku Murata (Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ.)

【目的】哺乳類の細胞外マトリックスを構成するグリコサミノグリカン（GAG：コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸など）は、ウロン酸とアミノ糖から成り、高度に硫酸化されている。GAG は、構成糖、グリコシド結合の位置や硫酸化部位の相違により分類される。*Streptococcus agalactiae*（Sag）などの連鎖球菌は、GAG の分解に関わる不飽和グルクロニルヒドロラーゼ（UGL）遺伝子をゲノムにもつ。これまでに、UGL がリアーゼ反応産物である不飽和二糖を分解すること、UGL のコンドロイチン硫酸やヒアルロン酸不飽和二糖に対する基質特異性に関わる構造要因を明らかにしてきた。連鎖球菌 UGL は不飽和ヘパリン二糖にも作用し、N 位硫酸化不飽和ヘパリン二糖（HΔNS）に対して特異性を示す。本研究では、連鎖球菌 UGL と不飽和ヘパリン二糖とのドッキングシミュレーション、及び UGL 変異体の速度論解析により基質認識に関わるアミノ酸残基の特定を行った。さらに、細菌における GAG 分解機構の多様性を理解するため、*Bacillus* sp. GL1 株由来の UGL（BacillusUGL）の不飽和ヘパリン二糖に対する基質特異性を決定し、連鎖球菌 UGL との比較を行った。
【方法と結果】BacillusUGLの各種不飽和ヘパリン二糖に対する酵素活性を測定したところ、連鎖球菌UGLと異なり、硫酸化されていない不飽和ヘパリン二糖（HΔ0S）を最良の基質とした。各酵素による基質特異性の相違を示す構造要因を明らかにするため、プログラム*AutoDock*によるドッキングシミュレーションに着手した。ポジティブコントロールとして、過去にX線結晶構造解析により決定したSagUGLと不飽和コンドロイチン二糖（CΔ6S）との複合体構造の座標ファイル（PDB ID: 3ANK）を用いたシミュレーションを行った。この対照実験で得られた結果が妥当であったため、*AutoDock*を用いたドッキングシミュレーションの有用性が確認できた。SagUGLとBacillusUGLについて、HΔNSとHΔ0Sのドッキングシミュレーションを行った。その結果、SagUGLのSer-365とSer-368はHΔNSと水素結合を形成することが予測された。また、SagUGLの場合と比べて、BacillusUGLの活性ポケットにはHΔNSが活性部位に正しく配置しにくいことが分かった。SagUGLのSer-365とSer-368が基質認識に及ぼす影響を調べるため、SagUGLの部位特異的変異体S365GとS365A, 及びS368GとS368Aを作製した。各変異体の速度論パラメーターを決定し、野性型SagUGLと比較したところ、HΔNSに対するK_m値はそれぞれ上昇していた。従って、SagUGLのSer-365とSer-368はHΔNSとの結合に寄与していることが示された。
【考察】SagUGLがBacillusUGLには見られない硫酸基認識機構をもつことから、連鎖球菌は脱硫酸化酵素に依存しないGAG分解を行うことが示唆された。

Hydrolase, Glycosaminoglycan, Docking simulation

講演番号：4C10a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ C校舎10会場

酸性多糖の代謝に関わる細菌由来α-ケト酸還元酵素のX線結晶構造解析

X-ray crystallography of bacterial α-keto acid reductases responsible for polyuronate metabolism

○高瀬 隆一、三上 文三、橋本 渉、村田 幸作（京大院・農）
○Ryuichi Takase, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, Kousaku Murata (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】多糖は自然界に存在する重要な高分子であり、酸性多糖であるアルギン酸は褐藻の細胞壁を構成し、ペクチンは植物細胞壁の主要な成分の一つである。細菌による酸性多糖の代謝では、アルギン酸からは4-デオキシ-L-エリスロ-5-ヘキソースウロースウロン酸（DEH）が、ペクチンからは3-デオキシ-D-グリセロ-2,5-ヘキソジウロソン酸（DDH）が生じる。これらのα-ケト酸は補酵素を用いた還元反応によって同一反応産物である2-ケト-3-デオキシ-D-グルコン酸（KDG）となり、ピルビン酸を経てTCAサイクルで代謝される。これまでに、DEH還元反応を触媒する*Sphingomonas*属細菌A1株由来A1-Rに関して、NADPHに対する補酵素依存性などの酵素学的特性とその立体構造を明らかにしてきた。一方、*Pectobacterium*属細菌由来DDH還元酵素KduDはNADHとNADPHの両方を用いる。両酵素は分子量や一次構造の類似性から、同様の活性中心構造や反応様式を示すと考えられる。本研究では、両酵素の構造機能相関を解析することにより、異なる補酵素要求性を示す構造要因を明らかにすることを目的とする。今回は、KduDの結晶構造と酵素学的特性を報告する。

【方法と結果】KduD遺伝子を植物軟腐性細菌*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*よりクローニングした。大腸菌を用いたKduD大量発現系を構築し、酵素学的特性を決定した。KduDの至適温度は45℃、至適pHは7.0付近であり、45℃で5分間保温することで活性の半分を失った。A1-Rの各値は50℃、7.0、50℃であることから、KduDとA1-Rは酵素学的特性も類似していることが示された。組換え酵素の結晶を作製し、X線結晶構造解析により、KduDおよびKduD/NAD^+複合体の立体構造を明らかにした。KduDとA1-Rの構造を、C_αを基準にして比較した結果、C_α間の平均二乗偏差は1.26Åであったことから、両酵素の全体構造は非常に類似していることが分かった。両酵素において補酵素は、ヌクレオチド結合モチーフであるRossmann foldのクレフト部位に結合している。A1-Rとのアラインメント及び構造比較により、KduDのSer-145、Tyr-158、Lys-162が触媒反応に関わる重要な残基であると予想し、各々をAla、Phe、Alaに置換した部位特異的変異体の活性を測定した。各変異体のk_{cat}値は顕著に低下したことから、これら三残基が触媒反応に直接関与しており、A1-Rと同様、Catalytic Triadを形成していることが示唆された。また、ドッキングシュミレーションプログラム*AutoDock*を用いてKduDとDDHの結合様式を予測した結果、DDHの5’位のケト基とTyr-158が水素結合を形成したことから、触媒残基の役割が支持された。

【考察】KduDとA1-Rは酵素学的特性や全体構造が非常に類似しているにも関わらず、補酵素要求性が異なることから、その相違は活性部位における局所的な構造差異によることが示唆された。

α-keto acid, reductase, acidic polysaccharide

講演番号：4C10a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ C校舎10会場

好酸好熱性古細菌*Sulfolobus tokodaii*由来のグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の機能解析

Characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in the semi-phosphorylating Entner-Doudoroff pathway from *Sulfolobus tokodaii*

○伊藤史晃、知識秀祐、中村周吾、清水謙多郎、伏信進矢、若木高善（東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻）

○Fumiaki Ito, Hidehiro Chishiki, Shugo Nakamura, Kentaro Shimizu, Shinya Fushinobu, and Takayoshi Wakagi（The University of Tokyo, Department of Biotechnology）

【目的】好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* は解糖系中間体 glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) を基質とする酵素として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (St-GAPDH)、Non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (St-GAPN-1)、St-GAPN-2 の 3 つを持っている。本研究ではこれら 3 つの酵素を組み換え酵素として精製し、機能解析を行った。興味深い事に古細菌由来の GAPN はグリコーゲン代謝の中間産物である glucose-1-phosphate (G1P)によって大幅に活性化されるアロステリック酵素であることが報告されていたため、St-GAPN-1 についてアロステリック効果を調べたところ、G1P による活性化が見られた。我々は St-GAPN-1 の速度論的性質を調べたところ、同属古細菌である *Sulfolobus solfataricus* 由来の GAPN (Sso-GAPN)と比較して、活性化のされ方が顕著に異なっていることが分かった。Sso-GAPN の場合、酵素基質反応液中に G1P が存在する場合には、それが存在しない場合と比較して、K_m の値をほとんど変えずに V_{max} の値のみ 5~6 倍高くする、V-type と呼ぶべきアロステリズムを示す。一方、St-GAPN-1 の場合は G1P 非存在下では基質濃度が 5~10 mM の辺りで基質に対して共同性を示し全体として S 字状の飽和曲線を描くが、G1P 存在下では V_{max} の値を大きくするのと同時に、基質に対する協同性がなくなり K_m の値を非常に小さくする、K-type と呼ぶべきアロステリズムを示すことが分かった。以降我々は St-GAPN と Sso-GAPN とが異なったアロステリズムを示すことの原因を解明することを目的として研究を進めた。

【方法と結果】我々はまず Sso-GAPN の組み換え酵素が V-type のアロステリズムを示すことを確認した。次に St-GAPN-1 と Sso-GAPN のアミノ酸配列を比較し推定三次構造を考慮しつつ、K-type と V-type の違いを生み出していると思われる残基に変異を導入し、アロステリズムの特性がどのように変化するか調べた。その結果、作成した 15 種の変異体のうち、飽和曲線の特徴に変化のあるものは得られたものの、K-type と V-type の変換が行われたものはなかった。次に変異導入範囲を広げるために、GAPN のモジュール境界を算出することによってアミノ酸配列を区分けした。そして一方の GAPN からもう一方の GAPN へサブユニット会合に関わる領域を含むモジュールを移植したキメラ体を作成したところ、K-type と V-type の変換が行われた。

同属の古細菌のオルソログ酵素間でこのようにアロステリックな活性制御の様式が異なることは大変興味深い現象であり、数十残基のモジュール配列に相違の原因を絞り込む事ができた。我々はさらにこのモジュールの中で K-type と V-type の変換に重要な役割を果たしている残基群の特定を進めている。

Semi-phosphorylating Entner-Doudoroff pathway, Glyceraldehyde-3-phosphate (GAP), Glucose-1-phosphate (G1P)

講演番号:4C10a10
講演日時、会場:3月25日10:49～ C校舎10会場

超好熱始原菌（古細菌）由来 glycerol kinase の構造と機能

Structural analysis of the glycerol kinase from a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1

○古賀雄一[1], 外尾竜太[1], 勝見亮太[1], 高野和文[2], 金谷茂則[1]（[1]阪大院・工, [2]京府大院・生命環境研）

○Yuichi Koga[1], Ryuta Hokao[1], Ryouta Katsumi[1], Kazufumi Takano[2], Shigenori Kanaya[1]（[1]Osaka Univ., [2]Kyoto Pref. Univ.）

【目的】Glycerol kinase (GK) はグリセロール代謝における中心的な酵素であり、細胞内ではその活性が高度に制御を受けている。原核生物である大腸菌由来GK (Ec-GK) における構造と機能の研究から、GKは溶液中で二量体構造と四量体構造の平衡状態で存在しており、この四量体構造に対して解糖系の中間代謝物であるfructose-1,6-bis phosphate (FBP) が特異的に結合し活性を阻害していることがわかっている。一方、超好熱始原菌（古細菌）*Thermococcus kodakaraensis* KOD1由来GK (Tk-GK) はFBPによる阻害も四量体の形成も確認されていない。近年、我々はTk-GKが、基質結合に伴い特異な六量体構造を形成することを見出し、その会合状態の変化が果たす生理学的な役割を明らかにする目的で、構造学的、生化学的な解析を行った。

【方法及び結果】構造情報を元に、六量体界面を破壊した変異体 K271E を構築したところ、野生型に比べ大きな構造変化を伴っておらず、また、グリセロール存在下においても二量体で存在することが確認された。野生型、K271E それぞれについて酵素単独の結晶、基質（Glycerol および ATP アナログ）との複合体結晶を作成し、構造解析を行ったところ、本酵素は基質の結合に伴い、分子内で大きなコンフォメーション変化（ドメインモーション）を起こすこと、6 量体を形成することにより基質結合した際の分子の形（クローズドコンフォメーション）が安定化されていることが示唆された。クローズドコンフォメーションを取ることによって、本酵素は ATP に対する親和性が 10 倍向上することが明らかとなり、6 量体形成は基質の効率的な取り込みを促す機能調整機構と考えられる。

glycerol kinase, archaea, structure

講演番号：4C10a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ C校舎10会場

新規な4-ケトアルドペントース及び4-ケトペント酸の生成と新規な膜酵素
Formation of novel ketoaldopentose and ketopentonate by acetic acid bacteria

○足立収生、Roque A. Hours[1]、品川恵美子[2]、赤壁善彦、薬師寿治、松下一信（山口大・農、[1]CINDEFI・UNLP、[2]宇部高専・物質工学）
○Osao Adachi, Roque A. Hours[1], Emiko Shinagawa[2], Yoshihiko Akakabe, Toshiharu Yakushi, Kazunobu Matsushita (Fac. Agr., Yamaguchi Univ., [1]CINDEFI・UNLP, [2]Ube Natl. Coll. Tech.)

【目的】酢酸菌のグルコース酸化系における2,5-ジケトグルコン酸(25DKA)以降の代謝や、アルドペントースの酸化に関する報告はない。これら未知な代謝系の解明を目的に行った調査は、新規な4-ケトアルドペントースや4-ケトペント酸の発見に繋がった。そこで、四位にケトンをもつ新規な糖質類の生成とそれを触媒する新規な膜酵素について、上記の目的に沿って得られた結果を発表する。【方法・結果】酢酸菌の探索をアルゼンチンで展開した結果、25DKAがさらに代謝されて未知な糖質を急速かつ高濃度に蓄積する*Ga. liquefaciens* RCTMR 10を、現地の伝統的発酵・健康飲料ウオーターケフィアから単離した。詳細に検討した結果、25DKAは4-ケト-D-アラビノース(4KAR)を経て4-ケトアラボン酸(4KAB)へ代謝されていた[1,2)]。25DKAから4KABへの代謝には、新規な膜酵素25DKA脱炭酸酵素と4-ケトアルドペントース1-脱水素酵素が関与していた。*G. suboxydans* IFO 12528など代表的な酢酸菌でアルドペントースの酸化を調べた結果、4-ケトアルドペントースを経て4-ケトペント酸が培養液中や、細胞膜との反応液中に高濃度に生成・蓄積された[3)]。グルコース酸化系に加え、D-アラビノースとD-リボースはアルドペントース4-脱水素酵素によって4KARと4-ケト-D-リボースへ、それらはさらに4-ケトアルドペントース1-脱水素酵素によって4KABと4-ケトリボン酸(4KRN)へ酸化された[4)]。これらの酵素反応とは別に、D-アラボン酸とD-リボン酸はペント酸4-脱水素酵素によって、4KABと4KRNへ酸化されることを反応生成物の化学構造解析結果から確認した。上記の新規糖質類の生成と関係して、本研究から四種類の新規な膜酵素が酢酸菌に確認された。アルドペントース4-脱水素酵素、4-ケトアルドペントース1-脱水素酵素、及びペント酸4-脱水素酵素は多くの点で相互に異なっていた。既知のケトペントースは例外なく二位にケトンをもつのに対し、四位にケトンをもつ五炭糖類は、糖質科学の新しい展開を予感させる全く新規な物質である。1) O.Adachi *et al*, *BBB*, **74**, 2555-58 (2010); 2) 2011農化大会 p. 85; 3) O.Adachi *et al*, *BBB*, **75**, 1801-06 (2011); 4) O.Adachi *et al*, *BBB*, **75,** 2418-20 (2011).

Keywords: 4-keto-D-aldopentose, 4-ketopentonate, oxidative fermentation

講演番号：4C10a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ C校舎10会場

古細菌FBPアルドラーゼ／ホスファターゼの二機能性

Bifunctionality of archaeal FBP aldolase/phosphatase

伏信進矢、[1]西増弘志、服部大紀、宋賢珍、○若木高善（東京大学・院農生科、[1]東京大学・院理）
Shinya Fushinobu, Hiroshi Nishimasu[1], Daiki attori, Hyun-Jin Song, ○Takayoshi Wakagi
(Univ. Tokyo, Dept. Biotechnology, [1]Univ. Tokyo, Dept. Biophys. Biochem.)

【目的】　生命の進化の初期の独立栄養生物において糖新生系は重要な代謝経路であるが、超好熱菌/古細菌の糖新生系で働いているはずのフルクトースビスリン酸（FBP）アルドラーゼ（FBPA）は、ゲノム解析から候補遺伝子が見当たらないにもかかわらず、細胞抽出液に酵素活性は認められる。その実体を追究したところ、超好熱菌/古細菌に特有のFBPホスファターゼ(FBPase)として報告されていた2種類のFBPaseのうちの、クラス5型FBPase(FBPase-V)と同一のタンパク質であることが発見され、超好熱菌/古細菌においてはFBPアルドラーゼ/ホスファターゼと呼ぶべき二機能性酵素（FBPA/P）が、糖新生系で働いていることが分かった。基質であるジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)とこの酵素のLys232'がシッフ塩基を形成することも報告された。我々は好酸好熱性古細菌*Sulfolobus tokodaii*のFBPase-Vオルソログである ST0318の立体構造(PDB:1UMG)を報告していたが、この立体構造ではLys232とFBP結合部位とが17Åも離れており、DHAPとFBPとでは結合する部位が異なるのか、同じならばLys232に大きな可動性があるのか、と言う問題が生じた。そこで、FBPA/Pの二機能性の構造的なメカニズムの解明を目指した。
【方法】　ST0318を用いて、DHAP共存下に酵素を結晶化し構造解析を行ない、従来報告した構造（PDB: 1 UMG、ホスファターゼ型構造）と比較し、必要な変異体を作成してその機能を調べた。
【結果】　ST0318にはFBPaseだけでなくFBPAの活性があることがわかった。DHAP共存下に結晶を作成し、1.8Åの分解能で得られた構造をアルドラーゼ型構造（A構造）と呼び、ホスファターゼ型構造（P構造）と比較した。その結果、(1) 全体構造はほぼ同一のホモ八量体である、(2) FBPとDHAPとの結合部位は同一である、(3) A構造ではLys232を含むループがP構造の時の位置から大きく移動してDHAPとシッフ塩基を形成する、(4) P構造ではFBP近傍に位置していた二つのループが、A構造では遠方に移動する、(5) A構造では３個のMg^{2+}がDHAPのリン酸近傍にあるが、P構造では第４のMg^{2+}がFBPの１位リン酸に近傍に存在する、などの特徴が認められた。
　また、A構造と、ウサギ筋肉FBPアルドラーゼ(rmFBPA)の構造とを比べると、全体構造は全く異なるが活性中心の多くの残基の種類と位置が共通である中で、rmFBPAの一般酸塩基触媒残基であるGlu187に相当するA構造の残基はTyr229であることが注目された。そこでTyr229をPheに置換すると、ホスファターゼ活性は不変であったが、アルドラーゼ活性は消失した。これらを踏まえてST0318 FBPA/PのLys232、Tyr229を含む反応機構を提唱した。
　以上をまとめると、FBPA/Pは、三つのループが協同的に開閉することにより、二つの異なった化学反応を、同一の活性部位で触媒するという、真の二機能性酵素であり、その構造的な根拠が初めてここでST0318を用いて明らかにされた。

二機能性酵素、古細菌、フルクトースビスリン酸

講演番号:4C10a13
講演日時、会場:3月25日11:32～ C校舎10会場

糖環開環機構の解明を目指した*Pseudomonas stutzeri* 由来 L-ラムノースイソメラーゼ変異酵素の構造解析

The study of ring-opening mechanism in L-rhamnose isomerase mutant from *Pseudomonas stutzeri* based on X-ray structure

○吉田 裕美、寺岡　美沙、何森　健[1]、神鳥　成弘（香川大・総合生命研究セ、[1]香川大・希少糖研究セ）

○Hiromi Yoshida, Misa Teraoka, Ken Izumori[1], Shigehiro Kamitori (LSRC Kagawadai, [1]RSRC Kagawadai)

【目的】L-ラムノースイソメラーゼは、L-ラムノースとL-ラムニュロース間の異性化反応を触媒するホモ4量体酵素である。*Pseudomonas stutzeri* 由来L-ラムノースイソメラーゼ（L-RhI）は上記の糖を基質とするだけではなく、天然に微量にしか存在しない希少糖、D-プシコースとD-アロース間の異性化反応を触媒することもでき、希少糖生産酵素として利用されている。演者らは、これまでにL-RhIおよび変異酵素の立体構造決定、基質との複合体構造解析について報告してきた。高い酵素活性を示す野生型L-RhI の4つの活性部位に結合したL-ラムノースは全て開環した構造をとり、完全に酵素活性を失った変異酵素D327Nにおいては5員環構造をとるL-ラムノフラノースのみが活性部位に結合していた。これより、L-RhIのフラノース環の開環にはAsp327が関与していると考察している。しかし、溶液中では、6員環構造をとるL-ラムノピラノースが主に存在していると予想されていながらも、L-ラムノピラノースがL-RhIの活性部位に結合した構造はなく、6員環構造を認識する糖環開環機構についての情報は得られていなかった。本研究では、活性部位近傍に変異を導入した新たな変異酵素を用いて構造解析を行うことにより、L-RhIにおける基質の開環機構の解明を目指した複合体構造を得ることを目的とした。

【方法】L-RhIの活性部位近傍のアミノ酸残基に変異を導入した変異酵素H101Nを構築した。野生型L-RhIと同様、大腸菌JM109を宿主としてC末端側にHisタグを付けた組換え体H101Nを発現させ、アフィニティカラムを用いて精製酵素を調製した。得られた精製酵素に対し、システインカルバゾール法によりL-ラムノースに対する酵素活性を測定し、野生型L-RhIとの比活性を検討した。X線結晶解析には、8.37 mg/mlまで濃縮した精製酵素を用いてハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶を作成し、33 % L-ラムノース溶液に数秒浸した結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構PF-AR NE3Aにてデータ収集を行った。

【結果】変異酵素H101Nは酵素活性を維持していたが、野生型L-RhIと比較して30%程度の比活性を示した。複合体構造の解析においては、4つの活性部位にL-ラムノースが結合している電子密度が得られた。野生型L-RhIにおけるL-ラムノースとの複合体構造は活性部位において全て開環したL-ラムノースが結合していたが、酵素活性の低下が見られたH101Nでは、2つの活性部位には開環したL-ラムノース、残りの2つの活性部位には6員環構造をとるL-ラムノピラノースが結合していた。しかしながら、後者の2つの活性部位においては、開環したL-ラムノースも混在している可能性がある。

X-ray structure, L-rhamnose isomerase, ring-opening mechanism

講演番号:4C10a14
講演日時、会場:3月25日11:43～ C校舎10会場

Metal ion activation of inorganic pyrophosphatase from Antarctic psychrotroph *Shewanella* sp. AS-11

南極産好冷細菌 *Shewanella* sp. AS-11 由来無機ピロホスファターゼの金属イオンによる活性化

○Ginting Elvy Like[1,2], Chihiro Maeganeku[1], Hiroyuki Motoshima[1], Keiichi Watanabe[1,2]
([1]Saga Univ., [2]Kagoshima Univ.)
○ギンティン エルヴィ リカ[1,2]、前兼久 千尋[1]、本島 浩之、渡邉 啓一
([1]佐賀大農・生命機科、[2]鹿児島大院・連合農)

Inorganic pyrophosphatase (PPase) is an enzyme responsible for the hydrolysis of pyrophosphate which is formed principally as the product of many biosynthetic reactions that utilize ATP. *Shewanella* sp. AS-11 is a psychrotrophic bacterium isolated from shellfish living in the Antarctic ice-covered sea where temperature is close to and often below 0° C. The enzymes from psychrophilic or psychrotrophic bacteria generally have higher activity at low temperatures with lower thermostability compared with their homologous from mesophilic bacteria. Our previous cloning and expression of PPase from *Shewanella* sp. AS-11 (Sh-PPase) revealed that Sh-PPase is a family II enzyme with a subunit molecular mass of 34 kDa and requires divalent metal ions for the activation of enzyme as well as for the activation of substrate. The aim of this research is to investigate the activation of Sh-PPase by different metal ions to gain insight into the molecular mechanism of cold-adaptation of Sh-PPase. The recombinant Sh-PPase has been successfully expressed in an *E. coli* system. The recombinant enzyme was purified by 40-70% ammonium sulfate fractionation and ion exchange chromatography. Metal-free Sh-PPase was prepared by EDTA treatment. The activity of Sh-PPase was measured by using Molybdenum blue method. Sh-PPase was temperature- and time-dependently activated by incubation with Co, Zn, and Mn ions. The optimal concentrations of Co, Mn and Zn for the activation at 5° C for 2 h were 25, 15, and 0.5 mM, respectively. The specific activity of Co, Mn and Zn-activated enzymes were 100-, 45-, and 12-fold, higher than non-activated one, respectively, at 5° C. The order of thermostability of the enzymes was Zn-activated, Non-activated, Mn-activated and Co-activated enzymes. The optimal temperature for activity of Mn-activated enzyme was surprisingly low (5° C), whereas the optimal temperatures for non-activated, Co- and Zn-activated enzymes were 40, 30, and 20° C, respectively. The activations of enzyme with all of the tested metal ions enhanced k_{cat}, but did not significantly affect K_m. The results indicated that metal ions have great effects on temperature dependency and thermostability of Sh-PPase, and Mn, Co, or Zn ion is required to gain cold-adapted characteristics. These metal ions did not affect the affinity for substrate but remarkably enhanced the catalytic rate.

inorganic pyrophosphatase, cold adaptation, metal ion activation

講演番号：4C10a15
講演日時、会場：3月25日11:54～ C校舎10会場

Luteolibacter algae H18 株によるオキナワモズク由来フコイダンの脱アセチル化を伴う酵素的分解

Enzymatic Degradation of Fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* by *Luteolibactar algae* H18 with Deacetylation

○大城　隆、原田尚美、小林泰明、三木康成[1]、川本仁志[1]（鳥取大工・生応、[1]海産物のきむらや）
○Takashi Ohshiro, Naomi Harada, Yasuaki Kobayashi, Yasunari Miki[1], Hitoshi Kawamoto[1] (Tottori Univ., [1]Marine Products Kimuraya)

【目的】フコイダンは褐藻に含まれるヘテロ硫酸化多糖の総称で、分子量は数万から数十万になる。フコイダンには、抗血液凝固、抗腫瘍、抗ウィルス作用など多数の生理活性が認められているが、その化学構造は含まれる海藻の種類によってそれぞれ異なっており、発揮される生理活性も異なっている。フコース、硫酸化フコースが主要構成糖であるが、その他の糖やウロン酸を含む場合もあり、複雑な構造を有するため、活性と構造の相関性については未だ明らかになっていない点が多い。

当研究室では、酵素的なフコイダン分子の改変、あるいはフコイダン分子の構造解明を目的として、オキナワモズク由来フコイダンを分解資化できる微生物のスクリーニングを行った結果、海洋サンプル由来の菌株をいくつか単離している。今回、フコイダン資化性 *Luteolibacter algae* H18 株が生産するフコイダン分解酵素について検討を行った。

【方法と結果】本菌株を、分子量 20 万のオキナワモズク由来フコイダンを単一炭素源として 0.25% 含む合成培地を用いて30℃で 2 日間培養し、得られた菌体を超音波破砕した遠心上清を無細胞抽出液とした。フコイダンの分子量は GPC カラムを用い、プルランをマーカーとした HPLC で評価した。

フコイダンの低分子化に関与する酵素は菌体内に存在したが、無細胞抽出液を DEAE-Sepharose カラムで分画したところ、単一画分での活性が激減した。そこで、複数の画分を混合して酵素反応を行ったところ、ある 2 つの画分を混合した場合に明らかなフコイダン低分子化活性が認められた。次に基質である高分子量フコイダンに対して 2 つの画分が作用する順序を検討した結果、最初の酵素が分子量を変化させることなく中間体への反応を触媒した後、次の酵素が低分子化を触媒することが明らかになった。最初の酵素が触媒する酵素反応の生成物をイオンクロマトグラフィーで分析したところ、酢酸の遊離が検出された。さらに、acetyl-CoA synthetase を用いる酵素的測定法でも酢酸の遊離が確認されたことから、本菌株によるフコイダン分解において、脱アセチル化反応が低分子化反応に先立って起こっていることが示唆された。なお、フコイダンの脱アセチル化を触媒する酵素については、活性の検出は報告されているものの、詳細な検討は行われていない。現在、本菌株由来のフコイダン分解に関与する酵素についての精製を実施している。

本研究は、文科省・地域イノベーションクラスタープログラムの一環として行った。

fucoidan, deacetylase, *Cladosiphon okamuranus* (Okinawamozuku)

講演番号：4J11a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ J校舎11会場

タイトル　イメージングマススペクトロメトリーによる農作物の機能性食品成分の局在解析

Title　Visualization of functional food factors in agricultural crops by using imaging mass spectrometry

○財満 信宏、吉村 征浩、森山 達哉、河村 幸雄（近畿大・農）

○Nobuhiro Zaima, Yukihiro Yoshimura, Tatsuya Moriyama, Yukio Kawamura (Kinki Univ)

【目的】農作物中にどのような機能性食品成分がどこに含まれているのかを明らかにすることは、機能性食品の創出や改良品種の作出において重要である。抗体やプローブを用いる従来の染色手法では、機能性食品成分の特異的な染色は極めて困難であり、これまでに農林水産物中の機能性食品成分を可視化する手法は確立されていない。本研究では、イメージングマススペクトロメトリー（IMS）を応用することによって、機能性食品成分の分布・局在の汎用的な解析手法を確立することを目的とした。

【方法】モデル作物にはコメ、大豆を用いた。コメと大豆はクライオスタット（Leica Microsystems）もしくはミクロトーム（大和光機工業株式会社）を用いて10μmの切片とした。その後、切片にマトリックスとしてDHB（2,5-Dihydroxybenzonic acid）溶液を塗布し、質量分析（MALDI LTQ-XL (ThermoFisher Scientific)）に供した。機能性食品成分の可視化には、Image Quest(ThermoFisher Scientific)を用いた。

【結果】、IMSに供するには、いかに良好な切片を作成できるかがポイントである。コメ、大豆は粘着テープの使用によりIMS解析が可能な切片を作成できることが分かった。コメにおいては、αトコフェロール、γオリザノール、フィチン酸、ホスファチジルコリン（PC)、リゾホスファチジルコリン（LPC）などの分布や局在を可視化した。γオリザノール、フィチン酸、PCは胚芽及び種皮に分布しており、αトコフェロール、GABAは胚芽に特徴的に存在していた。LPCは胚乳に存在していたが、LPCに結合する脂肪酸の種類によって、胚乳内の局在が異なることがわかった。大豆においては、イソフラボンであるダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインを可視化した。ダイゼインは胚軸、種皮及び維管束周辺、ゲニステインは子葉、グリシテインは胚軸及び種皮にそれぞれ局在していることが分かった。これらのイソフラボン分子種の局在の差異は、大豆種子におけるイソフラボン分子種の生理機能に差違のあることまた部位特異性のあることを反映していると推定される。

本手法は、農林水産物だけでなく、病理標本にも適用できる事を確認していることから、IMSは農林水産物のみならず食品一般や生物試料に対して幅広い応用展開が可能であると期待される。

functional food factor, metabolite, rice

講演番号：4J11a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ J校舎11会場

タイトル IMS解析が明らかにするアントシアニンの分子種による組織内局在の違い

Title Visualization of different distribution patterns of anthocyanin molecular species in agricultural foods by using imaging mass spectrometry

○吉村 征浩、財満 信宏、森山 達哉、河村 幸雄（近畿大・農）
○Yukihiro Yoshimura, Nobuhiro Zaima, Tatsuya Moriyama, Yukio Kawamura (Kinki Univ)

【目的】アントシアニン(ANT)は植物に見られる色素成分であり、心疾患、網膜変性症、糖尿病など幅広い病態を改善する薬理作用を持つ機能性食品成分として注目されている。ANTには構成糖やアグリコンの違いにより多くの分子種が存在し、分子種により生理作用が異なることが示唆されている。農作物中の各ANT分子種の局在を可視化することは、植物におけるANTの生理機能を推測することだけでなく、分子種特徴的な薬理作用をもつ機能性品種を創出するうえで重要な情報を提供すると考えられる。しかし、現在まで特異的抗体を用いた免疫染色など、ANT分子種の局在を可視化できる手法は確立されていない。本研究では、イメージングマススペクトロメトリー(IMS)を応用し、ANT分子種の局在を可視化し、その生物学的意義を解明することを目的とした。
【方法】ANTを豊富に含む紫黒米とブルーベリーをサンプルとし、紫黒米は粘着テープを用いて、ブルーベリーは液体窒素で急速凍結後、各々クライオスタット（Leica Microsystems）を用いて凍結切片を作成した。その後、切片にマトリックスとしてDHB（2,5-Dihydroxybenzonic acid）溶液を塗布し、質量分析（MALDI LTQ-XL（ThermoFisher Scientific））に供した。ANTの可視化には、Image Quest(ThermoFisher Scientific)を用いた。
【結果】紫黒米においてANT色素は果皮に存在していたが、分子種によって果皮領域における分布が異なっていた。cyanidin-pentoside、petunidin-pentosideは果皮に一様に分布していたが、cyanidin-hexoside、peonidin-hexosideは背側後方の果皮に多く局在しており、それらの差異はアグリコンではなく構成糖の違いに起因することが示唆された。ブルーベリーのANT色素は外果皮だけでなく内果皮にも存在しており、cyanidin、peonidin、malvidinをアグリコンとしてもつ配糖体は構成糖がpentose、hexoseのどちらであっても外果皮、内果皮に局在していた。一方、delphinidin、petunidinをアグリコンとしてもつ配糖体は構成糖がpentose、hexoseのどちらでも内果皮には少なく、外果皮に多く局在していた。以上の結果から、ブルーベリーにおいてANT分子種は構成糖の違いではなく、アグリコンの違いにより外果皮と内果皮への分布が異なることが示唆された。以上のように、IMS解析によりこれまで未知であった分子種レベルでのANTの組織内局在を初めて可視化することができ、サンプルにより起因する要素は異なるが、各ANT分子種の組織内局在が顕著に異なることが明らかとなった。

functional food factor, imaging, anthocyanin

講演番号：4J11a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ J校舎11会場

プエラリンの体内動態解析

Nutrikinetic analysis of puerarin with IMS

○山本 彩実、財満 信宏、吉村 征浩、田中 照佳、森山 達哉、河村 幸雄（近畿大・農）
○Ayami Yamamoto, Nobuhiro Zaima, Yukihiro Yoshimura, Teruyoshi Tanaka, Tatsuya Moriyama, Yukio Kawamura (Kinki Univ)

【目的】機能性食品成分の機能を評価するうえで、摂取した機能性食品成分がどのような代謝を受け、どの臓器に分布するのかという体内動態情報を明らかにすることは非常に重要である。しかしながら、低分子で複雑な構造を持つ機能性食品成分は、特異的抗体やプローブの作出が困難であり、現段階で、体内における動態を可視化して解析する汎用的な手法は確立されていない。そこで本研究では、機能性食品成分の動態解析を可能にする技術を確立することを目的として、クズに特徴的なイソフラボンであるプエラリンを機能性食品成分モデルとして用い、イメージングマススペクトリメトリー（IMS）を応用し、プエラリン投与マウス臓器及びクズにおけるプエラリンの分布を可視化し、その動態を解析した。
【方法】ddyマウス（13週齢、オス）は、コントロール群と投与群の二群に分けた。投与群は、プエラリンを投与し（40μmol/匹）、30分後に臓器を摘出した。摘出した臓器は、液体窒素で凍結し、クライオスタット（Leica Microsystems）で10μmの切片を作成した。その後、切片にマトリックスとしてGraphite、またはDHB（2,5-Dihydroxybenzonic acid）溶液を塗布し、質量分析装置（MALDI LTQ-XL（ThermoFisher Scientific））に供した。プエラリンの動態の可視化には、Image Quest(ThermoFisher Scientific)を用いた。
【結果】クズにおいてプエラリンは、根の表皮に多く存在していることが分かった。マウスにおいては、プエラリン投与後に解析した臓器（肝臓、腎臓、心臓、脳、脾臓、肺）のうち、肝臓、腎臓、心臓においてプエラリン由来のピークが検出された。コントロール群と比較し、投与群では、m/z 417.3のピークが特徴的に検出された。このピークは、配糖体の形のインタクトなプエラリンに由来するものであり、プエラリンは消化酵素による分解をうけずに臓器に移行することが示唆された。IMS解析の結果、移行した臓器においてプエラリンは、腎臓の腎盤、心臓の大動脈起始部血管壁に分布していることがわかった。以上の結果から、IMSを用いることにより、機能性食品成分の体内動態解析が可能になることが示された。

functional food factor, metabolism, puerarin

講演番号:4J11a04
講演日時、会場:3月25日09:33～ J校舎11会場

経口摂取プエラリンのマウス骨吸収抑制作用と大腿骨への移行

Bone absorption improving action of dietary puerarin in ovariectomized mice and its translocation to the femur

○田中　照佳、吉村　征浩、道原　成和、山本　彩実、財満　信宏、森山　達哉、河村　幸雄(近大院農・応生化)

○ Teruyoshi Tanaka, Yukihiro Yoshimura, Seiwa Michihara, Ayami Yamamoto, Nobuhiro Zaima, Tatsuya Moriyama, Yukio Kawamura(Kinki University)

【目的】クズ(*Pueraria lobata*)はマメ科植物でイソフラボンを豊富に含有するが、特にプエラリン(ダイゼイン-8-*C*-グルコシド)に富んでいる。我々は、クズ蔓エタノール抽出物の経口摂取は骨粗鬆症モデルマウスである卵巣摘出(OVX)マウスにおける破骨細胞の分化を抑制することを報告した。しかし、その作用物質および吸収動態は明らかでなかった。そこで本研究では、プエラリンの経口摂取がOVXマウスの骨吸収に与える影響と経口摂取プエラリンのマウス大腿骨への移行形態を明らかにすることを目的とした。
【方法】10週齢のOVXマウスにプエラリンを20 mg/kg body weightの用量で5ヶ月間摂取させた。骨吸収マーカーとして血清TRAP活性と尿中DPDレベルを測定した。大腿骨の骨力学的パラメータ(最小断面2次モーメント、断面2次モーメント)はX線CTにより測定した。またプエラリン40 μmolをマウスに単回経口投与した際の血中および尿中への移行形態はHPLCおよびLC-MSで同定し、大腿骨遠位部の組織切片上でのプエラリンまたはプエラリンの代謝物の局在はMALDI-イメージングマススペクトロメトリーにて解析、可視化した。
【結果】プエラリンを経口摂取したOVXマウスの血清TRAP活性および尿中DPDレベルは有意に減少した。また、プエラリン摂取5ヶ月後の骨力学パラメータである最小断面2次モーメントと断面2次モーメントおよび大腿骨遠位部の研磨標本はいずれもプエラリン摂取群で改善効果が認められた。したがって、プエラリンの経口摂取はOVXマウスの骨吸収を抑制することが示された。経口摂取プエラリンのマウスにおける体内動態を検討した結果,経口投与プエラリンのマウス血中への主要吸収形態はプエラリンであること、またグルクロン酸抱合体でも存在することがわかった。プエラリンの血中量は投与0.5 hまでに最大濃度(461±117 nmol/mL)に達し、投与12 h後には血中で検出されなかった。多くのプエラリンが12時間までに尿中に排出されたことから、プエラリンは比較的早く体内に吸収され、肝臓で代謝を受けずに血液循環に入った後、速やかに尿中に排泄されることが示唆された。骨組織におけるマウス大腿骨遠位部の組織切片のMS/MS解析の結果、プエラリンは骨組織の広い範囲で検出され、その一部は連続切片上のTRAP染色された破骨細胞の位置と一致した。以上のことから、経口摂取したプエラリンはマウス体内でほとんど代謝を受けず骨組織さらに破骨細胞に移行し、破骨細胞の分化を下方制御することが示唆された。

kudzu, puerarin, imaging mass spectrometry

講演番号：4J11a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ J校舎11会場

LC-MS/MSを用いたSIRT1活性測定法の開発

Development of an analytical method for SIRT1 activity using LC-MS/MS

○富岡　三貴、伴野　勧、三好　規之、大島　寛史（静岡県大・食品栄養）
○Miki Tomioka, Susumu Tomono, Noriyuki Miyoshi, Hiroshi Ohshima (University of Shizuoka)

【目的】NAD^+依存的脱アセチル化酵素活性を持つsirtuinは酵母ではsir2、哺乳類ではSIRT1~7が報告されている。酵母においてsir2は寿命を延長させる効果を示したため、sir2のオルソログであるSIRT1は哺乳類における寿命制御因子として期待されている。SIRT1はHistone deacetylases (HDACs) クラスⅢであり、histone H4の16番目のリジンの脱アセチル化反応を触媒する。この酵素はアセチル化リジンを含むタンパク質（ペプチド）を基質、NAD^+を補酵素としてタンパク質中のリジン残基のアセチル基をNAD^+に転移させた後、nicotinamide (NAM)とO-acetyl-ADP-riboseを生成する。現在SIRT1活性測定法として蛍光基質を用いた方法が使用されているが、非特異的な擬活性を示すことが報告されており、その有用性が疑問視されている。そこで本研究ではアセチル化ペプチドを基質としてNAD^+存在下でSIRT1と反応させ、生成したNAMをLC-MS/MSで測定する新規SIRT1活性測定法の開発を行った。

【方法・結果】ヒトp53由来のアセチル化ペプチド (Arg-His-Lys-Lys(Ac)) 125 μMを基質とし、250μM NAD^+（補酵素）と10 mU/μLヒトコンビナントSIRT1を緩衝液中にて37℃で反応させた。内部標準物質(nicotinamide-2,4,5,6-d_4)を添加後アセトニトリルでタンパク質除去を行い、反応生成物であるNAMをLC-MS/MSを用いて測定した。分析にはLC:1200series、MS:G6410B Triple Quand（共にAgilent Technologies）、移動相をアセトニトリル/10 mM酢酸アンモニウム(98/2,v/v)のアイソクラティック方式、流速0.2 mL/min、注入量 10 μL、カラムはXBridge C18 3.5μm (2.1×150mm)を使用した。SIRT1反応溶液としてpH8.4前後のTris-HCl緩衝液を使用しているものが主流であるが、TrisはESI/MS検出において*m/z* 122でありNAMが*m/z* 123でイオンサプレッションを受けてしまうため緩衝液をリン酸緩衝液(pH5.8~8.0)に変更した。緩衝液のpHによるNAM生成量を検討するため、pH6~8のリン酸緩衝液を用意して反応させたところ、pHが高いほどNAM生成量が増加した。そのためSIRT1反応に使用する緩衝液のpHを8.0とした。この分析条件でタイムコースを取ってSIRT1酵素反応後に測定を行ったところ、反応時間依存的なNAMの生成が確認された。現在、HeLa細胞にSIRT1活性化化合物であるresveratrolやSIRT1阻害剤を添加し、開発したSIRT1酵素活性測定法の有効性について検討を行っている。

SIRT1, LC-MS/MS

講演番号：4J11a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ J校舎11会場

四重極・飛行時間型質量分析計を用いたプロシアニジン類のラット尿中代謝物の解析

Metabolomics Study of Rat Urinary Metabolome Modifications After Intake of Apple Procyanidins

○庄司俊彦、三浦富智[1]、石川（高野）祐子[2]、葛西宏介[1]、後藤真生[2]、神田智正[3]、中島翔平[3]、尾崎嘉彦（農研機構・果樹研、[1]弘前大院・保健、[2]農研機構・食総研、[3]アサヒビール HD）
Toshihiko Shoji, Tomisato Miura, Yuko Takano-Ishikawa, Kosuke Kasai, Masao Goto, Tomomasa Kanda, Shohei Nakashima, Yoshihiko Ozaki (National Institute of Fruit Tree Science, Hirosaki University Graduate School of Health Sciences, National Food Research Institute, Asahi Breweries, Ltd)

【目的】プロシアニジン類はリンゴなど果実の主要なポリフェノールで、脂質代謝制御など様々な機能性が報告されている。一方、ラットやヒトでの吸収に関する報告はあるが、代謝などについての報告は少なく、生体利用性について十分な解明がなされているとは言いがたい。その理由として、単量体であるカテキン類を含む混合物で生体利用性が研究されており、プロシアニジン類に由来する代謝物と区別することが困難であることが一つとして挙げられる。そこで、本研究では、重合度別に分離したプロシアニジン類をラットに投与し、尿中代謝物を解析することによってプロシアニジン類の生体利用性を明らかにすることにした。
【方法及び結果】リンゴ果汁から調製したプロシアニジン類を順相クロマトにより重合度別に分離した。単量体から 4 量体までの各画分を 1g/kg で 8 週齢ウイスターラットに経口投与し、経時的に（0-8、8-24、24-48 時間）代謝ゲージを用いて採尿した。四重極・飛行時間型質量分析計（Q-TOF/MS）を用いて尿中代謝物を分析し、得られたピークの保持時間と質量数（*m/z*）を MarkerView®による主成分分析で解析した。カテキン類と重合体であるプロシアニジン類のグループに分類され、分類に寄与した成分は代謝物や分解物であった。また、硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体などに違いが認められた。

procyanidins, apple, Q-TOF/MS

講演番号：4J11a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ J校舎11会場

低酸素下における共役リノール酸の抗ガン作用機構の解明

Elucidation of the anticancer mechanism of Conjugated linoleic acids under hypoxia

○長友 琢、松山 哲也、池保 有理、加藤 恵美子、西山 慧、山崎 正夫、西山 和夫(宮崎大・農)
○Taku Nagatomo, Tetsuya Matsuyama, Yuri Ikeho, Emiko Kato, Kei Nishiyama, Masao Yamasaki, Kazuo Nishiyama (University of Miyazaki・agricultural)

【目的】

ガン組織は増大する際に組織内部が低酸素状態に陥るが、ガン細胞はその状態に適応して生存や増殖を続ける。このことからガン細胞の低酸素ストレス応答を抑制することは有効なガン予防、治療の標的になると考えられる。その低酸素ストレス応答には、Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) が中心的な役割を果たすことが知られている。そのHIF-1を抑制する機能を持つ食品成分は既にいくつか知られているが、脂肪酸についての報告例はほとんどないのが現状である。そこで、当研究室では脂肪酸の低酸素ストレス応答の抑制作用を検討し、共役リノール酸 (CLA) の低酸素下でのHIF-1α安定化抑制作用があることを示した。そこで、本研究ではCLAの作用機構と種々の脂肪酸の低酸素ストレス応答抑制作用を検討した。

【方法】

実験はヒト肝ガン細胞株HepG2を使用し、低酸素条件では酸素濃度１％のインキュベーターを用いた。始めに、11種類の長鎖脂肪酸のHIF-1α安定化抑制作用について検討するため、低酸素条件下で４時間培養し、HIF-1α発現をWestern blotで調べた。次に、HIF-1αはプロリン脱水素酵素 (PHD) によりユビキチンの標的となり、ポリユビキチン化することで26sプロテアソームによる分解が起きることが知られている。そこで、26sプロテアソームの阻害剤であるMG132、及びPHDの阻害剤であるDMOGを用いたHIF-1αのWestern Blotも行った。

【結果】

今回検討した脂肪酸の中ではCLAに強いHIF-1α安定化抑制作用があることが示され、CLAに特異的な作用であることが示唆された。また、その抑制作用には濃度依存性があり、HIF-1αの核移行の抑制効果が認められたことからHIF-1の活性化抑制が期待される。さらに、HIF-1αの分解に働く26sプロテアソームおよびPHDの阻害剤処理によってCLAのHIF-1α安定化抑制作用が消失したことから、CLAの作用はHIF-1α分解促進であることが示唆された。

以上の結果より、CLAが通常酸素下において抗ガン作用を持つことは既に知られているが、低酸素下においても抗ガン作用を示す事が期待される。

cancer, HIF-1, Conjugated linoleic acid

講演番号：4J11a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ J校舎11会場

タイトル　ラット体内におけるフェニルプロパノイド単量体のマンマリアンリグナンへの変換

Title　Conversion phenylpropanoid monomer into mammalian lignan in rats.

○橋本薫　八神祐絵　堀尾文彦　小林美里　松下泰幸　今井貴規　福島和彦（名大院生命農）

○Kaoru Hashimoto, Sachie Yagami, Fumihiko Horio, Misato Kobayashi, Yasuyuki Matsushita, Takanori Imai, Kazuhiko Fukushima (Nagoya Univ.)

【目的】植物リグナン、例えばピノレジノール（PIN）、セコイソラリシレジノール（SECO）、ラリシレジノール（LAR）は腸内細菌の作用でマンマリアンリグナン、例えばエンテロジオール（END）やエンテロラクトン（ENL）へと生体内変換する。これまで植物リグナンや人工リグニンからマンマリアンリグナンへの変換は報告されているが、フェニルプロパノイド単量体からマンマリアンリグナンへの変換は報告されていない。本研究では、[9,9-D_2]-コニフェリルアルコール（CA）と[8-^{13}C]-フェルラ酸（FA）をラットへ経口投与することで、フェニルプロパノイド単量体からマンマリアンリグナンへ生体内変換されるか検討した。

【方法】ラット12匹に精製基本飼料を与えて1週間予備飼育した後、0.1％PIN、0.5％[9,9-D_2]-CA、0.5 ％ [8-^{13}C]-FA添加飼料を各3匹のラットに与えた。実験開始後、3、6および9日目に24時間採尿と採糞を行い、尿と糞をGC-MS分析に供した。

【結果】ラットの尿と糞の各群1個体の分析結果を暫定的にTable 1、Table 2に示した。[9,9-D_2]-CAを投与したラットの尿から重水素ラベルされたEND、ENLが検出され、糞から重水素ラベルされたENDが検出された。[8-^{13}C]-FA を投与したラットの尿と糞からはEND、ENLは検出されなかった。[9,9-D_2]-CAを添加した飼料を10日間動物室に放置し、GC-MS分析に供したところ、PINなどのリグナン類は検出されなかった。この結果から、CAはラット体内で二量化し、マンマリアンリグナンへ生体内変換されたと考えられる。現在、残りの各群2個体の尿と糞を分析し、CAのENDへの変換経路を検討中である。

Table 1 Urinary excretion of END, ENL, SECO, LAR and PIN in rats

	Urinary excretion (nmol/24h)														
	END			ENL			SECO			LAR			PIN		
	3 day	6 day	9 day	3 day	6 day	9 day	3 day	6 day	9 day	3 day	6 day	9 day	3 day	6 day	9 day
Basal diet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIN diet	64	108	233	29	61	25	2382	7590	5554	208	286	92	1777	9621	3756
[9,9-D_2]-CA diet	2	112	135	-	-	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[8-^{13}C]-FA diet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2 Fecal excretion of END, ENL, SECO, LAR and PIN in rats

	Fecal excretion (nmol/24h)														
	END			ENL			SECO			LAR			PIN		
	3 day	6 day	9 day	3 day	6 day	9 day	3 day	6 day	9 day	3 day	6 day	9 day	3 day	6 day	9 day
Basal diet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIN diet	125	23	406	47	-	25	426	280	223	-	-	-	11005	9629	6392
[9,9-D_2]-CA diet	-	27	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[8-^{13}C]-FA diet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Mammalian lignan, Phytoestrogen

講演番号：4J11a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ J校舎11会場

シクロデキストリンを用いたブラジル産プロポリスの生体利用率の改善

Improvement of oral bioavailability of Brazilian propolis by cyclodextrin inclusion

○成田 幸夫、市原 賢二（アピ株式会社・長良川リサーチセンター）
○Yukio Narita, Kenji Ichihara (Nagaragawa Research Center, API Co., Ltd)

【目的】プロポリスはミツバチが植物の新芽や樹液などを集めて作る樹脂状物質で、古くから民間薬として利用されており、様々な機能性が報告されている。ブラジル産プロポリスエタノール抽出物に含まれる主要な成分に*p*-クマル酸、アルテピリンC、ドルパニン、バッカリンなどの桂皮酸類があり、特にアルテピリンCについては抗ガン作用や抗炎症作用などが報告されている。しかしながら、ブラジル産プロポリスの吸収性に関する知見は限られており、Konishiらによってアルテピリンの生体利用率は*p*-クマル酸に比べて顕著に低いと報告されているにすぎない（J Agric Food Chem. 2005, 53(26):9928-33.）。本研究ではアルテピリンCを含むブラジル産プロポリス成分の生体利用率の改善を試みた。

【方法】シクロデキストリンは難水溶性成分を包接化し、水への分散性を改善する物質として食品産業において広く利用されている。そこでブラジル産プロポリスエタノール抽出液（EEP）とα、β、γの3種のシクロデキストリン（α-CD, β-CD, γ-CD）をそれぞれ混合、乾燥し、プロポリス固形分を20%含む粉末を調製した（α-CD, β-CD, γ-CD/EEP)。比較対照としてプロポリスエタノール抽出液とデキストリン（Dex）を混合、乾燥し、同様の粉末を調製した（Dex/EEP)。これら粉末を40±2℃、湿度75±6%の条件下で10週間保存し、成分の保存安定性を確認した。粉末原料は打錠やカプセルの剤形で摂取される場合が多いため、作成した粉末をゼラチンカプセルに封入し、以後の試験に使用した。カプセルの溶解性を調べるため、人工腸液（pH6.5）中に投入、振とうし、フィルター（0.45μm）濾過した濾液のプロポリス成分含量を測定した。また実際にカプセルを摂取した場合の生体利用率を調べるため、ビーグル犬（n=3）に本カプセルを経口投与して経時的に採血を行い、プロポリス成分の血中濃度を測定した。

【結果】α-CD, β-CD/EEPとDex/EEPで粉末中に含まれるアルテピリンC、ドルパニン、バッカリン量及びこれらの保存安定性に顕著な違いは認められなかった。γ-CD/EEPではバッカリン濃度のみ低かったが、これは抽出効率の違いによる影響と考えられた。溶解性試験の結果、振とう開始30分後において、α-CD, β-CD, γ-CD/EEPはDex/EEPと比較して、各成分とも5倍以上の溶解性を示した。なお、α-CD, β-CD, γ-CD間での溶解性の違いは10%程度であった。ビーグル犬への投与試験において、α-CD, β-CD, γ-CD/EEPはDex/EEPに比べ、アルテピリンCとドルパニンで高い血中濃度を示した。

以上より、CDを用いてプロポリス粉末を調製することにより、プロポリス粉末の溶解性及び生体利用率を改善することが可能である。

propolis, bioavailability, cyclodextrin

講演番号:4J11a10
講演日時、会場:3月25日10:49～ J校舎11会場

タイトル　ハマナス抽出液の抗糖化作用

Title Inhibitory effect of Rosa rugosa extract on formation of advanced glycation end products.

○中井　大助、伊賀　和宏（三省製薬）
○Daisuke Nakai, Kazuhiro Iga(SANSYO SEIYAKU)

【目的】生体内においてタンパク質の糖化反応は、様々な疾患の原因であることが示唆され広く研究されている。タンパク質の糖化は皮膚中においても発生し、肌の色味が黄色を帯びてくる黄ぐすみの要因ともされている。また、培養細胞においては最終糖化産物(AGEs)を添加するとアポトーシスが発生することが報告されており、糖化の抑制は黄ぐすみや老化の予防に効果的であると考えられる。ハマナス(Rosa rugosa)はバラの野生種の１つであり、北海道から本州の沿岸部にかけて自生している。今回、我々はハマナス抽出液に高い抗糖化作用を見出したため、ハマナス抽出液によって抑制されている糖化産物の特定を試みた。また、線維芽細胞へのAGEsの影響およびハマナス抽出液の効果についても解析を行った。【方法】北海道産ハマナスの乾燥花びらからエタノール水混合溶媒にて抽出し、ハマナス抽出液を調製した。ハマナス抽出液存在下および非存在下で、タンパク質(BSAもしくはコラーゲン)と糖(グルコースもしくはフルクトース)を混合し一定温度でインキュベートして各AGEs試料を調製した。このAGEs試料において、ハマナス抽出液が抑制している糖化産物の特定を蛍光光度計、ウエスタンブロット、HPLCを用いて行った。次に、線維芽細胞に各AGEs試料を添加した培地で24時間培養し、WST-8アッセイにて細胞生存率の測定を行った。【結果】ハマナス抽出液は、蛍光性のAGEsの生成を強く抑制した。また、AGEｓによる細胞死を抑えることも確認した。以上のことからハマナス抽出液には抗糖化作用があり、皮膚においても黄ぐすみおよび老化の予防効果が見込めることが示唆された。

Glycation, Rosa rugosa, Skin care

講演番号：4J11a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ J校舎11会場

次世代シークエンサーを用いたSuperSAGE法による食品機能解析

Analysis of the functional food by SuperSAGE using the next-generation sequencer.

○山田 秀俊、菊地 明香、大城 恵利子、吉田 健太郎、矢野 明（生工研）
○Hidetoshi Yamada, Sayaka Kikuchi, Eriko Oshiro, Kentaro Yoshida, Akira Yano (IBRC)
http://www.ibrc.or.jp/HPData2010/03Labo/05MolDesign/Welcome.html

機能性食品摂取による生体の状態変化について理解するためには複数の臓器における遺伝子発現状態を網羅的に比較・解析し、臓器間のネットワークを考慮した上で包括的に考察する必要がある。そのためには、DNAマイクロアレイよりもハイスループットな解析系の開発が求められる。そこで、我々は次世代シークエンサーを用いたSuperSAGE（Serial Analysis of Gene Expression）法を食品機能性解析に応用することで、複数の臓器における遺伝子発現状態を一斉に解析する系の構築を目的とし研究を行った。

解析の対象としたのはイサダ（ツノナシオキアミ）水溶性抽出物（Water-soluble Extract of Pacific Krill ： WEPAK）摂取マウスの肝臓である。イサダは三陸から常磐沿岸で年間約５万トン水揚げされるオキアミであり、東北地方の一部地域では古くから食用として用いられている。これまでの研究から、WEPAKには高脂肪餌摂取時の体重増加を抑制する効果があり、WEPAK摂取によって肝臓トリグリセリド値が低下することがわかっていた。しかしながら、体重増加の抑制と肝臓トリグリセリド値の低下が起こるメカニズムは不明であった。そこで、WEPAK摂取による肝臓の状態変化について明らかにするために、SuperSAGE法によるトランスクリプトーム解析を行った。

次世代シークエンサーより出力されたデータについてBlast解析、RでのbaySeq解析、CytoscapeでのGene Set Enrichment Analysis（GSEA）を行い、GO（Gene Ontology）termごとに分類された遺伝子群の発現変化を可視化した。その結果、WEPAK摂取マウスの肝臓において脂質代謝に機能する遺伝子群の発現が増加していることが明らかとなった。さらに、real-time PCR解析を行った結果、β酸化に機能する複数の遺伝子（Prkaa, Prkab, Prkag, Acsl, Cpt1a, Acox1など）の発現が上昇していることが確認され、WEPAK摂取による肝臓での脂質代謝亢進が示唆された。

本研究と同様の方法（イルミナ社 Genome AnalyzerⅡxでのの SuperSAGE解析）で解析を行った場合、一度に80サンプルの解析が可能であり、１サンプル当たりのTag数も80万から100万と十分なデータ量が得られる。また、データ解析も研究者個人のデスクトップパソコンで行うことが可能であり、SuperSAGE法を用いたトランスクリプトーム解析は高精度かつハイスループットな食品機能解析法として利用可能である。

Next-Generation Sequencing、Transcriptome、anti-Obesity

講演番号：4J11a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ J校舎11会場

タイトル　トマトによる運動疲労軽減効果について

Title　The effect of tomatoes on reduction of the fatigue induced by exercise

○向田　恵、吉田　和敬、佐藤　英介[1]、稲熊隆博（カゴメ総研、[1]鈴鹿医大・薬）

○Kei Mukuta, Kazutaka Yoshida, Eisuke Sato[1] ,Takahiro Inakuma(Kagome Co., Ltd. Research Institute, [1]Suzuka University of Medical Science)

【目的】トマトには抗酸化物質であるリコピンや各種ビタミン、ミネラル、有機酸など多くの栄養成分が含まれている。我々はヒトにおいて、運動の際にトマトジュースを摂取することで運動時のパフォーマンスの向上や疲労感の軽減が期待できることを示してきた。運動時の疲労感の感知には、各種のサイトカインやホルモンの分泌が関与しているといわれている。そこで本研究では、これらのサイトカインやホルモンを運動疲労の指標とし、市販のトマトジュースおよびトマト上清の摂取が運動疲労に与える影響を実験動物にて検討した。また、運動前、運動中間、運動後と異なるタイミングで投与を行い、最適な摂取タイミングを検討した。

【方法】動物は9週齢ICRマウスを用いた。被験食品はトマトジュースと、トマトジュースを遠心分離して得られる上清を用いた。マウスにトレッドミルで25 m/minの速度で1時間走行運動させ、①運動1時間前②運動中間③運動直後のいずれかのタイミングで被験食品を投与した。疲労指標として運動後10分間の行動量を解析すると共に、運動6時間後の血中コルチゾール、TGF-β、IL-10をELISA法により測定した。

【結果】トマトジュース又はトマト上清を①運動1時間前または②運動中間に投与することにより、運動による行動量の減少と血中コルチゾール、TGF-β、IL-10濃度の上昇が有意に抑えられた。しかし③運動直後の投与においては、トマトジュースとトマト上清のいずれの投与によっても行動量の減少および血中コルチゾール、TGF-β、IL-10濃度の上昇は抑えられなかった。以上の結果より、運動前または運動中間にトマトジュースを摂取することで運動時の疲労が軽減されること、またその作用は上清中に含まれる水溶性成分のみによっても見られることが示唆された。

tomato, fatigue

講演番号：4J12a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ J校舎12会場

大腸菌をモデル生物としたヒト腸内ポリアミン濃度を調節する手法の確立

Construction of the technique for regulating the extra cellular polyamine concentration of *Escherichia coli*.

○坂井友美[1]・栗原新[2、1]・松本光晴[3]・木邊量子[4]・辨野義己[4]・鈴木秀之[1]（[1]京工繊大院・応用生物、[2]京大院・生命科学、[3]協同乳業・研究所・技術開発、[4]理化学研究所・辨野研）

○ Yumi Sakai[1] ,Shin Kurihara[2、1] ,Mitsuharu Matsumoto[3] ,Ryoko Kibe[4] ,Yoshimi Benno[4] and Hideyuki Suzuki[1] （[1]K.I.T., [2]Kyoto university,[3]Kyodo Milk Industry,[4]Benno Lab. RIKEN）

【目的】ポリアミン (PA) は腸内細菌の代謝産物の１つである。本研究では「腸内 PA 濃度を一定レベルに維持できれば慢性炎症を抑制することができ、健康寿命伸長に繋がる」という仮説に従い研究を行っている。PA 吸収・放出経路が解明されつつある大腸菌をモデル細菌として用いて、腸内環境の PA 濃度上昇に有効な物質を検証した。さらにその PA 濃度上昇機構を分子レベルで解明し、PA の一種であるプトレッシン (Put) の新規エクスポーターの同定を試みる。大腸菌の Put 放出系トランスポーターは現在 *PotE* が同定されているのみであり、これを同定することは PA の濃度調節を目標にする上で、非常に重要である。
【方法】協同乳業研究所によるヒト糞便のメタボローム解析によりスクリーニングされた、Put 濃度調節候補物質を大腸菌野生株の純粋培養系で評価した。培養は各候補物質を培地に添加し、組成の異なる３種類の培地（Ｍ９、Ｍ９トリプトン、Ｍ９グルコース-トリプトン）および好気または嫌気の条件で大腸菌野生株を用いて行い、細胞外ポリアミン濃度（Put、カダベリン、スペルミジン）を HPLC で測定した。候補物質の評価は細胞当たりの最大 Put 放出量を算出し、比較することで行い、ヒト腸内 PA 濃度調節物質を決定した。また同物質を添加した条件下での遺伝子発現量の変化（DNAマイクロアレイ解析、RealTimePCR）および PA 放出に関わるトランスポーター候補遺伝子の欠損株を用いた培養実験から大腸菌の新規 Put エクスポーターを探索した。
【結果】その結果、アルギニンを添加した培養系における１細胞当たりの最大 Put 放出量は、コントロールと比較して最大１１倍もの非常に高い値を示した。アルギニンは培地の組成や通気条件にかかわらず安定して、培養上清の Put 濃度を上昇させる効果があった。そこで理化学研究所においてアルギニンをヒト糞便に添加したところ、試験した全検体中で PA 濃度が上昇したことから同物質を腸内 PA 濃度調節物質と決定した。以上より、腸内常在菌の Put 産生を誘導し、大腸内および大腸組織で Put 濃度を上昇させるアルギニン添加食品が提案できると考えられる。またアルギニン添加時に、転写量が大きく変化した大腸菌の遺伝子が複数存在した。そのうちの１つの *ydiN* という機能未知の遺伝子が新規 Put エクスポーターとして働いている可能性が示唆された。

Escherichia coli, Polyamine, Arginine,

講演番号:4J12a02
講演日時、会場:3月25日09:11～ J校舎12会場

膵腺房細胞におけるロイシンとアルギニンが惹起する翻訳調節因子4EBP1とS6K1リン酸化の上流を探る

Upstream of translational regulatory factors,4EBP1 and S6K1 phospholylation by leucine and arginine in pancreatic acinar cells.

○河崎 さほり、原 博（北大院・農）
○Saori Kawasaki, Hiroshi Hara (Hokkaido Univ)

【目的】アミノ酸の中でロイシンは、mammalian target of rapamycin(mTOR)の活性化を介してタンパク質翻訳を亢進することが肝臓や骨格筋でよく知られている。私どもは、膵臓においてアルギニンに翻訳開始因子を活性化する作用があることを報告し、ロイシンとアルギニンはmTOR、その下流のシグナル因子である4E-BP1、S6K1のリン酸化を相加的に促進することを明らかにした。しかし、mTORの上流がどのように調節されるのか、あるいは4E-BP1やS6K1はmTORに完全に依存しているのかは明らかでない。そこで本研究では、細胞内情報伝達因子の阻害剤を用い、ロイシン、アルギニンによる4E-BP1とS6K1の活性化経路を調べた。
【方法】ラット膵腺房細胞株であるAR42Jを48時間MEM培地で培養し、分化させた後、アミノ酸の濃度をMEM培地の1/5にした低アミノ酸培地で1.5時間培養した。その後、ロイシン、アルギニン単独、または両方の濃度を変えて添加し、30分後に細胞を回収した。アミノ酸添加30分前に各種阻害剤(PI3K阻害剤;LY294002、mTOR阻害剤;Rapamycin、NO合成阻害剤;L-NMMA)を添加した。サンプル調製後、Western blot法により、mTOR、4E-BP1、S6K1のリン酸化の程度を測定した。
【結果】低濃度ロイシンだけでなく、高濃度ロイシンにアルギニンを添加したときにも相加的な促進作用がみられた。特にmTORのリン酸化は、高濃度ロイシンのとき、アルギニンに用量依存的な促進作用がみられた。PI3K阻害剤により、4E-BP1、S6K1のリン酸化が強く抑えられたが、ロイシン、アルギニンによる相加作用は消失せず、PI3K以外の促進経路の存在が示唆された。また、阻害剤無添加では、ロイシンはアルギニンよりリン酸化促進作用が有意に強かったが、PI3K阻害時では両者は同等の促進作用を示した。mTOR阻害剤では、アミノ酸によるS6K1のリン酸化は完全に抑えられたが、4E-BP1リン酸化の抑制は部分的であり、4E-BP1リン酸化にはmTORを介さない経路の存在が考えられた。また、ロイシンとアルギニンによる4E-BP1とS6K1のリン酸化経路は一部異なることが示唆された。

mTOR, Leucine, Arginine

講演番号：4J12a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ J校舎12会場

高リン食摂取ラット腎臓の遺伝子発現に対するホエイタンパク質の影響

Effect of whey protein on renal gene expression in high-phosphorus diet administered rats

○林　ちひろ[1]、石島　智子[1]、阿部　啓子[12]、中井　雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]KAST）
○Chihiro Hayashi[1], Tomoko Ishijima[1], Keiko Abe[12], Yuji Nakai[1]
([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]KAST)

【背景と目的】ホエイはチーズ製造過程で副産物として生じ、廃棄されることが多いが、その成分には様々な有用性があることから「サプリメント」として利用されることもある。中でも、ホエイタンパク質には肝臓の炎症抑制効果があることが報告されている。一方、筆者らが研究を進めている高リン食摂取ラットの腎臓は炎症様の障害を引き起こす[1]が、この障害に対してもホエイタンパク質が何らかの効果を発揮しうると考えた。本研究では高リン食摂取ラットを用いてホエイタンパク質が腎臓へ与える影響を解明することを目的としている。
【方法と結果】４週齢のWistar系雄性ラットを１週間の予備飼育後、casein diet(リン含量:0.3%、タンパク質給源：casein)摂取群（C群)、high phosphorus casein diet(リン含量:1.2%、タンパク質給源:casein）摂取群(HPC群)、whey protein diet(リン含量:0.3%、タンパク質給源:whey protein isolate)摂取群（W群)、high phosphorus whey protein diet（リン含量:1.2%、タンパク質給源:whey protein isolate）摂取群（HPW群）の４群に分け（各群:n=6)、21日間飼育した。右腎を用いた重量とミネラル量測定の結果、HPC群、HPW群において有意な肥大化、リンおよびカルシウム含量の増加が確認され、飼料のタンパク質給源に関わらずリン過剰摂取による影響を受けていた。出納試験によりHPC群、HPW群では有意にリンの見かけの吸収量が増加した。血清リン濃度についてはリン含量、タンパク質給源による違いが見られ、リン過剰摂取による血清リン濃度の減少については、HPC群とHPW群でリンの体内保留量が減少したことと関係していると考えられる。現在、左腎から抽出したtotal RNAによりDNAマイクロアレイを行い、ホエイタンパク質摂取が腎臓における遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響を網羅的に解析中である。
[1]Suyama, T. et al., PLoS ONE., in press

whey protein, rat kidney, DNA microarray

講演番号：4J12a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ J校舎12会場

特殊な組成のアミノ酸サプリメントを経口投与したマウスの肝臓遺伝子発現プロファイリング

Hepatic gene expression profiling of mice given orally a supplement with special amino acid composition of *Vespa* larval saliva origin.

○篠崎　文夏、亀井　飛鳥、渡部　由貴、荒井　綜一[1]、熊谷　弘太[2]、阿部　岳[3]、阿部　啓子[4](KAST、[1]東農大・総研、[2]協和発酵バイオ、[3]Hornet Research Center、[4]東大院農生科・応生化)

○Fumika Shinozaki, Asuka Kamei, Yuki Watanabe, Soichi Arai[1], Kota Kumagai[2], Takashi Abe[3], Keiko Abe[4] (KAST, [1]Tounoudai, [2]KYOWA HAKKO BIO., LTD., [3]Hornet Research Center, [4]Toudai)

【目的】スズメバチ(*Vespa*)栄養液に含まれる特異な組成のアミノ酸混合液*V.*A.A.M.は、他の組成のアミノ酸混合液よりも効果的に運動時の持久力を向上させ、血中のアミノ酸バランスの恒常性を維持に寄与することが知られている。さらに我々は、*V.*A.A.M.が単離脂肪細胞に直接作用し、中性脂肪の分解を誘起することを明らかにしており、このことから*V.*A.A.M.には運動刺激が伴わない状態においても様々な効果を示すと推測される。そこで本研究では平常時における*V*AAMの効果をDNAマイクロアレイによって解析し、アミノ酸の新たなサプリメント機能の探索を目的とした。

【方法】動物はマウス(ddY、雄、5週齢)を用い、通常飼料および水を自由摂取させた。1週間馴化した後、群分けを行い、脱イオン水もしくは1.8%*V.*A.A.M.をそれぞれ1日1回の合計5回、37.5μL/g体重の容量で経口投与した。また、*V.*A.A.M.の対比アミノ酸混合液として1.8%カゼインアミノ酸混合液（CAAM）を投与した。投与後4時間に肝臓を摘出しトータルRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析を行った。

【結果】*V.*A.A.M.投与群と脱イオン水投与群、CAAM投与群と脱イオン水投与群の遺伝子発現パターンを比較すると、それぞれおおまかな群に分離され、遺伝子発現パターンの違いがみられた。どのような違いがジーンオントロジーに見られるか調べたところ、コレステロール代謝プロセス、ステロイドホルモン生合成プロセス、モノカルボン酸代謝プロセス、免疫系の遺伝子発現が*V.*A.A.M.投与群では脱イオン水投与群よりも増加していた。また、CAAM投与群と脱イオン水投与群の比較ではコレステロール生合成プロセスおよび免疫系の遺伝子発現が増加していた。コレステロール合成経路に関与する酵素の遺伝子は*V.*A.A.M.投与群では脱イオン水投与群よりも発現減少しているものがあったが、逆にCAAM投与群は脱イオン水投与群よりも遺伝子発現が増加しているものが多かった。以上のことから、コレステロール合成は*V.*A.A.M.とCAAM間で大きく異なり、アミノ酸組成比の違いによってコレステロール生合成量が変化することが示唆された。

amino acid composition, liver , DNA microarray

講演番号：4J12a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ J校舎12会場

シナモンによるIGF-Iシグナルの活性化を介した皮膚線維芽細胞のI型コラーゲン産生促進作用

Cinnamon extract promotes type I collagen biosynthesis *via* activation of IGF-I signaling in human dermal fibroblasts

内藤 健太郎、高棹 直子[1]、石倉 聖子、田村 梓、○赤川 貢[1]、((株) ディーエイチシー、[1]阪府大院・生命環境)

Kentaro Naito, Naoko Takasao[1], Seiko Ishikura, Azusa Tamura, ○Mitsugu Akagawa[1] (DHC Corporation, [1]Osaka Prefecture University)

【目的】肌の老化は皮膚機能の低下やシワなどの外見的変化として現れる。この原因の一つにコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの崩壊が挙げられる。コラーゲンは生体内で約25%を占める主要タンパク質であり様々な結合組織を構築しているが、加齢にともないその生合成量が減少してしまう。本研究は、皮膚線維芽細胞のI型コラーゲン産生を促進する食品成分を探索すると共にその作用機序の解明を目的として行った。
【方法と結果】ヒト正常線維芽細胞株NB1RGB細胞に食品由来の抽出物を投与し、ウエスタンブロッティングによりⅠ型コラーゲンの産生を検証した。その結果、香辛料の一つであるシナモンに強いコラーゲン産生促進作用があることを明らかとした。同作用はリアルタイムPCRによるⅠ型コラーゲンのmRNA発現量の検証とⅠ型コラーゲンの蛍光免疫染色からも認められた。そこで、シナモンの活性成分をHPLCにより精製し、NMRで構造解析した。その結果、シンナムアルデヒドとその類縁体が同定され、それらが線維芽細胞に作用してコラーゲン産生能を亢進させることが明らかとなった。I型コラーゲン遺伝子の発現は、insulin-like growth factor-I (IGF-I) シグナリングの活性化によって誘導されることが報告されている。シンナムアルデヒドのコラーゲン産生促進作用の機序を明らかにするために、ウエスタンブロッティングによるIGF-Iシグナリングの解析を行った。その結果、NB1RGB細胞にシンナムアルデヒドを投与することによってIGF-I受容体、およびその下流のシグナル伝達分子であるinsulin receptor substrate-1 (IRS-1) のチロシン残基が濃度依存的にリン酸化され、IGF-Iシグナリングがリガンド非依存的に活性化することが判明した。このような結果からシンナムアルデヒドは、線維芽細胞のIGF-Iシグナリングをリガンド非依存的に活性化することによってI型コラーゲンの産生を誘導すると考えられた。

Cinnamon, Collagen, Insulin-like growth factor-I

講演番号：4J12a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ J校舎12会場

セサミン，エピセサミン及びそれらのカテコール誘導体のAβアミロイド線維形成抑制効果

Aβ fibril formation inhibitory activity of sesamin, episesamin and their catechol derivatives

○小川　紘史、片山　茂、中村　宗一郎（信州大農・応生科）
○Hirofumi Ogawa, Shigeru Katayama, Soichiro Nakamura (Shinshu University)

【目的】タンパク質が何らかの要因により変性し，線維状になったものは総称してアミロイドと呼ばれ，これらが脳または全身に沈着して起こる疾病はアミロイドーシスと呼ばれている。アミロイドーシスには，アルツハイマー型認知症やクロイツフェルト・ヤコブ病など，今日社会問題となっている深刻な疾病が含まれる。最近，*in vitro*の系ではあるが，様々な食品成分，中でもポリフェノール類がタンパク質のアミロイド線維形成の抑制に有効であることが明らかにされつつある。本研究ではアルツハイマー病の原因物質であるアミロイド-β（$A\beta_{1\text{-}42}$）を用いて，セサミン，エピセサミン及びそれらのカテコール体のアミロイド線維形成抑制効果を調べたので報告する。

【方法】セサミン及びエピセサミンカテコール体は亜臨界水処理によって生成した。すなわち，セサミン及びエピセサミンを150-200気圧下で所定時間処理した後，HPLCにより分離精製を行った。HPLCの溶出条件はカラムにInertsil ODS-3（4.6×250mm）を用い，水／アセトニトリルを溶離液とし，流速1ml/min，測定波長を280nmとした。各ピークは^{1}H，^{13}C NMRスペクトルの解析により，構造を決定した。アミロイドの線維形成抑制試験は$A\beta_{1\text{-}42}$を終濃度25μMになるように100mM NaClを含む50mM phosphatebuffer（pH7.5）を用いて調整し，これに所定の濃度のサンプルを加え，37℃でインキュベーション後，供試液のアミロイド線維量をチオフラビンTにより測定した。

【結果】セサミン，エピセサミンの亜臨界水処理によって，モノカテコール体及びジカテコール体が効果的に生成されることが確認された。モノカテコール体，ジカテコール体の収率は最大でそれぞれ26.3%，11.1%であった。チオフラビンTを用いた*in vitro*アッセイの結果，セサミン，エピセサミンは$A\beta_{1\text{-}42}$に対して有意なアミロイド線維形成抑制効果を示さなかったが，いずれもモノカテコール体及びジカテコール体になると高い抑制効果を示すようになることが明らかにされた。最も高い効果を示したのはセサミンジカテコール体であり，終濃度50μMで98.2%の阻害率であった。セサミンおよびエピセサミンのカテコール体にはAβアミロイド線維形成抑制効果が期待されることが示された。

Aβ, sesamin catechol derivative, subcritical water

講演番号：4J12a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ J校舎12会場

食品機能成分のリンパ管新生抑制作用

Study on anti-lymphangiogenic effect of food-derived bioactive compounds

○立石　能子、庄屋　雄二、安保　千尋[1]、柴田　紗知[1]、古澤　修一、松原　主典[1]、松田　治男（広島大院・生物圏、[1]広島大院・教育）

○Yoshiko Tateishi, Yuji Shoya, Chihiro Abo[1], Sachi Shibata[1], Shuichi Furusawa, Kiminori Matsubara[1], Haruo Matsuda (Bioshere Science・Hiroshima University, [1]Education・Hiroshima University)

【目的】血管系とリンパ系は体内組織液の恒常性維持に重要である。しかし、両者の異常形成（血管新生・リンパ管新生）は、がんをはじめ炎症等種々の病態悪化と深く関連している。これまでに血管新生抑制作用を有する食品機能成分についての研究は多く行われてきている。一方、食品機能成分のリンパ管新生抑制作用についての研究は世界的にも極めて少ない。その要因として、リンパ管新生の評価を行うには複雑な実験系が必要なことが上げられる。そこで、我々は比較的簡便にリンパ管新生への影響を評価できるex vivoリンパ管新生モデルを確立した。本研究では、この評価系用いて食品機能成分のリンパ管新生抑制作用について検討を行った。

【方法】本研究では、多彩な生理作用が知られている赤ワインや緑茶等のポリフェノール類について検討した。Ex vivoリンパ管新生モデルでは、ラット胸部リンパ管を摘出し小片に切断した後、コラーゲンゲルで包埋し、10 %ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地で培養しリンパ管新生を誘導した。リンパ管新生への影響は、生じた微小リンパ管の長さを測定することにより評価した。また、ヒトリンパ管内皮細胞を用いたin vitroモデルでの評価（細胞増殖、マトリゲル上での管腔形成、遊走）も行った。

【結果】Ex vivoリンパ管新生モデルにおいて、レスベラトロールやエピガロカテキンガレート等が抑制作用を示した。さらに、リンパ管内皮細胞を用いたin vitroモデルでその作用を検討したところ、リンパ管新生の主要な過程である増殖・管腔形成・遊走に対して抑制的に作用した。これらの成分は、リンパ管新生の主要な過程に対して抑制的に働くことにより、リンパ管新生抑制作用を示すことが明らかとなった。また、これらの成分は血管新生抑制作用も有しており、がんの成長や炎症で亢進する血管新生に加え、リンパ管新生も抑制することにより生体に対し有益に作用することが示唆された。

Tateishi, Y., et al. manuscript in preparation.

Lymphangiogenesis, Lymphatic endothelial cells, Functional food

講演番号：4J12a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ J校舎12会場

木田チリメンシソから単離したガラクトグリセロ脂質は食細胞においてO_2^-およびNOの産生を阻害する

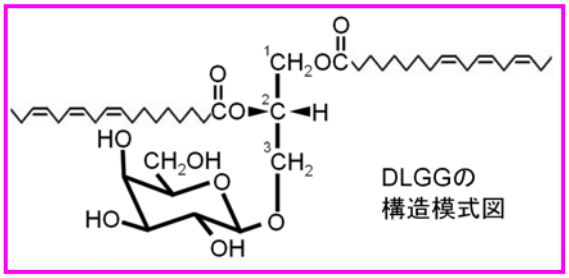
Galactoglycerolipid purified from *Perilla frutescens* var. *crispa* inhibits O_2^- and NO generations in phagocytes

○高橋正和、杉山友太、高橋 有、川畑球一、村上 明[1]、入江一浩[1]、久保義人[2]、小林恭一[2]、大東 肇（福井県大・生物資源、[1]京大院農・食生科、[2]福井県食品加工研）

○Masakazu Takahashi, Yuta Sugiyama, Yu Takahashi, Kyuichi Kawabata, Akira Murakami[1], Kazuhiro Irie[1], Yoshito Kubo[2], Kyoichi Kobayashi[2], Hajime Ohigashi (Dept. Biosci., Fukui Pref. Univ., [1] Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [2] Fukui Pref. Food Proc. Res. Inst.)

【目的】食細胞は活性化すると、NADPHオキシダーゼによってスーパーオキシド（O_2^-）をはじめとするさまざまな活性酸素種（ROS）ならびにラジカルを産生して生体防御を担う。一方、過剰なROSやラジカルの産生は、多様な慢性炎症性疾患のリスクを高める。我々は、福井県の伝統野菜の１つである木田チリメンシソにO_2^-産生抑制活性を見出した。そこで本研究では、その活性化合物を単離・構造決定し、作用解析を行った。

【方法】ヒト前骨髄性白血病細胞株HL-60細胞をDMSO存在下で培養して好中球様に分化させ、12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)で刺激すると、大量のO_2^-が産生される。この放出されたO_2^-をWST-1試薬で測定した。この系に供試サンプルを加え、O_2^-産生抑制活性を検討した。一方、マウスマクロファージ細胞株RAW264をLPS／IFN-γ で刺激すると一酸化窒素（NO）が産生される。この系に供試サンプルを加え、生じた亜硝酸イオンの濃度をGriess法で測定し、NO産生抑制効果を検討した。



【結果】木田チリメンシソの葉（1.5 kg)から得たメタノール抽出物より、各種クロマトグラフィーにより O_2^- 産生抑制化合物 85 mg を単離した。本化合物を MS, NMR, IR, UV, 旋光度などの機器分析に供した結果、ガラクトグリセロ脂質の一種、1,2-di-*O*-α-linolenoyl-3-*O*-β-galactosyl-*sn*-glycerol (DLGG)と同定された。DLGG は用量依存的に O_2^-産生を抑制し、その IC_{50} (21 μM)はシソ中に豊富に含まれ O_2^-消去活性を示すロスマリン酸（RoA）の IC_{50} (29 μM）と同等であった。しかしキサンチンーキサンチンオキシダーゼ系を用いて無細胞系で O_2^-を産生させた場合、RoA が用量依存的に O_2^-を消去したこととは対照的に、DLGG はまったく消去活性を示さなかった。よって HL-60 細胞系では、DLGG は細胞によって産生された O_2^-を消去するのではなく、細胞内の O_2^-産生を阻害すると推定された。一方、DLGG は RAW264 による NO 産生に対しても顕著な抑制活性を示した（IC_{50} = 20 μM)。DLGG は誘導型 NO 合成酵素（iNOS）やシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)の発現誘導も抑制することが確認された。このように DLGG は食細胞による O_2^-産生と NO 産生を阻害すると判明した。

（参考文献） *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**(11), 2240-2242, 2011.

galactoglycerolipid, perilla, superoxide

講演番号：4J12a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ J校舎12会場

トマト成分 lycopene による生体防御機構の活性化

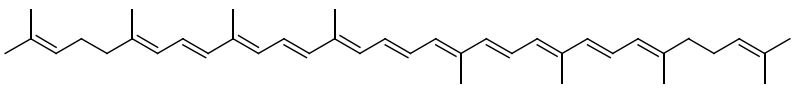
Acitivation of self-defence systems by lycopene in tomato

○大倉 伸哉、大西 康太、入江 一浩、村上 明（京大院農・食生科）
○Shinya Ohkura, Kohta Ohnishi, Kazuhiro Irie, Akira Murakami (Food Sci & Biotech, Kyoto University)

【背景】Heat shock proteins (HSPs) は、細胞内で変性タンパク質の修復やタンパク質の品質管理を行う分子シャペロンとして機能している。HSP90 などの構成型シャペロンに加えて、熱ショック応答などによって誘導され、細胞に熱耐性を賦与する誘導型シャペロンも存在する。代表的な誘導型分子種である HSP70 は、HSP90 が変性タンパク質の疎水性ドメインを認識し、転写因子である HSF1 を解離することによって、転写誘導を受けることが知られている。これまでに当研究室では、ハナショウガ成分の zerumbone (ZER) が HSP70 を始めとする誘導型シャペロンの発現を増強すること、また ZER 結合タンパク質が HSP90 に認識されることなどを報告している。そこで本研究では、本作用が ZER のみならず、他の多くのファイトケミカル（植物二次代謝物）に認められるか否かを検討した。

【方法と結果】まず、ファイトケミカル（9 種）および植物性栄養素（16 種）をマウス肝臓 hepa1c1c7 細胞に投与し、6 時間後の HSP70 mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて定量した。その結果、ファイトケミカル群では、ursolic acid や α-humulene など疎水性の高い化合物に顕著な誘導能が確認されたが、ポリフェノール類は低活性であった。一方で、栄養素群では、all-*trans* retinol と $ZnCl_2$ 以外の全てが不活性であった。続いて、顕著な活性の認められた all-*trans* retinol に着目し、その類縁体（2 種類）とカロテノイド（6 種類）の HSP70 誘導能を評価した。All-*trans* retinoic acid は不活性であったが、一部のカロテノイドには顕著な活性が見られ、その活性は疎水性と概ね相関があった。次に、HSP70 誘導活性の認められたファイトケミカルの中で、血中に存在することが報告されている lycopene に着目した。Lycopene は、HSP27 および HSP40 の mRNA 発現量も有意に増加させた。また、hepa1c1c7 細胞に対して 3 時間の前処理を行うと、熱ショックによる細胞生存率の低下を、有意に抑制した。これらの結果から、lycopene は様々な誘導型 HSP の発現を増強することによって、熱耐性を賦与すると推察される。

【考察】本研究により、トマトの主要カロテノイドである lycopene に関して、肝臓細胞にケミカルストレッサーとして認識されることで生体防御因子の発現を誘導し、ストレス耐性を賦与するという新しい機能性が示唆された。



Lycopene の構造式

lycopene, heat shock protein, hepatocyte

講演番号：4J12a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ J校舎12会場

歯周病原性菌由来バイオフィルムに対する鶏卵抗体の犬におけるオーラルケア効果

Oral care effect on the dog by the chicken egg antibody against the biofilm derived from periodontal bacteria

○山下 裕輔、石川 卓哉、福山 登[1]、岡野 顕子[2]、森 尚志[2]、金 武祚（㈱ファーマフーズ、㈱ダイワ[1]、ダクタリ動物病院・京都病院[2]）

○Yusuke Yamashita, Takuya Ishikawa, Noboru Fukuyama[1], Akiko Okano[2], Takashi Mori[2], Mujo Kim (Pharma Foods International Co., Ltd., [1]DAIWA Co., Ltd., [2]Daktari Animal Hospital Kyoto)

【目的】

現在飼われている2歳以上の犬の80%以上が、歯周病を始めとする何らかの歯周疾患にかかっている。これらの疾患の予防のひとつは、歯垢（バイオフィルム）内の歯周病原性菌をできるだけ除去することにある。我々は、これまでに複数種の歯周病原性菌を複合培養して得られる、バイオフィルムに対する鶏卵抗体（バイオフィルムIgY）を作製し、バイオフィルム形成阻害効果およびヒトでの歯周病リスク低減効果を確認してきた。今回は、バイオフィルムIgYの犬口腔内細菌との反応性確認およびIgY摂取によるオーラルケア効果を検証したので報告する。

【方法】

供試動物として、2～12歳齢の雄6頭、雌3頭からなる犬種はバラバラの健康な9頭の飼い犬を試験に使用した。試験はダブルブラインドの並行群間比較試験で行なった。すなわち、9頭を体重および口臭スコアがおおよそ同じになるように、1群3頭ずつ3群に分け、それぞれにバイオフィルムIgY含有飼料（バイオフィルムIgY群）、ジンジバリス菌IgY含有飼料（単菌IgY群）、デキストリン飼料（対照群）を2週間1日3回摂取させた。摂取開始前、2週間摂取後に、口腔内検査として歯垢および歯石付着程度、歯肉の充血、および口臭官能検査を行ない、それぞれスコア化した。また同時に、唾液中の総嫌気性菌数をプレート培養により測定した。さらに、嫌気性菌コロニーの破砕物を用い、ELISAによる反応性確認試験を実施した。

【結果】

ELISAによる反応性確認試験の結果、バイオフィルムIgYは、9頭全ての唾液中嫌気性菌に対して反応し、単菌IgYと比較しても高い反応性を示した。さらに、犬への摂取試験において、バイオフィルムIgY群および単菌IgY群共に、2週間の摂取期間後に唾液中総嫌気性菌数の減少が確認された。また、口腔内検査の結果、全ての群において歯肉の充血、歯石付着程度のスコアの変動は認められなかった。歯垢付着程度においては、バイオフィルムIgY群においてスコアが約半分まで減少した。さらに、口臭スコアにおいては摂取期間後に、バイオフィルムIgY群が70%減であり、最も口臭改善効果が高いことが確認された。以上の結果より、バイオフィルムIgYは犬オーラルケア素材として適していることが示唆された。

chicken egg antibody, biofilm, dog oral care

講演番号：4J12a11
講演日時、会場：3月25日11:00～ J校舎12会場

タイトル S-アデノシルメチオニン（SAMe）含有清酒酵母の特性

Title Properties of SAKE yeast powder containing S-Adenosyl-$_L$-Methionine (SAMe)

○関口 喜則、坂部 泰成、五十嵐 庸[1]、長岡 功[1]（磐田化学工業(株)、[1]順大医 生化学・生体防御学）

○Yoshinori Sekiguchi, Yasunari Sakabe, Mamoru Igarashi[1], Isao Nagaoka[1] (IWATA CHEMICAL CO.,LTD, [1]Dept Host Defense Biochem Res, Sch Med, Juntendo Univ)

【目的】 S-アデノシルメチオニン(SAMe)は、うつ・肝障害・関節炎に対する改善機能を有しており、これら疾患に対する医薬品・サプリメント成分として世界 10 カ国以上で 20 年以上に渡って利用されている。しかしながら SAMe は化学的に不安定な物質であり、常温においても急激に分解してしまう問題がある。海外では安定化法として SAMe のパラトルエンスルホン酸塩などが開発されている。また SAMe の高い生産能を有する微生物として清酒酵母が報告されている。そこで我々は清酒酵母の培養と SAMe 安定化技術の開発に取組み、食品素材用として SAMe 含有清酒酵母粉末を開発した。本製品の機能性評価としてヒアルロン酸産生能を検討したので報告する。

【方法・結果】 SAMe 含有清酒酵母は、*Saccharomyces cerevisiae* 701 株をメチオニン含有培地を用いて液体培養することにより調製した。得られた SAMe 含有酵母に対して各種化合物を添加して同時に粉末化させることにより試験サンプルを調製した。試験サンプルを一定条件で保管し SAMe の分解速度を検討することにより各種化合物の安定性効果を評価した。スクリーニングの結果、リン酸化合物類とシクロデキストリン類に安定性効果があることが示された。リン酸化合物の中ではフィチン酸が特に高い安定性効果を示した。この効果はフィチン酸が有する高いキレート能によるものであると推測される。シクロデキストリンの安定性効果はフィチン酸により劣っている。また、その効果はγ-CD＞α-CD≒β-CD の順で示された。

詳細にフィチン酸とγ-CDの添加条件について検討した結果、SAMeに対してフィチン酸は1：5以上 (mol比)、γ-CDは1：1～2.5(mol比)が最適添加量であることが示された。さらに、フィチン酸とγ-CDの組合せについて検討した。両化合物の最適添加量はSAMe：フィチン酸：γ-CD＝1：3～5：1.5 ～4 (mol比)であることが明らかになった。SAMeの安定性に関しては、単独使用時より分解速度が非常に緩やかになり長期間の維持が可能であるということが示された(Fig. 1)。単独使用時と比較して10倍以上の相乗効果が得られている。この要因としては、AdoMetとフィチン酸により形成されている安定化状態がγ-CDによって維持される機構が作用しているのではないかと予測される。

また、機能性評価として清酒酵母粉末を用いてヒアルロン酸(HA)産生能を評価した。ヒト軟骨由来培養細胞株(SW1353)に対し、試験サンプルを添加、24時間培養し、その上清液中に含まれるHA量を測定した。その結果、SAMe含有酵母において対象群と比較して有意にHAが増加することが確認できた。

Keyword1, Keyword2, Keyword3 S-Adenosyl-$_L$-Methionine、Yeast

講演番号：4J13a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ J校舎13会場

発酵発芽ソバの正常血圧ラットに対する降圧効果

Blood Pressure Lowering Effect of Fermented Buckwheat Sprout on Normotensive Rat

湯澤 瑤子、○橋口 幸弥、小山 正浩[1]、中村 浩蔵(信州大院・農、[1]信州大院・総合工)
Yoko Yuzawa, ○Yukimi Hashiguchi, Masahiro Koyama[1], Kozo Nakamura
(Grad. Sch. Agric. Shinshu Univ., [1]Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Tech, Shinshu Univ.)

【目的】タデ科ソバ属普通ソバの新芽を破砕・乳酸発酵して製造された「発酵発芽ソバ」は，独特の酸味と匂いを呈するルビー色の飲料である。これまでに発酵発芽ソバは，高血圧自然発症ラット(SHR)への単回経口投与試験において有意な血圧降下作用を，*in vivo*，*in vitro*においてアンジオテンシンⅠ変換酵素(ACE)阻害活性を有することが明らかとなっている。さらに，より詳細な血圧降下メカニズム解明のために，SHRより摘出した胸部大動脈を用いた血管等尺性張力試験を行った結果，0.5 μg/ml添加時より拡張を開始し， 50%効果濃度(EC_{50})は8.3 μg/mlであった。また，内皮細胞除去標本，内皮型一酸化窒素(NO)合成酵素阻害剤共存下において血管拡張作用が強く阻害されたことから，発酵発芽ソバは血管内皮細胞におけるNO産生を介した拡張を引き起すことが明らかとなった。このように，発酵発芽ソバはSHRにおいて優れた降圧作用を有することが明らかとなっている。そこで本研究では発酵発芽ソバの降圧作用メカニズムの更なる解明を目的とし，正常血圧ラット(SD)を用いた単回経口投与試験，血管等尺性張力試験，血管弛緩因子の定量を行った。

【方法】

1. 単回経口投与試験　発酵発芽ソバ凍結乾燥物(10 mg/kg body weight)を単回経口投与し，テイルカフ法にて投与後3,6,9,24時間後の血圧測定を行った。
2. 血管等尺性張力試験　ラット胸部大動脈よりリング標本を作製し，静止張力を負荷した状態で，収縮剤により血管を収縮させ，発酵発芽ソバ0.5～100 μg/mlを累積添加した際の張力の変化を測定した。
3. NOの定量　ラット胸部大動脈よりリング標本を作製し，発酵発芽ソバ100 μg/mlを添加したクレブス溶液中でインキュベート後，溶液中の亜硝酸濃度をGriess法によって測定した。
4. cGMPの定量　ラット胸部大動脈よりリング標本を作製し，発酵発芽ソバ100 μg/mlを添加したクレブス溶液中でインキュベート後，血管をホモジナイズし，ELISA法によって測定した。

【結果】SHRへの単回経口投与試験では，0.01 mg/kg(body weight)投与9時間後に，有意な血圧降下（収縮期血圧20.1 mmHg，拡張期血圧14.2 mmHg）が確認されているのに対し，SDでは10 mg/kg(body weight)投与において有意な血圧降下は確認できなかった。また，発酵発芽ソバ添加による血管等尺性張力変化，NO産生量，cGMP量も本結果を支持するものであった。これらの結果から，発酵発芽ソバが作用する血管内皮上のレセプターは，高血圧状態であるSHRに特異的に存在している可能性が示唆された。

blood pressure lowering effect, normotensive rat, lactic fermentation of buckwheat plant

講演番号：4J13a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ J校舎13会場

発酵発芽ソバがSHRの生体組織ACE活性に与える影響

Effect of Fermented Buckwheat Sprout on Tissue ACE Activity in SHR

○小山 正浩[1]，服部 成治，加藤 舞，中村 浩蔵（信州大院・農，[1]信州大院・総合工）
○Masahiro Koyama[1], Seiji Hattori, Mai Kato, Kozo Nakamura (Grad. Sch. Agric., Shinshu Univ., [1] Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Tech., Shinshu Univ.)

【目的】ソバの新芽を原料に製造される発酵発芽ソバは，高血圧自然発症ラット(SHR)を用いた単回経口投与試験において10 μg/kg(body weight)の用量で有意に収縮期，拡張期血圧を低下させた。また，発酵発芽ソバは*in vitro*でアンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害活性を有し，SHR由来胸部大動脈に対して最少有効用量0.5 μg/mLで内皮依存性の血管拡張作用を有していた。これらの知見から，ACE阻害作用と血管拡張作用が発酵発芽ソバの強力な降圧メカニズムに関与すると考えられた。そこで本研究では，発酵発芽ソバ投与によるSHRの組織ACE活性の変化を測定し，発酵発芽ソバが*in vivo*のACE活性に与える影響を検討した。また，発酵発芽ソバからHPLC，LC-MS分析によって単離・同定された降圧ペプチドについても同様の試験を行い，その効果を検証した。
【方法】雄性13週齢のSHR（各群5匹）に発酵発芽ソバ凍結乾燥物，発酵発芽ソバから単離されたジペプチドおよびトリペプチドをそれぞれ10 mg/kg，陰性対照として純水を単回経口投与した。ジペプチドはBoc基をアミノ保護基として用いた液相法で，トリペプチドは固相法（Fmoc法）で合成した。投与6時間後にすべての投与群をエーテル麻酔下で開腹し，採血，胸部大動脈，肺，心臓，肝臓，腎臓を摘出した。ACE活性測定には血液を遠心分離して得られた血漿および Tris-HCl バッファーでホモジナイズした各臓器抽出物を用いた。ACE活性測定は，堀内らの方法により行い，組織ACE活性を算出した。
【結果】発酵発芽ソバ投与により，胸部大動脈，肺，心臓および腎臓のACE活性が陰性対照に比べて有意に減少し，発酵発芽ソバは生体内でもACEを効果的に阻害していることが明らかとなった。胸部大動脈，肺，心臓および腎臓でのACE阻害率は，それぞれ42.8%，12.2%，86.8%，33.1%であった。特に，胸部大動脈，心臓で効果が高く，発酵発芽ソバは血管拡張作用とともに組織ACE阻害においても主要循環器系に作用していると考えられた。また，発酵発芽ソバから単離されたジペプチド投与で胸部大動脈，心臓および腎臓のACE活性が，トリペプチド投与で血漿のACE活性が有意に阻害された。ジペプチド投与による胸部大動脈，心臓および腎臓でのACE阻害率は，それぞれ28.6%，92.8%，30.4%，トリペプチド投与による血漿でのACE阻害率は53.5%であった。これまでの研究から*in vitro* ACE阻害活性（IC_{50}値）は，発酵発芽ソバが240 μg/mL，ジペプチドが2100 μg/mL，トリペプチドが2200 μg/mLであることが明らかとなっている。このように*in vitro* ACE阻害活性は決して高くないが，生体内では有効にACEを阻害していたことから，単離されたジ，トリペプチドは生体利用度が高く生体内で安定であると考えられた。以上の結果より，発酵発芽ソバの降圧作用には，生体内でのACE阻害活性が関与しており，含有されるジ，トリペプチドも組織ACE阻害作用によって発酵発芽ソバの降圧作用の一部を担っていることが明らかとなった。

ACE inhibitory activity, buckwheat sprout, lactic fermentation

講演番号：4J13a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ J校舎13会場

タイの発酵魚食品プラーラー中のレニン阻害活性物質

○中原 和彦、韮澤 悟、野田澤 茜、ゲシニー トラクーンティワコン[1]、プルンチャイ タンカナクン[1]、後藤 猛[2]、高橋 砂織[3]（国際農研、[1]カセサート大学、[2]秋田大学・工学資源、[3]秋田県総食研セ）

○ Kazuhiko Nakahara, Satoru Nirasawa, Akane Notazawa, Gassinee Trakoontivakorn[1], Plernchai Tangkanakul[1], Takeshi Gotoh[2], Saori Takahashi[3] (JIRCAS, [1]Kasetsart Univ., [2]Akita Univ., [3] ARIF)

【目的】プラーラーは、様々な淡水魚を主原料として食塩や米ぬか等とともに発酵させたタイの伝統発酵食品である。我が国の塩辛やなれずしに通じる伝統食品であり、地域食料資源として重要な食材・栄養源となっている。プラーラーには、発酵による原料魚成分の分解物や微生物の代謝産物等、生理機能性を示す物質が含まれている可能性があるものの、現段階ではあまり研究が進んではいない。本研究では、血圧低下作用（レニン阻害活性）を有する物質を取得する目的で、プラーラー成分のスクリーニングを行い、強い活性を示した画分から活性物質を精製し、構造推定を行った。

【方法】レニン阻害活性測定は、組換え型ヒトレニン及び蛍光消光基質を用いる高橋らの方法により行った[1)]。タイ各地で収集したプラーラー（固形物）のメタノール抽出物を調製し、レニン阻害活性を測定し、強い活性を示す試料から、液々分配及び逆相 HPLC により活性物質を精製し、質量分析により構造を推定した。

【結果】タイ中部から収集されたプラーチョン（*Channa striata*, カムルチーの一種）を原料とするプラーラーのメタノール抽出物に最も強いレニン阻害活性が検出された。これをヘキサン：水＝１：１により分液したところ、ヘキサン層にほとんどの活性が回収された。次に、逆相 HPLC によりヘキサン画分を分離し、分取した各ピークの活性を測定し、２つの主要な活性画分を見出した。この２つの画分を繰り返し分取して、最終的にほぼ純粋な画分Ａ，Ｂを得た。それぞれについて質量分析を行ったところ、Ａはリノール酸、Ｂはドコサヘキサエン酸であると推定された。それぞれの標準物質について HPLC のリテンションタイム、質量分析スペクトルおよびレニン阻害活性について比較し、同一物質であると結論づけられた。発酵に用いられた原料魚プラーチョンの脂質組成データから、これら２つの物質は原料中のトリグリセリドが発酵中に加水分解されて遊離してきたものと考えられた。現在、タイにおいて発酵過程におけるこれら物質の生成の経時変化について検討を行っている。また、プラーチョン以外の淡水魚を原料とするプラーラーについてもレニン阻害活性が広く検出されたが、これらについても多くがヘキサン層に回収され、HPLC 分析により、上記２つの物質を含む遊離不飽和脂肪酸であることが示唆された。遊離不飽和脂肪酸のレニン阻害活性については、高橋らにより既に報告されている[2)]。

1) Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007)
2) Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1713-1715 (2010)

Fermented fish, Unsaturated fatty acids, Renin

講演番号：4J13a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ J校舎13会場

クロマグロ皮たんぱく質経口摂取によるマウスの肝機能保護作用

Hepatoprotective action of dietary Bluefin tuna skin protein on CCl_4-intoxicated mice

○高橋 賢次、田中 照佳、岩本 直樹、[1]阿川 泰夫、[1]澤田 好史、吉村 征浩、財満 信宏、森山 達哉、河村 幸雄（近畿大院農・応生化、[1]近畿大学水産実験場）

○Kenji Takahashi, Teruyoshi Tanaka, Naoki Iwamoto, [1]Yasuo Agawa, [1]Yoshifumi Sawada, Yukihiro Yoshimura, Nobuhiro Zaima, Tatsuya Moriyama, Yukio Kawamura(Kinki Univ, [1]Fisheries Labo of Kinki Univ)

【目的】魚類水産食品の可食部である筋肉部以外の多くは加工段階で廃棄物として処理される。そこで魚類未利用部位の有効利用を計る目的で、経口摂取クロマグロ皮たんぱく質（TUS）のマウス肝機能保護作用を検討した。

【方法】ddY系統10週齢雄性マウスをControl群、CCl_4摂取群、CCl_4+TUS摂取群に分けた。Control群、CCl_4群にはControl食をCCl_4+TUS群には1% TUS含有食をCCl_4投与前に3週間摂取させた。3週間後、CCl_4群とCCl_4+TUS群に40μl/kg 体重の用量でCCl_4を腹腔内投与し、肝障害を誘発させた。CCl_4投与24時間後、血液および肝臓サンプルを採取した。肝臓の病理切片はHE染色により観察した。肝機能マーカーとして血中ASTおよびALT活性を、脂質過酸化の指標としてTBARSを測定した。核内転写因子（NF-κB）の核内移行およびInhibitory κB(IκB)のリン酸化レベルはウエスタンブロット法にて、inducible nitric oxide synthase（iNOS）のmRNA発現レベルはRT-PCRにて定量した。

【結果】CCl_4暴露により肝臓の中心静脈付近の壊死領域や血清ASTとALT活性、肝臓TBARSレベルはControl群と比較し有意に増加した。CCl_4処理によって増加した肝臓壊死領域や血清ASTとALT活性、肝臓TBARSレベルはTUSの経口摂取により有意に減少した。次に経口摂取TUSによるマウス肝臓保護作用のメカニズムを検証するためマウス肝臓における炎症シグナルの変動を解析した。炎症反応において中心的な役割を果たすNF-κBの挙動を調べると、TUSの摂取はIκBのリン酸化を下方制御する結果、NF-κB核内移行を抑制していた。したがって、その下流遺伝子であるiNOSのmRNA発現は下方制御され、iNOSによって大部分が生成される活性酸素分子種の一酸化窒素の血中レベルが減少したと考えられる。以上のことから、TUSの経口摂取はCCl_4誘発性肝障害モデルマウスのNF-κB経路を通して炎症シグナルを下方制御することで肝機能を保護することが示された。また1%コラーゲンペプチド含有食を3週間経口摂取させるとTUS食と同様に肝機能マーカーおよび肝臓組織切片の壊死領域を有意に減少させ、食餌性TUSおよびTUCPはいずれも肝保護作用を示すことが明らかとなった。

Bluefin tuna, collagen, hepatitis

講演番号：4J13a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ J校舎13会場

タイトル 新規の腹部大動脈瘤モデルラット作出と病理解析

Title Produce and pathologic analysis of newly established abdominal aortic aneurysm model rat

○毛利 陽平、財満 信宏、田中 宏樹[1]、森山 達哉、河村 幸雄、海野 直樹[1]、瀬藤 光利[1]（近畿大・農、[1]浜松医大）

○Youhei Mouri, Nobuhiro Zaima, Hiroki Tanaka[1], Tatsuya Moriyama, Yukio Kawamura, Naoki Kaino[1], Mitsutoshi Setou[1](Kinki Univ, [1]Hamamatsu Univ School Med)

【目的】ヒト腹部大動脈瘤(Abdominal aortic aneurysm:AAA)は、腹部大動脈の進行的な拡張を主病変とする疾患であり、血管の拡張機構は明らかにされていない。これまでに我々はヒトAAAの病理解析により、AAA血管壁に虚血が生じていることを明らかにした。本研究では、腹部大動脈血管壁の虚血がAAA形成に及ぼす影響を評価することを目的として、ラット腹部大動脈に人工的に虚血を誘導し、病理解析を行った。

【方法】SDラット(8週齢、オス)の腹部大動脈血管壁を虚血状態にすることで腹部大動脈瘤モデルラットを作成した。同時に偽手術を施した同8週齢ラットをコントロールとした。4週間、餌、水道水を自由に与えた。両ラットから腹部大動脈を摘出、CMC包埋後に凍結した。切片はクライオスタットで10μm切片とした。切片をヘマトキシリンエオジン(HE),エラスチカファンギーソン(EVG)、オイルレッドO、ピクルシリウスレッド(PSR)、免疫化学染色で病理を評価した。

【結果】処置後4週間過後、偽手術を施したラットの腹部大動脈と比較して虚血誘導したラットの腹部大動脈は拡大していた。さらに、HE、EVG、オイルレッドO染色により腹部大動脈の血管中外膜の肥厚と脂肪細胞の出現が観察された。免疫組織化学染色においてペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体（peroxisome proliferator-activated receptor:PPAR)γ、マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase:MMP)-9の増加が虚血誘導ラットで示された。またPSR染色の結果、虚血誘導ラットにおいて膠原線維が減少していることが観察された。

本研究からラット腹部大動脈の虚血誘導によりAAAが形成されることが示された。モデルラット腹部大動脈血管壁の拡大には血管壁の脂肪細胞の出現、炎症が関与していることが示唆された。本研究で新たに作出したモデルラットの血管壁病理所見は、ヒトAAAの病理所見と一致しており、今後、AAA発症機構の解明及びAAAの予防・治療法の開発への応用が期待される。

abdominal aortic aneurysm, ischemia, inflammation

講演番号：4J13a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ J校舎13会場

GABA 含有無塩味噌クッキーの調製とその血圧降下作用

Blood-pressure lowering activity of cookies containing GABA enriched salt-free soybean paste.

○八田　一、荘　咲子、上野　義栄[1]（京女大・食物、[1]京都府中小企業技術セ）
○Hajime Hatta, Sakiko Shou, Yoshie Ueno[1] (KWU, [1]Kyotofu Chusyokigyo Gijyutu Se)

【目的】γーアミノ酪酸（以下GABAと記す）は血圧降下作用や脳代謝促進作用などの生理活性を有する神経伝達物質である。GABA含有無塩味噌は、食塩の代わりにエタノールの静菌作用で発酵熟成中の防腐を行い、味噌の熟成工程でGABA産生乳酸菌であるラクトバシルス・ヒルガルディ（L. hilgardii　K-3株）を利用し、味噌中のグルタミン酸を脱炭酸してGABAに変換したものである。本研究では、GABA含有無塩味噌配合クッキー（GABA味噌クッキー）を調製し、その食感や風味を官能試験により最適化するとともに、それを用いたボランティア試験で血圧降下作用を検討した。

【方法】GABA含有無塩味噌の調製を行い、それを12-22%添加したクッキーを試作し、その物性を機器分析（テキソグラフ）により調べた。また、各クッキーの食感や風味を官能検査（９名）で調べ、クッキーに対するGABA含有無塩味噌の配合量を決定した。最後に１１人のボランティア（正常高値を含む健常者）を募り、シングルブラインド法によって１ヶ月間のGABA味噌クッキー摂取（GABA１日摂取量約40mg/枚）による血圧変動を調べた。

【結果】クッキーは GABA 味噌の配合量が多いほど、柔らかく、味噌風味が強く嗜好性が低下した。ボランテイア試験に用いるクッキーは、その食感（サクサク感）や１日の GABA 摂取量から 17%配合と決定した。GABA 味噌クッキー摂取群の各ボランティア（６名）は、摂取２～４週間後にクッキー摂取前の最高および最低血圧に対して約 5-20mmHg の血圧降下があった（危険率 1%または 5%で有意差あり）。一方、コントロール味噌クッキー摂取群（５名）の血圧は変動しなかった。以上の結果より、GABA 味噌クッキーを１日１枚摂取（GABA 摂取量約 40mg/日）することにより、高血圧の改善効果が得られた。

Blood-pressure, GABA, Soybean paste

講演番号：4J13a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ J校舎13会場

高蛋白質そば粉抽出物の血糖上昇抑制作用

Suppressive effect of an extract from high protein buckwheat flour on postprandial blood glucose level

○友竹 浩之、柴本 むつ美、新居　佳孝[1]（飯田女子短大、[1]徳島県工技センター）

○Hiroyuki Tomotake, Mutsumi Shibamoto, Yoshitaka Nii[1] (Iida Women's Junior College, [1]Tokushima Prefectural Industrial Technology Center)

【目的】多段式ロール製粉により作製した高蛋白質ソバ粉（4番粉）は30%以上の蛋白質と10%以上の食物繊維を含み、脂質代謝や糖代謝の改善作用を有する。本研究では、4番粉の抽出物がラットの血糖上昇に与える影響について調べた。

【方法】4番粉の80%メタノール抽出物を水にけん濁したものを試料として用いた。二糖類分解酵素阻害作用は酵素源としてラット小腸アセトン粉末、基質にマルトース、スクロースを用いた。4週齢SD系ラットを予備飼育した後、糖負荷試験を行った。前日夜より絶食したラットの血糖値を測定した後、糖類を溶解した試料溶液をゾンデを用いて強制投与した。コントロール群ラットには糖類を水に溶解して投与した。投与後30分、60分、90分後の血糖値を測定した。

【結果】4番粉抽出物には、弱いながらも二糖類分解酵素阻害作用が見られた。糖負荷試験を行った結果、試料溶液とともにショ糖を投与したラットの60分後の血糖値は、コントロール群ラットに比べて有意に低かった。以上のことより、4番粉に含まれる成分にはラットの糖負荷後の血糖上昇を抑制する効果があることが示唆された。

buckwheat flour, blood glucose, high protein

講演番号：4J13a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ J校舎13会場

鶏コラーゲン加水分解物の摂取が食塩負荷SHRの腎臓と血管細胞に与える影響

Effect of administration of chicken collagen hydrolysates on kidney and vascular cells in salt-loaded SHR.

○江草(雑賀)愛、國分由希、小熊敦之、西村敏英（日獣大・応生）
○Ai Saiga Egusa, Yuki Kokubun, Atsushi Oguma, Toshihide Nishimura (Nichijyuudai)

【目的】　鶏足(モミジ)由来コラーゲンを酵素処理して得られた加水分解物は経口摂取により、SHRおよびヒトの正常高値および軽症高血圧患者の血圧値を改善することが報告されている[1-2]。この他、同加水分解物には血管内皮細胞の一酸化窒素合成酵素の活性を上昇させることも明らかにされており[3]、血管内皮機能の改善が示唆されている。そこで、今回は食塩負荷させたSHRを用いて、腎臓ならびに血管系細胞への影響を調べた。

【方法】　高血圧自然発症ラット(SHR；雄；7週齢)を1週間の馴化飼育後、4%食塩負荷食を自由摂食させ、7週間飼育した。この間、対照区のSHRには水道水を、試験区には1%鶏コラーゲン加水分解物を共に自由飲水させた。試験期間終了後、エーテル麻酔下で開腹し、大動脈血と組織(心臓、腎臓、大動脈)を採集した。血管内皮前駆細胞(EPC)を単離するため、全血から単核球画分を得たのち、マグネットビーズによりCD34陽性細胞を回収した。回収されたEPCはメチルセルロース培地で培養し、増殖したコロニー数を計測した。また、全血から得た血清の一部を用いて、抗体アレイによる腎臓障害マーカー(β2 microglobulin、Clusterin、Cystatin-C、GST-α、GST-mu、KIM-1、NGAL、Osteopontin、TIMP-1)とvascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)の分析を行った。残りの血清はヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)の無血清培地に1%濃度で添加し、HUVECに対する細胞老化の抑制効果をβ-ガラクトシダーゼ染色を用いて評価した。心臓および腎臓は重量を測定し、腎臓についてはリアルタイムPCRを用いて発現する遺伝子(eNOS、CD34、Flk-1、endothelin-1、VEGF-A)の変動を比較した。

【結果】　両区での体重ならびに臓器重量には、違いが認められなかった。血中の腎臓障害マーカーでは、近位尿細管の炎症を反映するClusterinの値が試験区で約1.2倍の有意な増加が認められた。一方、心血管イベントの予告マーカーとされるTIMP-1の値は、試験区で約0.9倍に抑制されていた($p<0.05$)。鶏コラーゲン加水分解物の摂取による血管内皮機能への影響を調べるため、腎臓中の遺伝子の発現量を比較した結果、試験区では血管系細胞の指標であるCD34とFlk-1の有意な増加(2倍と1.5倍)が認められた。今回、SHRから採集したEPCは両区共にコロニーの増殖が認められなかった。そこで、正常ラットから採集したEPCに100nM angiotensinIIで細胞障害を起こさせ、対照区あるいは試験区の血清をそれぞれ1%濃度で添加して培養したところ、試験区のコロニー数は対照区の約1.5倍となり、有意に増加した。さらに、HUVECに対しても、試験区の血清を添加した場合に細胞老化を抑制することが明らかとなった。

(1) Saiga, A.,et al., *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 9586-9591 (2008)　(2) Saiga-Egusa, A. et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **73**, 422-424 (2009)　(3) Shimizu K. et al., *J. Agric Food Chem.*, **58**, 6960-6965(2010)

SHR, kidney, endothelial progenitor cell

講演番号：4J13a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ J校舎13会場

タイトル　血管内皮細胞における黒大豆ポリフェノールのNO産生促進作用

Title　Black soybean promotes endothelial NO synthesis

○難波 文男、吉田 正、伊藤 千秋、戸田 登志也（フジッコ㈱）

○Fumio Nanba, Tadashi Yoshida, Chiaki Ito, Toshiya Toda (Fujicco)

【目的】古来より黒大豆は様々な薬効を有する生薬として利用され、なかでも「活血」作用すなわち血流改善作用に関する記述は複数の漢方書に見られる。しかし、黒大豆の血流改善作用についての科学的なエビデンスはこれまでほとんど示されていない。また、黒大豆の種皮には低重合プロアントシアニジンなどのポリフェノールが多く含まれ、これらの成分が様々な生理活性の本体であることがわかりつつある。一方、血管内皮細胞は一般に高グルコース状態においては細胞内に活性酸素を蓄積し、それによって老化が進む。そして血管拡張因子である一酸化窒素（NO）の合成能が低下し、血流の低下や高血圧の原因となる。そこで、黒大豆種皮抽出物（BE）の血流改善作用に注目し、血管内皮細胞に対する影響を調べる事を目的とした。

【方法】ウシ大動脈内皮細胞を、BEを添加したグルコース含有培地で培養した。培養後、培地上清中のNO代謝産物量と遊離LDH量を測定し、またNBT assayにより細胞内の活性酸素量を評価した。さらに、老化関連β-gal assayにより細胞の老化度を評価した。最後にリアルタイムPCRによってNOS（NO合成酵素）遺伝子と、老化の指標としてklotho遺伝子の発現量を測定した。

【結果】BEを添加することで、培地上清中のNO代謝産物量が増加し、NOS遺伝子の発現が上昇した。このことから、BEは内皮細胞のNO合成能を活性化することがわかった。また、高グルコースにより増加した細胞内の活性酸素はBEの添加により著しく減少し、LDHも同様に減少した。さらに、老化の指標であるβ-galactosidaseの発現はBEの添加により減少し、一方、老化を制御する遺伝子として近年注目されているklotho遺伝子の発現は用量依存的に上昇した。これらのことから、BEは血管内皮細胞に対し、高グルコース状態における酸化ストレス、細胞傷害、老化を抑制し、血管拡張因子であるNOの産生を促進する作用を持つことが明らかとなった。

Keyword1, black soybean. Keyword2, polyphenol. Keyword3, blood fluidity

講演番号：4J13a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ J校舎13会場

海藻カロテノイドによる血管新生抑制作用の分子機構

Molecular mechanisms on the anti-angiogenic effect of marine algal carotenoids

Ganesan Ponesakki、松原　主典[1]、○菅原　達也、平田　孝（京大院農、[1]広島大院教育）
Ponesakki Ganesan[1], Kiminori Matsubara[1], ○Tatsuya Sugawara, Takashi Hirata
(Kyoto University, [1]Hiroshima University)

【目的】海洋生物のカロテノイドは、陸上の動植物のものとは異なる特有の化学構造を有しており、その機能性が期待されている。海洋資源の高度利用を目的として、海洋生物、とくに海藻由来のカロテノイドの健康機能に着目した解析を進めたところ、褐藻類に含まれているフコキサンチンと緑藻類に含まれているシフォナキサンチンは強力な血管新生抑制作用を有することが見出された（Sugawara, et al. J. Agric. Food Chem. 54, 9805-9810, 2006; Ganesan, et al. Phytomedicine 17, 1140-1144, 2010)。そこで本研究では、血管新生に関わる血管内皮細胞の細胞内シグナル伝達に着目し、その作用メカニズムの解明を試みた。
【方法】褐藻のワカメ(*Undaria pinnatifida*)からフコキサンチンを、緑藻のミル(*Codium fragile*)からシフォナキサンチンをそれぞれ抽出精製し、実験に用いた。得られたカロテノイドは、LC-MSおよびNMRを用いて、その構造を確認した。ヒトさい帯静脈由来血管内皮細胞（HUVEC）にフコキサンチンまたはシフォナキサンチンをそれぞれ添加し、血管新生に関わるシグナル経路として、VEGFおよびFGFを介する経路に与える影響について、ウエスタンブロット法およびリアルタイムRT-PCR法を用いて調べた。さらにFGF-2によって誘導されるHUVECの増殖、管腔形成、遊走に与えるカロテノイドの影響を評価した。マトリゲルを用いたプラグアッセイにより、*in vivo*での評価も試みた。
【結果】フコキサンチンとシフォナキサンチンは、FGF-2とその受容体であるFGFR-1の発現を有意に抑制した。また、これらのカロテノイドはFGF-2によって誘導されるERK1/2とAktの活性化を有意に抑制し、細胞増殖、管腔形成、遊走に対しても有意な抑制作用を示した。また、*in vivo*モデルのプラグアッセイにおいても、マトリゲル中の血管の形成を有意に抑制した。これらについて、シフォナキサンチンはフコキサンチンよりも強力な作用を示した。一方、高等植物であるホウレンソウ由来のルテイン、ビオラキサンチン、ネオキサンチンは、FGF-2存在下での血管新生に対する有意な抑制作用は認められなかった。
　以上の結果から、海藻由来フコキサンチンとシフォナキサンチンは、血管内皮細胞のFGF-2を介したシグナル経路を抑制することで血管新生抑制作用を示すことが示唆された。

Angiogenesis, Carotenoids, FGF-2

講演番号：4J14a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ J校舎14会場

バジル香気のトマトスープ風味への影響

Influence of the basil odorants on the flavor of tomato soup

○田中唯菜[1]、山本佳奈[2]、久保田紀久枝[1]（お茶大院・ライフ[1]、お茶大・食物[2]）
○Yuina Tanaka, Kana Yamamoto, Kikue Kubota（Ochadai）

【目的】近年、セロリの重要な香気成分であるフタライド類にチキンブロスの風味増強効果が報告され、香気成分の新しい機能としての味の増強作用に興味がもたれている。不揮発性成分には、うま味や甘味などの味を増強する化合物が多く知られているが、香気成分の味の増強効果については、報告例が少ない。そこで本研究では、トマト料理によく合うスパイスであるとして知られているバジルに注目し、トマトスープ風味への影響があるという仮定のもと、化学的、官能的な手法による検討を行った。
【方法】トマトスープは市販の食塩無添加トマトジュースとチキンブロス（チキン AO（㈱味の素）を水で 2%に希釈）を１：１で混合したものに塩 0.1%を加え、調製した。ここに、エジプト産乾燥スイートバジルの水蒸気蒸留によって得られたバジル香気を加え、９項目の評価用語を設定し、定量的記述分析法によって、官能評価を行った。また、水蒸気蒸留で得たバジル香気を GC、GC-MS で定量、同定、GC-O を用いて Aroma extract dilution analysis（AEDA）を行いバジル香気中の重要成分の探索を行った。さらに、具体的にバジル香気中のどの化合物がトマト呈味に影響しているかを探索するため、GC-PFC によって香気成分を６画分し、それぞれトマトスープに添加し、スクリーニングを行った。その結果、影響のみられた画分に関して詳細な化合物の同定を進め、化合物それぞれをトマトスープに添加し、トマトスープ風味への影響に関与している化合物について検討した。
【結果・考察】トマトスープに水蒸気蒸留によって得られたバジル香気を添加した結果、９項目の評価項目のうち、“うま味”、“ハーブ様”、“後味すっきり”が有意に増加した。また、“濃厚感”、“複雑さ”、“好ましい持続性”が増加傾向、“酸味”が減少傾向にあり、バジル香気がトマトスープ風味へ影響があることが確認された。また、バジル香気として含有量の多いものは、1,8-cineol (4.9 %), linalool(19.2 %), estragol（4.2 %）, methyl cinnamate(12.5 %), eugenol（14.9 %）であり、AEDA法によるにおいかぎでは、これらの他にvanillinなど含有量は少ないものの香気に大きく寄与している重要成分が含まれていることがわかった。GC-PFCで得た画分のトマトスープ添加では、画分3, 5, 6 にトマトスープ風味への影響がみられた。これらの画分に含まれる化合物に関して、現在さらに詳細な検討を行っている。

basil, tomato soup, flavor

講演番号：4J14a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ J校舎14会場

苦味の少ないピーマン「こどもピーマン(品種名：ピー太郎)」とピーマンの苦味に関する研究

Studies on a novel bitter strain and bitterness of green pepper.

○恩田 恵子[1]、中西 希[2]、森光 康次郎[1,2]、久保田 紀久枝[1,2]、六角啓一[3]（[1]お茶大・食物栄養、[2]お茶大院・ライフ、[3]タキイ種苗・研究農場）

○Keiko Onda[1], Nozomi Nakanishi[2], Yasujiro Morimitsu[1,2], Kikue Kubota[1,2], ([1]Ochanomizu University, Department of Nutrition and Food Science, [2]Ochanomizu University Graduate School of Humanities and Sciences, [3]Takii & Co. Ltd.)

【目的】子供が嫌うピーマン（Capsicum annuum L.）の苦味成分は未だに明らかになっていない。本研究では、タキイ種苗により開発された苦味の少ないピーマン「こどもピーマン」と従来品種との比較により、ピーマンの苦味成分を明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】従来品種（タキイ種苗）と「ピー太郎」は、種子とヘタを除いてホモジナイズし、ナイロン濾布で絞った。絞り液を遠心分離し、その上清に酢酸エチルと水を加えて抽出したものを逆相HPLCにて分析した。その結果、苦味のある従来品種にのみ存在する主要な３本のピークが検出された。このうち酢酸エチルで抽出可能なピークが苦味に関与すると考察されたため、これを分取し単離に成功した。各種機器分析の結果から、本物質をquercitrin(quercetin-3-rhamnoside)と同定した。quercitrinが単独では「えぐ味、収斂味」を呈したことより、ピーマンの苦味は本物質とピーマン特有香が関与していると考え、官能評価を定法により実施した。その結果、ピーマンの苦味の正体が「えぐ味、収斂味」とピーマン特有香に起因することを初めて明らかにした。

Capsicum annuum ,quercitrin, bitter

講演番号：4J14a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ J校舎14会場

タイトル　ニンジン香気の苦味に与える影響
Title　　Effect of carrot flavor on bitterness
○松嶋　みゆき、中野　優、久保田　紀久枝（お茶大院・ライフサイエンス）
○Miyuki Matsushima, Yu Nakano, Kikue Kubota (Ochadai)

【目的】ニンジンは日常的によく用いられる食材であるが、一方で嫌いな人が多い野菜でもある。その理由としては、ニンジン特有のにおいを苦手とする人が多いためであると言われている。おいしさは食品の重要な要素の1つであり、味や食感だけでなくにおいが大きく関係している。そこで、我々は以前から嫌われるニンジンのにおいを明らかにするため、日本ではニンジンを加熱して食すことが多いことよりニンジンの加熱香気特性を調べ、主要香気成分の探索を行ってきた。本研究では、ニンジン香気が味覚へ与える影響を明らかとすることを目的とし、ニンジン香気と苦味との関係を調べた。
【方法】最も多く市場で流通している5寸ニンジンの向陽2号を試料として用いた。上下2cmを切り落とし、皮をむき、2cmの輪切りにして25分間蒸し加熱を行った。フードプロセッサーで粉砕した後、エーテル抽出し、高真空蒸留(SAFE)で揮発性成分を分離した。さらに、シリカゲルクロマトグラフィーで炭化水素画分と含酸素画分に分離し、香気濃縮物を得た。GC、GC-MSで香気成分を分析するとともに、GC-Olfactometryを用いてAroma extract dilution analysis (AEDA)を行い、香気に寄与する成分を調べた。AEDAにより明らかとなった主要香気寄与成分について標準物質を用いて定量し、再構築液を調製した。さらに苦味呈味液を用い、主要香気成分の苦味へ及ぼす影響について官能評価を行った。
【結果】AEDAの結果から、14成分を選定した。加熱ニンジンの特有香に寄与する成分は主として、Octanal (citrus, fresh), Furfural (sweet, floral), 2-Methoxy-3-sec-butylpyrazine (clay, burdock), (E)-2-Nonenal (green), Furfuryl alcohol (burnt, fruity), 5-Methyl furfurylalcohol (sweet, oily), (E,E)-2,4-Decadienal (clay), Hexanoic acid (poultice, acid), γ-Octanolactone (sweet), β-Ionone (cedarwood), Benzothiazole (rubber), Phenol (dusty), Eugenol (spicy), Vanillin (vanilla)であることが明らかとなった。これらの成分を複数の組み合わせで苦味呈味液に付加したところ、ある成分の組み合わせにより苦味を増強する作用が見られた。現在、さらに詳細な検討を行っている。

carrot, bitterness,　flavor

講演番号：4J14a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ J校舎14会場

クロモジ精油の抗炎症作用

Anti-inflammatory effects of kuromoji (*Lindera umbellata*) essential oil.

○山崎真央、片方陽太郎、前多隼人（弘前大・農学生命科学）
○Mao Yamazaki, Yohtaro Katagata, Hayato Maeda (Hirosaki University)

【目的】炎症は細菌やウイルスの感染などの刺激反応に対応する重要な免疫反応である。一方で、リウマチやアテローム性硬化症、炎症性腸疾患などの多様な疾患の原因の一つでもある。炎症状態では、血液中のマクロファージをはじめとする免疫細胞が、窒素酸化物やIL-6、TNF-αのようなサイトカイン類を大量に発生させる。クロモジ（*Lindera umbellata*）は日本原産のクスノキ科の樹木で、その精油は化粧品や食品の香料に使用され、成分はLinalool、Geranyl acetateである。クロモジ精油は抗白血病、抗真菌、抗バクテリア活性を有することが報告されている。本研究ではマウス由来マクロファージ様細胞（RAW264.7）を用いて、クロモジ精油に含まれる成分による抗炎症効果を検討した。

【方法】RAW264.7細胞を前培養の後、LPS(lipopolysaccharide)0.1 mg/mlとクロモジ精油、Linalool、Geranyl acetateをそれぞれ25、50 μg/mlずつ添加した。24時間後に培地および細胞を回収した。クロモジ精油の細胞障害活性を調べるためにWST-1法を用いて測定した。炎症の指標となる培地のNO_2^-濃度をグリース法で測定した。IL-6, TNF-α,iNOS, COX-2のmRNA発現量の変化をreal-time RT-PCR法により評価した。細胞培養培地中の炎症性サイトカインであるIL-6とTNF-αの濃度は、ELISA法により測定した。また細胞内でのタンパク質発現量の変化をWestern Blot法で評価した。

【結果】クロモジ精油とその主成分は細胞の増殖に影響を与えなかった。LPSを添加したRAW264.7細胞はNO_2^-の培地中の濃度が約10倍に上昇した。一方、クロモジ精油、Linalool、Geranyl acetateを添加した細胞では、添加濃度に依存してその上昇を25～50％抑制した。またIL-6、iNOS、COX-2 mRNA発現量はクロモジ精油で約25～50%の抑制効果が確認できた。培地中のサイトカイン濃度もクロモジ精油添加細胞では添加濃度に依存して低下した。また細胞内に発現したCOX-2のタンパク質発現量の低下も減少が確認された。

【考察】クロモジ精油はLPS刺激によるRAW264.7細胞のNO_2^-の濃度の上昇を抑制し、炎症サイトカイン類のmRNAとタンパク質の発現を抑制した。またこれらのサイトカインの発現に関わるCOX-2などのタンパク質の抑制効果を示した。これらから、LinalooやGeranyl acetateを含有するクロモジ精油は抗炎症作用を有することが示された。

essential oil, raw264.7, inflammation

講演番号：4J14a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ J校舎14会場

タイトル　小松菜に含まれるネオキサンチンによる脂肪細胞での脂質代謝調節作用

Title　Komatsuna (*Brassica rapa* var. *peruviridis*) carotenoids improve lipid metabolism in adipocyte cells

○前多　隼人、阿部 美菜子、工藤　翔太、片方　陽太郎（弘前大学・農学生命科学）

○Hayato Maeda, Minako Abe, Shota Kudo , Yohtaro Katagata (Hirosaki univ.)

【目的】肥満により脂肪細胞が肥大化すると、インスリン抵抗性の惹起に関るアディポサイトカインが分泌される。食品に含まれるいくつかのカロテノイドは脂肪細胞の肥大化を抑え、アディポサイトカインの分泌を調節し、脂質代謝を調節することが報告されている。小松菜はアブラナ科に属する緑黄色野菜であり、その色素成分には多くのカロテノイドが含まれる。本研究では小松菜に含まれるカロテノイドによる脂肪細胞での脂質代謝、糖代謝調節作用について、マウス由来3T3-L1脂肪細胞を用い検討した。

【方法】小松菜(東京都江戸川区産)からアセトンにて色素成分を抽出した後、カラムクロマトグラフィーにより分画し、3T3-L1前駆脂肪細胞に添加した。脂肪細胞の分化に与える効果をGPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)活性にて評価した。又、特に強い効果を示した画分に含まれる色素の同定をおこなった。更に、脂肪細胞から分泌されるインスリン抵抗性の惹起に関るレジスチンや、MCP-1(monocyto chemotactic protein 1)などのアディポサイトカインのmRNAの発現量の変化を、定量RT-PCR法にて測定した。又、培地中のタンパク質濃度をELISA法で測定した。更に肥満による脂肪細胞での慢性炎症状態のモデルである、3T3-L1脂肪細胞とマウス由来RAW264.7マクロファージ様細胞の共培養系を用いて、肥満状態における脂肪細胞での炎症に対する抑制効果について評価した。

【結果】小松菜色素成分を25,50,100 μg/mlの濃度で分化誘導培地に添加し、3T3-L1前駆脂肪細胞を培養したところ、添加濃度依存的に脂肪蓄積が抑えられた。次いで小松菜色素を分画し、同様に培養した結果、キサントフィルであるネオキサンチンを多く含む画分で強い活性を示した。このことから、小松菜に含有するネオキサンチンが脂肪蓄積を強く抑制する成分であることが示唆された。また、分化脂肪細胞にネオキサンチンを1,5,10 μM添加した細胞ではレジスチン、MCP-1の発現量が抑えられた。その効果は、ネオキサンチンと同様にアレン構造を持つキサントフィルであるフコキサンチンと同程度であった。更にネオキサンチンは共培養系において、脂肪細胞での慢性炎症状態に関るTNF-αやIL-6のmRNAの発現を抑えた。これらのことから小松菜に含まれるネオキサンチンは、アディポサイトカインの分泌を調節し、脂肪細胞での慢性炎症状態改善作用を示す食品成分であることが示唆された。

謝辞：本研究は、江戸川区（東京都）、江戸川区農業経営者クラブ、江戸川花卉園芸組合との共同研究「えどがわ産農産物のブランド化に関する研究」で行われたものです。

carotenoid, adipocyte, adipocytokine

講演番号：4J14a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ J校舎14会場

サツマイモ高カロテン品種「兼六」の干しいも加工品の成分と抗酸化性について

Studies on components and antioxidative activities of dried slices of high carotenoid-content sweet potato “Kenroku”.

○岩崎 由佳[1]、森光 康次郎[1,2]、久保田 紀久枝[1,2]、梅本 英之[3]、渡部 舞[3]、池下 洋一[3]（[1]お茶大・食物栄養、[2]お茶大院・ライフ、[3]石川農研セ）

○Yuka Iwasaki[1], Yasujiro Morimitsu[1,2], Kikue Kubota[1,2], Hideyuki Umemoto[3], Mai Watanabe[3], Yoichi Ikeshita[3] ([1]Ocha Univ., [2]Ocha Univ. Graduate School, [3]Ishikawa agricultural research center)

【目的】「兼六」は戦前に石川県で選抜・育成された高カロテンのサツマイモ品種である。塊根が小さく肉質が粘質のため青果用品種としては普及しなかった。しかし、干しいもに加工すると鮮やかなオレンジ色に仕上がり、甘味が強く「シロタ」と呼ばれる品質障害が起きにくいことも明らかとなった。そこで、本研究では「兼六」の干しいも加工に伴う成分変化と抗酸化性に関して検討した。

【方法】「兼六」を含む6品種のサツマイモを干しいもに加工した。色素をエタノールで摩砕抽出後けん化し、ヘキサン-酢酸エチル混液を用いてβ-カロテンを抽出した。溶媒留去後エタノールに溶解し、455nmにてHPLC分析を行った。アスコルビン酸含量はヒドラジン法で分析した。抗酸化活性はDPPHラジカル消去活性にて測定した。

【結果】「兼六」は干しいも用一般品種よりもβ-カロテンを多く含み、他の高カロテン品種に匹敵した。生いもではアスコルビン酸含量の差は小さかったが、干しいもに加工すると高カロテン品種の方が高いアスコルビン酸残存量を示した。DPPHラジカル消去活性は、干しいも用品種より「兼六」の方が高かったが、他の高カロテン品種に比べ低かった。現在、他の抗酸化成分の分析と、カロテノイド系抗酸化物質を対象とした抗酸化能測定法であるSOAC（一重項酸素消去活性）の測定を進めている。

sweet potato, carotenoid, antioxidant

講演番号：4J14a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ J校舎14会場

ルテインに対するマウス肝臓の代謝活性

Metabolic activity of mouse liver preparation on lutein

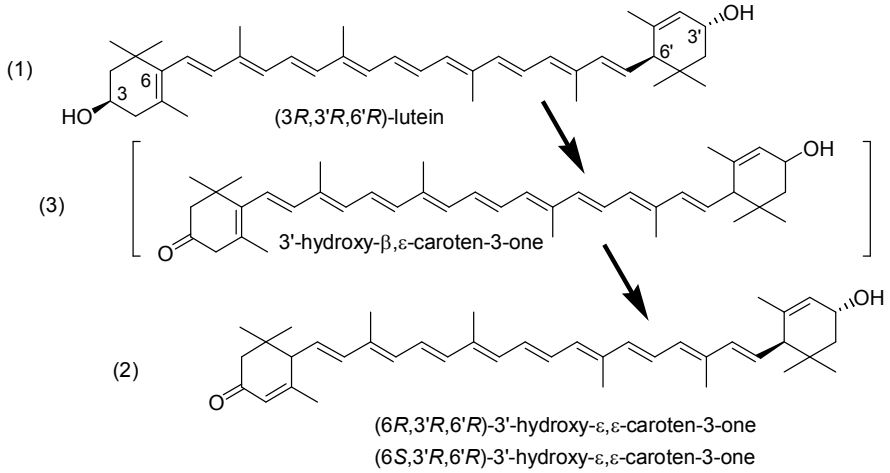
○長尾 昭彦、眞岡孝至[1]、小竹 英一、小野 裕嗣、亀山 眞由美（農研機構・食総研、[1]生産開発科学研）

○Akihiko Nagao, Takashi Maoka[1], Eiichi Kotake-Nara, Hiroshi Ono, Mayumi Ohnishi-Kameyama (NFRI/NARO, [1]SEIKEN)

【目的】演者らはこれまでにルテインやフコキサンチンなどのキサントフィルをマウスへ投与すると酸化的代謝産物が組織に蓄積すること，また，肝臓ホモジネートが酸化的代謝活性をもつことを明らかにし，哺乳類においてキサントフィルが活発に代謝変換されることを報告した[1,2]。本研究では，さらに，ルテインの代謝反応産物の構造を解析し，酸化的代謝機構を検討した。

【方法】ルテインとマウス肝臓ホモジネートを補酵素NAD存在下で37℃で数時間インキュベーションし，ルテイン反応産物を生成させた。反応液の抽出物からTLCやHPLCにより反応産物を分離精製した。単離した反応産物について，高分解能MS，NMR，CDスペクトル等から反応産物の構造を解析した。

【結果】マウス肝臓ホモジネートとルテイン（１）を補酵素NAD存在下でインキュベーションすると3’-hydroxy-ε,ε-caroten-3-one（２）が生成した。分離精製したこのケトカロテノイドのCDスペクトルからその立体化学を確認したところ，3’位と6’位の絶対配置が*R*，6位は*R*と*S*のジアステレオマー混合物であることが分かった。すなわち，ルテインのε環の立体配置は保持されていたが，新たな不斉点である6位には立体選択性はなかった。一方，ルテインと肝臓ホモジネートの反応初期において生成量が極大となる未知物質を見いだした。この反応中間体と考えられる物質は，NMRスペクトル等の解析から3’-hydroxy-β,ε-caroten-3-one（３）と同定した。これらのことから，ルテイン（１）から3’-hydroxy-ε,ε-caroten-3-one（２）への変換は，ルテインのβ環における3位の水酸基の酸化とその後の5位の二重結合の移動によって起きるものと考えられた。



1) *Drug Metab. Dispos.* **32**(2), 205-211 (2004). 2) *J. Nutr.* **140**(10), 1824-1831 (2010).

keto-carotenoid, lutein, metabolism

講演番号：4J14a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ J校舎14会場

デルフィニジンの廃用性筋萎縮抑制作用とその作用機序

Suppressive effect of delphinidin on disuse muscle atrophy in mice

○村田 希、高坂 玲亜、栗原 佳奈、山田 耕路、立花 宏文
(九大院農院・生機科)
○Motoki Murata, Reia Kousaka, Kana Kurihara, Koji Yamada, Hirofumi Tachibana
(Kyushu Univ.)

【目的】骨格筋は加齢や寝たきり等によって萎縮し、身体的な活動に悪影響を及ぼす。また、筋力が低下すると疲労抵抗性が低下することからも、筋萎縮を防ぐことは重要である。骨格筋の構成タンパク質を分解する経路の一つにユビキチン・プロテアソーム経路があり、ユビキチンリガーゼの一種であるMuRF1が筋萎縮原因遺伝子として注目されている。我々はこれまでに、骨格筋培養細胞系において、デルフィニジンがデキサメタゾン誘導性MuRF1の発現量上昇を抑制することを見出している。そこで本研究では、廃用性筋萎縮モデルマウスにおけるデルフィニジンの経口投与効果について検討した。
【方法】C57BL/6雄性マウス（12週齢）を平均体重が等しくなるように4群に群分けし、それぞれ、尾懸垂無し群（Ground群)、尾懸垂群（コントロール群)、尾懸垂を行いデルフィニジン0.1 mgを経口投与した群（尾懸垂-0.1 Del群)、尾懸垂を行いデルフィニジン0.5 mgを経口投与した群（尾懸垂-0.5 Del群）とした。尾懸垂試験は 10日間行い筋萎縮を誘導した。尾懸垂実施の一週間前及び尾懸垂試験中、Ground群とコントロール群には水を、尾懸垂-0.1 Del群と尾懸垂-0.5 Del群には、デルフィニジンの量がそれぞれ 0.1もしくは0.5 mg/day/miceとなるよう、胃内に強制投与した。尾懸垂終了後、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、大腿四頭筋を摘出し、各重量を測定した。また、大腿四頭筋からタンパク質および RNAを抽出し、筋萎縮関連分子の発現に対する影響を解析した。
【結果】Ground群に比べコントロール群で、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、大腿四頭筋の各重量が低下しており、尾懸垂による筋萎縮の誘導が確認された。コントロール群との比較において、尾懸垂-0.5 Del群で大腿四頭筋の重量低下が抑制されていた。また、ストレスや疲労に関連する遺伝子をフォーカスしたDNAチップなどを用いた解析から、尾懸垂群においてMuRF1やCbl-bなどのユビキチンリガーゼ、SOD1などの酸化ストレス関連遺伝子の発現が増加すること、また、こうした遺伝子の発現上昇がデルフィニジン投与群において抑制されることを見出した。以上の結果より、デルフィニジンの経口摂取は筋萎縮原因遺伝子MuRF1や酸化ストレス関連遺伝子の発現上昇を抑制することで、廃用性筋萎縮を抑制する可能性が示された。

Delphinidin, Disuse muscle atrophy, MuRF1

講演番号：4J14a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ J校舎14会場

カテキンとアミノ酸の加熱反応により生成される黄色物質について

Yellow Pigments Formed by the Reaction between Catechin and Amino Acids under Heating

○野澤 幸恵、神山 紀子[1]、村田 容常（お茶大院・ライフサイエンス、[1]農研機構・作物研）
○Sachie Nozawa, Noriko Kohyama[1], and Masatsune Murata (Ochanomizu Univ., [1]NICS)

【目的】大麦などカテキンを含む食品は加熱した際に褐変することが知られていて、その原因として(+)-カテキンの自動酸化が考えられている。(+)-カテキン水溶液に様々なアミノ酸を添加し加熱したところ、グリシン添加時に褐変が抑制されるとともに、特異的な黄色化合物が生成された。本研究では、この黄色化合物を単離・精製し、同定することとした。
【方法・結果】終濃度 0.1 mg/ml (+)-カテキンおよび 1.0 mg/ml アミノ酸となるように 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、90℃・60 min で加熱した。グリシンを添加することで、グリシン無添加に比べ吸光度（450 nm付近）が6割程度減少し、反応液の褐変が抑えられた。この反応液を DAD-HPLC（カラム；ODS、検出波長；250～450 nm）に供し分析したところ、カテキンのみで加熱した場合には認められなかった4つの特異的なピーク（G1～G4）の生成が認められた。これらの化合物は、全て 350 nm に極大吸収を示す物質であった。

G1～G4の pH 安定性を調べるために、反応液を様々な pH に調整後、室温で 48 h 放置し、各ピークの残存率を測定した。その結果、これらの化合物は中性において安定だったが、酸性・塩基性においては著しく減少し不安定であった。また、反応液を減圧乾固することにより、乾固しない場合に比べ残存率が2割程度減少した。G1～G4の生成条件を検討した結果、これらの化合物は、酸性条件下では生成されず、リン酸ナトリウム緩衝液（pH 8.5）の条件下で最も多く生成された。

これらの黄色物質を単離・精製するために、終濃度 0.1 mg/ml (+)-カテキン、1.0 mg/ml グリシン、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 8.5）の反応液 6 L を 90℃・60 min で加熱した。この反応液を冷却後、ODSオープンカラム（展開溶媒；水→ 水/MeOH → MeOH）にかけ、分画した。得られたG1～G4を含む水溶出画分を減圧濃縮後、YMC-Pack R&D ODS-A（溶離液；0.1 % ギ酸水溶液 ： 0.1 % ギ酸 MeOH 溶液 = 60:40）にかけ、G1～G4をそれぞれ分取した。ただちに pH 7 に調整後、減圧濃縮し、さらにSep-Pak C18 カートリッジで固相抽出し精製した。得られた各化合物の収量は(+)-カテキン換算でそれぞれ、G1；約 2 mg、G2；約 2 mg、G3；約 1 mg、G4；約 1 mgであった。精製したG1～G4は、350 nm に極大吸収を示し、400 nm 付近まで吸収を示す黄色物質であり、水ならびに MeOH に可溶な物質であった。 LC-MS 分析した結果、G1, G2の分子量は643、G3, G4の分子量は647と推定された。現在、機器分析によって構造を解析中である。

(+)-catechin, glycine, browning

講演番号：4J15a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ J校舎15会場

味噌汁調理におけるフランの生成と濃度変化

Furan formation in miso soup cooking

○箭田　浩士、亀山　眞由美（(独）農研機構・食総研）
○Hiroshi Yada, Mayumi Ohnishi-Kameyama (NARO/NFRI)

【目的】調理や加熱加工によって、食品中にヒトの健康に悪影響を与える成分が生じることがある。フランはヒトに対して発がんの可能性が疑われている高揮発性の有機化合物である。缶詰や瓶詰等の密閉状態で加熱殺菌される食品にフランを高含有するものが見いだされ、現在では、広範囲の加工食品や調理品に含まれていることが明らかになっている。我々はマーケットバスケット方式のトータルダイエットスタディにより日本人のフラン摂取量を調べ、調味料・香辛料類と嗜好飲料類の寄与率が全体の 70%であること、調味料・香辛料類でフランを高含有する代表的な食品は醤油、醤油加工品、味噌であることを明らかにしている。これまでの研究過程において、味噌等の高フラン含有食品を 100℃以下の温度で加熱することによって、新たにフランが生成されることを確認した。そこで、フラン生成に影響を与える調理条件ならびに調理した味噌からヒトが摂取するフラン量を推定する為の基礎的な情報を得ることを目的として、味噌汁調理におけるフランの生成と濃度変化を調べた。
【方法】調理には、通常の鍋、または通常の鍋よりも密閉性と保温性の高い保温調理器具を用いた。味噌は無添加味噌（48g:4人分)、ダシ入り味噌(48g)、またはダシ入り液体味噌(72g)を用い、具は豆腐(300g)または油揚げ(80g)とした。IH調理器具により鍋のRO水(600mL)を加熱し、沸騰後に粉末ダシ（4g:無添加味噌の場合）と具を加え、味噌を溶き入れて一煮立ちして完成とした。完成後、鍋に蓋をした場合としない場合で30分間の静置(保温)と再加熱（温め直し）を2回繰り返し、それぞれの操作後に汁の一部を気密バイアルにサンプリングした。気密バイアルに重水素標識フランを添加した後、ヘッドスペース注入装置（HS）で40℃30分間保温した後、GC/MSで分析した。各サンプリング数は4点として、その平均値からフラン濃度を算出した。
【結果】味噌を水に溶いただけの対照試料のフラン濃度を100%とすると、通常の鍋で調理した味噌汁のフラン濃度は完成直後に平均で66%（暫定値、以下同）であり、蓋をしないで30分間静置すると50%へと減少したが、蓋をした場合は76%へと増加した。また密閉性の高い保温調理器具を用いた場合、完成直後のフラン濃度は平均で62%であったが、30分間静置(保温)すると101%へと増加した。一方、30分間の静置と再加熱を2回繰り返した味噌汁中のフラン濃度は、通常の鍋では蓋の有無にかかわらず60%台に留まったが、保温調理器具を用いると127%へと増加した。
以上の結果から、味噌汁では調理から摂食するまでの保温や再加熱によってフランが新たに生成して、フラン濃度が影響を受けることが明らかになった。調理から摂食するまでの条件によっては、元の味噌に含まれている以上のフラン量を摂取する可能性も考えられた。今後実験数を増やして、調理方法によるフランの変化の程度を確定し、摂取量の変動を推定する予定である。

furan, miso, cooking

講演番号：4J15a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ J校舎15会場

タイトル　水素によるマグロのメト化抑制効果

Title Efficacy of Hydrogen on the Reduction of Metmyoglobin Formation in Tuna Flesh

○タナットアクソン　パリヤ、鈴木　徹[1]、大河内　正一（法政大・生命科、[1]海洋大・食品科）

○Pariya Thanatuksorn, Toru Suzuki[1], Shoichi Okouchi (Hoseidai, [1]Kaiyodai)

【目的】Recently basic and clinical research has revealed that hydrogen has an ability to be the antioxidant and reduces the oxidative stress from aging. We hypothesize that hydrogen may be able to preserve the freshness and improve the quality of food. The discoloration of meat from red to brown during storage results from the myoglobin oxidation. Therefore, the objective of this study is to investigate the possibility of using hydrogen in various forms to minimize discoloration in raw tuna flesh during storage.

【方法】Tuna flesh was treated with hydrogen by immersing in water directly dissolving hydrogen gas and by storing in mixture of hydrogen gas and air. In order to control the amount of oxygen, nitrogen gas was used as the control. Tuna flesh was immersed in hydrogen-rich water and then storage at 2° C for 7 days. In the case of applying the mixture of gas, sample was stored in the gas barrier bag at 2° C until the color stability and metmyoglobin reducing activity was observed. The color stability and metmyoglobin reducing activity of tuna flesh was observed by reflectance measurement during storage.

【結果】In the early storage time, the sample treated with hydrogen-rich water has higher metmyoglobin reducing activity than control, but the color stability of both samples are not different. On the other hand, the metmyoglobin reducing activity of the sample treated with hydrogen had a tendency to higher than that of control gas (nitrogen and air) as the prolonged period of storage. This suggested that molecular hydrogen has possibility to improve the metmyoglobin reducing activity in tuna flesh.

Hydrogen, Tuna flesh, Metmyoglobin

講演番号：4J15a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ J校舎15会場

赤外および近赤外分光法による食用油脂の過酸化物価の測定

Measurement of peroxide value of edible oil with infrared and near infrared spectroscopy

○山下まゆ美，岡本由希，飯渕貞明（和洋女大・生活科学）
○Mayumi Yamashita, Yuki Okamoto, Sadaaki Iibuchi （Wayo Women’s University）

【目的】油脂や油脂が多く含まれている加工食品は，その取り扱いが悪いと油脂が酸化して，品質が劣化する．油脂の酸化の程度を知ることは，油脂が多く使われている加工食品などのシェルフライフを決定する上で重要な課題であると考えられる．一般に，油脂の酸化の程度は過酸化物価を指標として用いられることが多いが，測定するためには多量の化学薬品を必要とし，滴定操作が煩雑で手間がかかるため，リアルタイムで過酸化物価の情報を得ることが難しく，試料の連続性が保てない．そこで本研究では，近赤外分光法を用いて常温で液体の食用油脂の酸化の程度を非破壊測定することを目的とした．さらに，赤外領域の波長も用いて，酸化の程度と波長との関連について検討することにした．
【方法】試料には，一般に市販されているゴマ油（かどや製油社製），グレープシード油（Aarhus Karlshamn社製），オリーブ油（BOSCO社製），コメ油（ジャパンライス社製），サラダ油（日清オイリオグループ社製）を用いた．それぞれの油を小型シャーレ（直径20mm，高さ16mm）に入れ，紫外線照射装置により紫外線を強制的に照射して，油脂を酸化させ，経時的にサンプリングを行った．近赤外分光法は，近赤外分光装置（Carl Zeiss社製，波長領域950～1700nm）を用いて，プローブから出る光を直接試料に照射して反射光の測定を行った．なお，リファレンスには白色セラミック板を用いた．測定によって得られたスペクトルRの逆数の対数log（1/R）の2次微分値を求めた．同時に，Wheelerの変法を用い，滴定法により過酸化物価の測定を行った．そして，得られた2次微分スペクトルと滴定によって測定した油脂の過酸化物価の値が対応している波長を検索した．さらに，同じサンプルについて赤外領域における測定も行ない，解析を行って油脂の過酸化物価と対応している波長領域の検索を行った．
【結果】近赤外分光法による測定によって得られたスペクトルの2次微分値を用いることで，試料とした液体の食用油脂の過酸化物価を推定する回帰式が得られた．この回帰式は，食用油脂の種類が異なっても適用することがほぼ可能であった．このことから，近赤外分光法により，サンプルの連続性を保ったまま，食用油脂の過酸化物価の測定を行うことが可能であることが示された．また，赤外領域についても検討を行った結果，過酸化物価を示していると考えられる波長領域を検索することができた．選択された波長領域は油脂の化学構造に関連する何らかの物質の帰属を示しており，過酸化物価を直接反映しているものと考えられた．今後は，実用上必要である油脂の酸化の初期段階の過酸化物価の小さい値についても検討したいと考えている．また，液体の食用油脂だけではなく，油脂が多く含まれる固形の加工食品などについても，過酸化物価の非破壊測定法を応用できればと考えている．

infrared and near infrared spectroscopy, peroxide value, edible oil

講演番号：4J15a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ J校舎15会場

凍結・融解を経たリモネン含有O/W型エマルションの安定性

Stability of O/W emulsion with limonene through freezing and thawing

○河野　祐輔，日野原　知行，渡邉　義之，野村　正人（近畿大院・システム工）
○Yusuke Kono, Tomoyuki Hinohara, Yoshiyuki Watanabe, Masato Nomura (Kinkidai)

【目的】柑橘類果皮などから搾取されるリモネンなどのテルペン類は，食品や化粧品など様々な製品においてフレーバーおよびフレグランス材料として利用されている．その利用形態の一つとして，熱力学的に準安定な分散系であるエマルションがあるが，長期保存中に分散粒子間の相互作用などによる乳化不安定化が生じ品質劣化を起こす．また，低温で保存されることが多いため，油相成分の結晶化過程で生ずる部分的合一がエマルションの不安定化を引き起こすとされている．さらに，系内にフレーバー成分が含まれる場合にはこれらの酸化やオフフレーバー化が進行する．そこで本研究では，O/W型フレーバーエマルションについて，凍結および融解を経た際の乳化安定性やフレーバー成分の安定性について検討した．

【方法】フレーバー成分としてリモネンを用いた．10%(v/v)リモネンおよび90%(v/v)直鎖アルカン（炭素数12から18）から成る油相と1%(w/v)乳化剤を含む水相を混合し，ローター／ステーター式ホモジナイザーによる予備乳化後，親水性セルロースアセテート膜を用いた膜乳化にてO/W型エマルションを調製した．乳化剤にはドデシル硫酸ナトリウム（SDS），デカグリセリンモノラウリン酸エステル（ML-750），Tween20またはTween80を用いた．エマルションを-20℃または-80℃にて冷却し，その後10℃または30℃で融解させた．凍結前と融解後の油滴平均粒子径を測定した．また，調製したエマルションを37℃にて保存し，油滴平均粒子径およびリモネン残存量の経時変化を遠心式粒度分布測定装置およびGCにて測定した．

【結果】乳化剤の種類により，凍結・融解後の油滴平均粒子径の変化量に顕著な差異は認められなかった．油相に使用したアルカンの炭素数が少ないほど，油滴平均粒子径の変化量が小さくなる傾向が示された（Fig. 1）．リモネン，アルカンおよび水の凝固点・融点と冷却・加熱温度との関係がエマルション中の油滴粒子の安定性に影響することが示唆された．また，エマルションを37℃にて3週間保存した結果，油滴平均粒子径およびリモネン残存量はオクタデカンを用いた場合に最も高い安定性を示した．

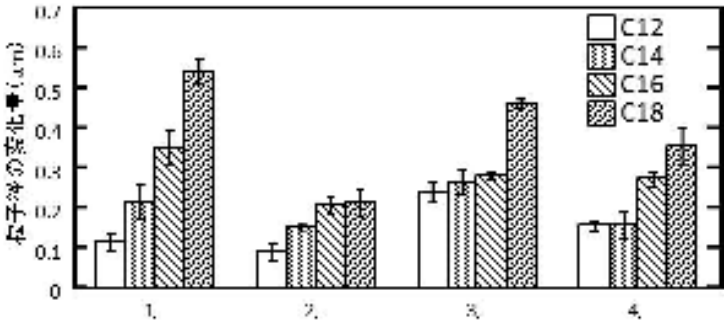


Fig.1 凍結・融解後のアルカンを含有した油滴粒子径変化量
1. -80℃凍結・10℃融解　2. -80℃凍結・30℃融解
3. -20℃凍結・10℃融解　4. -20℃凍結・30℃融解

本研究は，平成23年度財団法人旗影会研究助成の支援により実施された．

freezing and thawing, limonene, O/W emulsion

講演番号：4J15a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ J校舎15会場

新規大豆アレルゲン PM30 のクローニングと変動解析

Cloning and characterization of novel soybean food allergen PM30.

○末森祐輔、矢野えりか、吉村征宏、財満信宏、等々力節子[1]、森山達哉、河村幸雄（近畿大院・農、[1]食総研）

○Yusuke Suemori, Erika Yano, Yukihiro Yosimura, Nobuhiro Zaima, Setsuko Todoriki[1], Tatsuya Moriyama, Yukio Kawamura （Kinki Univ, [1] NFRI）

【目的】

大豆は良質なタンパク質を豊富に含んでおり、栄養価も高く加工特性や生理機能性にも優れていることから、多種多様な加工食品に広く利用されている。しかしながら、大豆には他のタンパク質食品同様にアレルギーを引き起こすアレルゲンが存在している。また最近は、花粉症との交差反応性が関与する大豆アレルギーも知られている。そこで本研究では、大豆及び大豆加工食品のアレルゲン性評価に資するため、近年報告された新規大豆アレルゲンである Seed maturation protein PM30（PM30）（late embryogenesis abundant（LEA)タンパク質のグループⅢに属する）の cDNA をクローニングし、発現及び抗体作成を行い、その検出法の確立と虫害被害やガンマ線照射などによる変動解析を行った。

【方法】

大豆葉由来 cDNA ライブラリーをテンプレートにして本遺伝子 cDNA を PCR にて取得し T/A クローニングした後、発現ベクターである pET-30 Xa/Lic にサブクローニングし、His タグ融合タンパク質として発現用大腸菌 SHuffle を用いて可溶性状態にて発現させた。このリコビナント PM30(rPM30)をキレートカラム等を用いて精製し、モルモットに免疫し、抗血清を得た。得られた抗体を用いて様々な大豆品種や大豆加工食品及び、虫害被害を受けた大豆やガンマ線照射大豆における本アレルゲンを検出し存在形態の確認や変動解析を行った。

【結果】

PCRクローニングによって、PM30をコードするcDNAを単離した。大腸菌にて発現させ、精製したrPM30は、PM30反応大豆アレルギー患者血清IgEと反応した。モルモットから得られた抗rPM30抗血清の反応特異性を確認したところ、大豆中の18kDaのPM30と思われる分子を特異的に検出することが確認できた。この抗血清を用いて種々の大豆加工食品中の本アレルゲンレベルを相対比較したところ、加工食品の種別間のみならず、製品間でも含有量に差があった。また、虫害被害を受けた大豆では、PM30の存在量が有意に減少していた。一方、照射殺菌のモデル系としてのガンマ線照射処理（固形条件下）では30kGyまでの照射でも大きな変動は見られず、むしろ低減化される傾向が見られた。液体条件での照射では有意に低減化していた。現在は、マウスを用いて本アレルゲンの経口摂取による血中移行、感作能（特異的IgE・IgG産生能）を解析し、本分子のアレルゲン性について検討している。

PM30、Soybean、Allergen

講演番号：4J15a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ J校舎15会場

ウム試験を用いた食品化合物の変異原性評価

Mutagenic evaluation of dietary components using *umu* test

○森大気、三木悠[1]、松井 悠紀[1]、室井 康平[1]、後藤 達志、今石 浩正
(神戸大・遺伝子セ、[1]神戸大・生機科)
○Taiki Mori, Haruka Miki[1], Yuuki Matsui[1], Kouhei Muroi[1], Tatsushi Goto, Hiromasa Imaishi
(Res. Cent. Env. Gen., Kobe Univ., [1]Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ.)

【目的】近年、食品成分や食品添加物、残留農薬などのヒトに対する安全性への関心が高まっている。特に、食品添加物や残留農薬の安全性への関心は高く、これらの化学物質に対する安全性評価の研究例は多い。しかしながら、天然物や自然食品の安全性評価に関する報告は少ない。これまでの研究においても、キャベツやコーヒーなどの食品中には発ガン性を示す化合物が存在することが明らかとなっていることから、多種多様な食品化合物についての安全性評価研究は重要であると考えられる。そこで本研究では、ラットあるいはヒト薬物代謝酵素を用いた短期変異原性試験（ウム試験）を用いて、100種類の食品化合物が示す変異原性を評価することにより、食品の安全性に関する知見を得ることを目的とした。
【方法】96穴マイクロプレートに終濃度（0-10 mM）の食品化合物（ポリフェノール類、テルペン類、アルカロイド類、カロテノイド類、フラノクマリン類、イソチオシアネート類、アスタキサンチン類）を加えた後、ラット肝S9画分を添加または非添加後のサルモネラ菌培養液を加え、37 ℃で2時間インキュベーションした。次に、発色基質としてX-galを添加した後、これらの反応液を37 ℃で1時間インキュベーションした。各食品化合物により誘起されるサルモネラ菌のSOS応答により生じたβ-ガラクトシダーゼ活性は、各サンプルの630 nmにおける吸光度を測定することで求めた。
【結果・考察】100種類の食品化合物についてウム試験を行った結果、一部のテルペン類（メチルオイゲノール、エストラゴール）、フラノクマリン類（ベルガプテン、キサントトキシン）、アルカロイド類（カプサイシン）、アルデヒド類（シンナムアルデヒド）、有機酸（4-ヒロドキシ安息香酸）において0.5－10 mMの濃度条件下で変異原性が観察された。また、28種類の食品化合物は、ラット肝S9画分中の薬物代謝酵素により初めて代謝活性化され、SOS応答誘導能が増加することが明らかになった。代謝活性化される食品化合物には、薬物代謝酵素により水酸化される際にエポキシ体を介することが推定されている5種類の化合物が含まれていた。一方、10種類の食品化合物は、薬物代謝酵素によって解毒代謝され、SOS応答誘導能が低下することが明らかになった。特に、ラットS9存在下において2種のフラノクマリン類がともにSOS応答を低下させたことは、クマリン骨格を有する化合物が薬物代謝酵素による代謝を受けて解毒されることを示唆している。現在、大腸菌に異種発現させたヒトのシトクロムP450をラット肝S9の代わりに用いることで、食品由来成分の代謝活性化に関与するヒトCYP分子種の解析を進めている。

Keyword1 Food compound, Keyword2 mutagenicity, Keyword3 umu test

講演番号：4J15a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ J校舎15会場

SPRセンサーによる食中毒細菌の一斉迅速検査法の開発

Development of a Rapid and Simultaneous Detection Method of Food Poisoning Bacteria using SPR

○張 暁光[1]、北岡 勇人[1]、本城 賢一[2]、宮本 敬久[2]（[1]九大院・生資環、[2]九大院・農院）
○Xiaoguang Zhang[1], Hayato Kitaoka[1], Ken-ichi Honjoh[2], Takahisa Miyamoto[2] ([1,2] Kyushudai)

【目的】衛生環境が改善されている近年においても、食中毒事件の発生は後を絶たず、食品の安全な供給、食中毒事件拡大防止のためには食品の微生物学的な品質保証が必須であり、食中毒細菌検出技術の向上は最も重要な要素の一つである。従来の食品の食中毒細菌検査は増菌および選択培養を行うため、長時間を要する。さらに、検査法も検出対象菌ごとに異なり煩雑であるため、簡易迅速な検査法の開発が求められている。そこで、本研究では、主要食中毒細菌の簡易迅速な同時検出を目的とし、*Escherichia coli* O157:H7 (O157)、*Salmonella* Enteritidis (SE) および *Listeria monocytogenes* (LM) の3菌種の一斉培養および表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーによる同時検出法の開発を行った。
【方法】細菌の一斉培養には、我々の研究室で開発したSimultaneous Enrichment Broth (SEB) を用いた。SPRセンサーによる検査条件の検討では、各細菌を超音波破砕処理後、破砕液の全液、破砕液の遠心分離上清および沈殿を種々の割合で混合したものを測定試料として用いた。測定は、市販のポリクローナル抗体を固定化したチップを用いてBiacore®J（GE Healthcare）により行った。
【結果】

SPRによる3菌種同時検出のための前処理について検討した結果、超音波破砕した場合でも、破砕液全液、遠心分離上清と沈殿について測定すると菌種によって検出感度が異なり、又、非特異的シグナルも検出されたため、破砕全液、上清および沈殿について試験を行った。破砕全液を試料とした場合、単独で測定するとO157は10^5 cfu/ml、SEは10^5 cfu/ml、LMは10^6 cfu/mlを検出可能であった。混合系では、O157は、10^8cfu/mlのSEおよびLM共存下で10^6 cfu/mlを検出できた。SEは、同程度のO157およびLM共存下では10^5 cfu/mlを検出できたが、1000倍量共存した場合には特異的な検出は困難であった。LMは、同程度のO157およびSE共存下では10^6 cfu/mlを検出できたが、10^8cfu/mlのO157およびSE共存下では特異的な検出は困難であった。破砕液の遠心分離沈殿を試料とした場合、単独で測定するとO157は10^5 cfu/ml、SEは10^6 cfu/ml、LMは10^7 cfu/mlを検出可能で、全液を試料とした場合に比べ若干感度が低下した。混合系では、O157は、10^8cfu/mlのSEおよびLM共存下でも10^6 cfu/mlを検出できた。SEは、同程度のO157およびLM共存下では10^6 cfu/mlを検出できたが、100倍量共存した場合には特異的な検出は困難であった。LMは、10倍量のO157およびSE共存下でも10^7 cfu/mlを検出可能であった。遠心分離上清についても検討している。

現在、3菌種のSPRによる検出に最適なモノクローナル抗体も作製中である。SEBの培養条件や最適な前処理法の検討結果をもとに、食品中からの3菌種の食中毒細菌のマルチチャンネルSPRセンサーによる同時検出法を構築する予定である。

Simultaneous detection, Food poisoning bacteria, SPR

講演番号：4J15a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ J校舎15会場

土壌および用水中に混入した大腸菌の生存性

Fate of the *E. coli* contaminated into soil or irrigation water

○稲津康弘、大畑由紀子、川崎晋（農研機構・食総研）
○Yasuhiro Inatsu Yukiko Ohata, Susumu Kawasaki (NFRI-NARO)

【目的】

生野菜に起因する腸管系食中毒菌による食中毒が国内外で問題となっている。これらの菌は家畜糞便に由来し、農業資材あるいは用水を経由して圃場に持ち込まれる可能性がある。適正農業規範（GAP）推進の観点から、我々は今後、生産環境の食中毒菌汚染実態調査を行う予定である。その際、研究資源が不十分な発展途上国において、収集された検体の保存状況がどの程度、結果に影響を与えうるのか知るために、以下の研究を行った。

【方法】

市販肉類および野菜類（計152検体）から異なったRAPD-PCRパターンを示す大腸菌を39株分離した。これらのうち18株を培養後、地下水にて洗浄・懸濁したものを接種菌として使用した。土壌（4種類）はつくば市内の異なった地域で採取したものを用いた。大腸菌を接種した土壌（100g）またはこれを5%含む地下水（100mL）を2011年7月～9月の期間、屋外（室温27-33℃）に放置した。定期的にColiform Agar（Merck）を用いた寒天平板希釈法またはコリラート（日水製薬）を用いたMPN法で大腸菌の生菌数を測定した。土壌のpHおよび水分含量は土壌用水分pH計を用いて測定した。全ての実験は2連3反復で行った。

【結果】

実験に使用した土壌のpHおよび水分含量はそれぞれ6.2-6.6および14-31%の範囲であり、4種類の土壌(A,B,C,D)の間に有意な差はなかった。土壌を含む水中に接種した大腸菌（6.5 log CFU/mL）の生菌数は、4週間で4.1(D)，3.5(A,B)および1.8(C)log CFU/gほど低下した。同じ土壌に接種した大腸菌（6.3 log CFU/mL）の生菌数は1.7-2.1(A,B,D)および1.3(C)log CFU/gであり、土壌水中よりも土壌単体中の方が、有意に菌が死滅しにくかった。初発の大腸菌濃度が3-5 log CFU/gの範囲では、4週間後の土壌中の大腸菌濃度の減少幅と初発濃度との間に明確な関係はみられず、4週間の貯蔵で0.5(C)-2.9(A)log CFU/gの生菌数の減少がみられた。以上の結果より、土壌検体および土壌混入用水の検体を夏の外気温下で1週間以上放置すると、土壌の種類によっては無視できないレベルの生菌数の減少が生じる可能性があることが明らかとされたため、収集された試料は可能な限り速やかに分析に供する必要があることが示唆された。

E. coli, soil, survival

講演番号：4J15a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ J校舎15会場

微生物熱量計による食品の一般生菌数と大腸菌群数の推定

Estimation of standard plate count (SPC) and coliform bacteria count in foods using microbial calorimetry

○宮地 竜郎、細金 玲那、鈴木 大輔、村松 良樹、藤村 朱喜、中川 純一（東京農大・生物産業）
○Tatsuro Miyaji, Rena Hosokane, Daisuke Suzuki, Yoshiki Muramatsu, Shuki Fujimura, and Junichi Nakagawa (Fac. of Bioind., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】　食品関連事業者の自主衛生管理において，食品の一般生菌数や大腸菌群数等の測定が行われている。公定法に基づいた菌数測定は平板培地調製等の費用や多大の労力・時間を伴うため簡便法の開発が望まれており，その一つとして微生物熱量計を用いる方法が考案されている。食品試料を非破壊的に直接熱量計に供する場合と食品乳剤を液体培地に添加したものを熱量計にセットする場合に関して，特定の熱量計出力値に達するのに要する時間と平板培養法によって求めた食品の初期菌数との間の相関性に基づいた一般生菌数の推定が，豚ももブロック肉に関して試みられている（佐藤，Bokin Bobai，Vol.33，p119-125，2005）。しかし，食品の種類により微生物の生育に影響を及ぼす食品中の化学的環境因子（水分活性値，pH，食塩濃度等）の条件，微生物の増殖ステージおよびミクロフローラの酸素要求性が異なるため，上記の方法では測定が困難な食品が存在する。本研究は微生物熱量計を用いた菌数推定において，多種類の食品に対して適用可能で簡便な方法を確立することを目的とした。

【方法】　食品乳剤のモデルとして，従来法では測定が困難な*Bacillus subtilis* natto（納豆菌，成瀬発酵化学研究所製）の懸濁液を用いた。菌数推定に用いる食品試料は微生物の生育に及ぼす食品中の化学的環境因子や微生物の増殖ステージの影響をなくすために乳剤化した。さらに，食品乳剤中の好気性・通性嫌気性菌を良好に生育させる目的で，スクリューキャップ付きバイアル（φ30㎜×65㎜）中で適当量の乳剤を培地成分を含む円柱状寒天ブロック表面に添加した。これを微生物熱量計（Antares 0204FP型，けいはんな文化学術協会製）中で加温培養し，微生物の代謝熱に基づく熱量計出力を経時的に記録した。

【結果】　菌数推定を迅速・正確に行うためには，微生物による発熱が大きいほど良い。納豆菌懸濁液を用いて発熱が最大になるように円柱状寒天ブロックの性状を検討した結果，寒天ブロックのサイズ：φ10㎜×8㎜，培地濃度：4%乾燥ブイヨン（日水製薬），寒天濃度：3%，寒天ブロック数：10個とした。この条件下で希釈段数の異なる納豆菌懸濁液を微生物熱量計に供したところ，検出出力電圧150μVに達するのに要する時間と初期菌数との間には高い相関性が認められた。本法を用いて食品中の一般生菌数および大腸菌群数の推定を行ったので報告する。本法は微生物が休眠状態にある乾燥・塩蔵・糖蔵食品、微生物の増殖が定常期に達している発酵食品や微生物叢の優先菌群が好気性・通性嫌気性菌であるような食品においても適用可能と考えられる。

Microbial calorimetry, Standard plate count, Coliform bacteria

講演番号：4J15a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ J校舎15会場

抗菌ペプチドを用いたサルモネラ検出法の開発

Development of detection method for *Salmonella* using antimicrobial peptides

○北條 江里、大槻 隆司、坂井 ちひろ[1]、米北 太郎、森下 直樹、松本 貴之、相沢 智康[1]、森松 文毅（日ハム・中研、北大院生命・生命融合[1]）

○Eri Hojo, Ryuji Ohtsuki, Chihiro Sakai[1], Taro Yonekita, Naoki Morishita, Takashi Matsumoto, Tomoyasu Aizawa[1], Fumiki Morimatsu (R&D Center, Nippon Meat Packers Inc., [1]Graduate School of Life Science, Hokkaido Univ.)

【目的】サルモネラ菌は代表的な食中毒原因菌の１つであり、本邦でも毎年約1000件のサルモネラ食中毒が報告されている。2500種以上の膨大な数の血清型のうち、食中毒原因菌として同定される割合は、主要3血清型（*S.* Enteritidis (SE), *S.* Typhimurium (ST), *S.* Infantis (SI)）によるものが大半を占めている。厚生労働省の平成22年度食品の食中毒菌汚染実態調査によれば、鶏ひき肉198検体中106検体（53.5%）がサルモネラ菌陽性であるなど、国内の流通市場においても汚染率は高く、輸入食材も含め安全性の確保は急務の課題である。

抗体による微生物検出法としてELISA法やイムノクロマト法が広く用いられているが、抗体の性能により検出感度や特異性が左右されるなどの問題がある。本研究では現在広く用いられている捕捉抗体と検出抗体を用いたサンドイッチELISA法をベースとして、捕捉抗体の特異性を活用しながら検出抗体に代えてビオチン標識した抗菌ペプチドを検出用プローブとして用いる新しい検出系を確立し、高感度化を目指した。

【方法】抗菌ペプチドを用いたサンドイッチELISA（抗菌ペプチドELISA）に適した抗菌ペプチドのスクリーニングを、LPS結合性ペプチド及びαヘリックスタイプペプチド等約50種類を用いて行った。捕捉抗体に自作した抗サルモネラ菌モノクローナル抗体を、検出用プローブにはビオチン標識した抗菌ペプチドを用いた。本実験系に適した96ウェルプレート部材、ブロッキング剤、抗菌ペプチドの組み合わせの選定を行った。スクリーニングで選定された抗菌ペプチドについて、SE, ST, SIそれぞれの検出感度を測定するとともに、サルモネラ菌以外の16種の腸内細菌等を用いて特異性を検証した。

【結果】抗菌ペプチドELISAではスクリーニングの結果、抗菌ペプチド毎にブロッキング剤の性能に大きな差が見られた。検出用プローブとしてCecropin P1、Magainin 2など幾つかの抗菌ペプチドを用いた場合にサルモネラ菌の検出が可能であり、Cecropin P1ではSE, ST, SIともに1.0 x 10^6 cfu/mlからの検出が可能であった。これは従来の捕捉抗体-検出抗体を用いたサンドイッチELISAと同等の感度であった。また他の腸内細菌などとの交差反応は見られなかった。以上本研究により主要3血清型のサルモネラが検出可能な新しい検出系が確立できた。今後は鶏卵や鶏ひき肉など、サルモネラ汚染率の高い食品からの検出に応用可能か検証を行う予定である。

antimicrobial peptides, ELISA, cecropin

講演番号：4J15a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ J校舎15会場

抗菌ペプチドを利用したサルモネラ検出法における検出用プローブの検討

Investigation of probe in detection method for *Salmonella* using antimicrobial peptides

○坂井 ちひろ、中住 太一、北條 江里[1]、菊川 峰志、熊木 康裕、神谷 昌克、出村 誠、河野 敬一、松本 貴之[1]、相沢 智康（北大院生命・生命融合、日ハム・中研[1]）

○Chihiro Sakai, Taichi Nakazumi, Eri Hojo[1], Takashi Kikukawa, Yasuhiro Kumaki, Masakatsu Kamiya, Makoto Demura, Keiichi Kawano, Takashi Matsumoto[1], Tomoyasu Aizawa (Hokudai, [1]Nichiham)

【目的】抗体による微生物検出法としてELISA法やイムノクロマト法が広く用いられているが、抗体の性能により検出感度や特異性が左右されるなどの問題がある。我々は現在広く用いられている捕捉抗体と検出抗体を用いたサンドイッチELISA法をベースとして、捕捉抗体の特異性を活用しながら検出抗体に代えてビオチン標識した抗菌ペプチドを検出用プローブとして用いた検出系の検討を進めている。種々の抗菌ペプチドを検出用プローブとして用いた検討の結果、Cecropin P1(CP1)を用いることで、従来の捕捉抗体－検出抗体を用いたサンドイッチELISAと同等の感度でサルモネラ菌を検出することに成功している。CP1は31アミノ酸残基からなり、αヘリックスを形成し微生物の膜と相互作用することで、幅広い菌種に対して抗菌活性を有する抗菌ペプチドであること知られているが、検出用プローブとして用いた際に分子のどのような特徴がその検出感度等に影響を与えるかは明確ではない。そこで本研究では、CP1の検出用プローブとしての機能に重要な部位の同定と低分子化を目標とした検討を行った。

【方法】抗菌ペプチドを用いたサンドイッチELISAにより、CP1のビオチン標識部位やトランケートの影響による検出能の変化を評価した。また、SPR法によりCP1とそのトランケート体の脂質二重膜との相互作用を測定した。さらに抗菌活性測定を行い、トランケートによる影響について検討を行った。

【結果】N末端をビオチン標識したプローブはC末端を標識したものと比べて検出能が著しく低下した。このことから、CP1のN末端側は菌との相互作用に重要であると考え、C末端側から1残基ずつトランケートした変異体を作製し、検出能等を比較した。その結果、数残基程度の削除は検出能には影響を与えなかったが、それ以降は徐々に検出能が低下することが明らかになった。この傾向はSPR法による相互作用解析や抗菌活性測定の結果とも相関が見られた。興味深いことに、トランケート体のC末端のアミド化が検出能の回復に寄与することが明らかとなり、低分子量でありながら野生型と同程度の検出能を有するプローブを作成することに成功した。

antimicrobial peptides, ELISA, cecropin

講演番号：4J15a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ J校舎15会場

米抽出物によるボツリヌス菌の制御

Control of *Clostridium botulinum* by rice extract.

○小長谷 幸史、星野 純[1]、諸橋 克、関谷 洋平、伊藤 清尚、二瓶 将太、浅田 真一、頓所 さやか、浦上 弘（新潟薬大、[1]越後製菓）

○Yukifumi Konagaya, Jun Hoshino[1], Masaru Morohashi, Yohei Sekiya, Kiyotaka Ito, Shota Nihei, Shinichi Asada, Sayaka Tonsho, Hiroshi Urakami (NUPALS, Echigo seika)

【目的】これまでに演者らは無菌包装米飯の安全性を検討するために、*C. botulinum* の胞子を用いた検討を行なってきた。その結果、*C. botulinum* 胞子を米に接種し工業的な条件を模して炊飯を行うと、*C. botulinum* の胞子は炊飯工程で著しく死滅し、生残した胞子数はリン酸緩衝液中で同様の加熱をしたときの1/1,000以下であった（Konagaya ら 2009)。この現象には米に含まれる成分が関与していることが推察された。そこで、本研究ではこの成分の抽出を試み、その性状に関する試験を行った。

【方法】米の抽出物は、米の粉末に蒸留水とα-アミラーゼを加え加温した後に、遠心分離で得られた上清を用いた。*C. botulinum* に対する抗菌活性は80℃10分のヒートショックを与えた胞子と100℃30分加熱した胞子を用い、ペーパーディスク法で測定した。*C. botulinum* の生菌数は、クロストリジア測定用寒天培地を用いて測定した。嫌気培養はアネロパックシステムを用いて行った。

【結果】米の抽出物は100℃で加熱した胞子に対して抗菌活性を示し、80℃で加熱した胞子には示さなかった。さらに、米抽出物と液体培地を混合したものに胞子を接種して100℃で加熱後35℃で嫌気培養し、この培養液の生菌数を経時的に測定した。その結果、加熱直後には胞子の著しい減少はみられなかったが、加熱後48時間胞子は徐々に減少し120時間後には生育はみられなかった。抽出物を加えない培地中で胞子を100℃で加熱すると、80℃で加熱した胞子に比べ発芽後の増殖が遅くなる傾向がみられたが、48時間後には生育が定常期に達していた。以上のことから100℃で加熱することで胞子が損傷を受け、米の抽出物を加えることで損傷した胞子を死滅させるものと推察された。本抽出物は、1) 80%の飽和になるよう硫酸アンモニウムを加えると、加熱した胞子を死滅させる成分が沈殿した、 2) この沈殿に高濃度のキモトリプシンを加えると効果は低下した。このことから、*C. botulinum* 胞子の加熱後の死滅を促進させる成分はポリペプチドであることが示唆された。また、この成分は100℃10分の加熱に安定であり、分画分子量が14,000 の透析膜を透過しなかった。この抽出物を添加したカレーやシチューなどの食品中に*C. botulinum* の近縁種である*Clostridium sporogenes* の胞子を接種して加熱すると、食品中での生育が抑制される傾向がみられた。このことから、米の抽出物が食品添加物として利用できる可能性が示唆された。また、2年間保存された米を粉末にして同様に抽出を行なっても加熱後の*C. sporogenes* 胞子の死滅を促進させる効果がみられたことから、古米や古々米などの有効利用法としても期待がもたれる。

Clostridium botulinum, spore, rice peptide

講演番号：4B18a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ B校舎18会場

膵臓β細胞における小胞体ストレス応答の意義

The role of the unfolded protein response in pancreatic β cells.

○土屋　雄一、斉藤　美知子、岩脇　隆夫[1]、宮崎　純一[2]、森　和俊[3]、河野　憲二（奈良先端大・バイオ、[1]群馬大・先端科学研究指導育成ユニット、[2]阪大・医、[3]京大・理）

○Yuichi Tsuchiya, Michiko Saito, Takao Iwawaki[1], Jun-ichi Miyazaki[2], Kazutoshi Mori[3], Kohno Kenji (Grad. Sch. of Biol. Sci., NAIST, [1]ASRLD Unit, Gunma Univ., [2]Grad. Sch. of Med., Osaka Univ., [3]Grad. Sch of Sci., Kyoto Univ.)

【目的】The accumulation of unfolded or improperly folded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) interferes with the function of the ER. These conditions are called ER stress. ER stress elicits adaptive response, known as unfolded protein response (UPR). When a sensor protein of the UPR system senses the accumulation of unfolded proteins in the ER, it activates a signaling pathway that leads to the upregulation of a subset of genes encoding ER molecular chaperones to increase ER folding capacity or ERAD components to reduce misfolded proteins in the ER. In mammalian cells there are three principal ER stress sensors, IRE1α, ATF6α, and PERK. Interestingly, we noticed that IRE1α is physiologically and constitutively activated in pancreatic β cells and placenta. In this study, we work on why IRE1α is activated in pancreatic β cells.

【方法】To address this question, we generated β-cells-specific IRE1α conditional knockout (βIRE1α CKO), β-cell-specific IRE1α and ATF6α double knockout (βDKO) mice and model β cell lines and studied their phenotypes.

【結果】βIRE1α CKO mice exhibited only modest diabetic phenotype from around 25 weeks. Although ATF6α KO mice did not show any diabetic phenotype, βDKO mice exhibited severe diabetic phenotype from early stages. These results revealed that ATF6α can partially substitute for the function of IRE1α in pancreatic β cells and that the disruption of both IRE1α and ATF6α aggravates the progress of diabetes. It is difficult to examine the molecular details using pancreatic islets from βIRE1α CKO mice and βDKO mice because of the difficulty to isolate pancreatic islets from these mice. To solve this problem, I am generating insulinoma cell lines lacking IRE1α and/or ATF6α. Using these model β cell lines, I plan to examine which step of insulin biosynthesis (transcription, folding, or secretion) is affected in the IRE1α KO or IRE1α-ATF6α DKO cell lines.

ER stress, UPR, Insulin

講演番号：4B18a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ B校舎18会場

酵母における2通りの小胞体関連分解経路

Two distinct ERAD pathways in yeast

興梠 祐樹、鶴永 雄太、○樋口 健吾、Kazi Mostafizur、加藤 昭夫、阿座上 弘行（山口大・農）
Yuki Koroki, Yuta Tsurunaga, ○Kengo Higuchi, Akio Kato, Hiroyuki Azakami (Yamaguchi Univ)

【目的】生物にはタンパク質のフォールディング状態を監視し、正しく構造形成されなかったものは分解する品質管理機構が備わっている。哺乳動物において小胞体内でミスフォールドしたタンパク質が分解除去される仕組みとして2 通りの分解機構が知られている。ユビキチン・プロテアソーム（UPS）系とオートファジー・リソソーム（ALS）系である。UPS系ではカルネキシンが重要な働きをすると考えられており、出芽酵母にはそのホモログCne1pが存在する。そこで、種々の構造安定性を示す変異型鶏卵白リゾチームを酵母で発現させ、不安定型リゾチームが分解される機構について調べた。

【方法および結果】*Saccharomyces cerevisiae* において、アミロイド変異の導入により構造不安定化したリゾチーム(D66H)は野生酵母でほとんど分泌しなかったが、カルネキシンホモログを欠損させたΔCNE1 酵母では分泌量が顕著に増加した。このことから、出芽酵母においても Cne1p がタンパク質の品質管理機構に重要な役割をしていることが示唆された。そこで、c-Myc タグを付加したリゾチームを酵母で発現させ、タグ抗体を用いた蛍光免疫染色により細胞内局在を調べた。その結果、野生酵母では不安定型リゾチーム（D66H）は細胞内にほとんど見られなかったが、ΔCNE1 酵母では強く蛍光シグナルが観察された。シクロヘキシミドでタンパク質合成をストップさせた後のタンパク質をチェイスしたところ、D66H リゾチームの分解が観察された。さらに、ΔCNE1 酵母ではリゾチームの細胞内局在が顕著に変化していた。小胞体マーカー（Kar2p）との共局在を免疫染色により調べたところ、安定型リゾチームに比べ、不安定型リゾチームは小胞体に局在する割合が高いことが示された。不安定型リゾチーム(D66H)と FLAG タグを付加した可溶性 Cne1p をΔCNE1 株で共発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた共免疫沈降を行った。抗 c-Myc 抗体を用いたイムノブロットによりリゾチームの検出を行ったところ、不安定型リゾチーム（D66H）のみ可溶性 Cne1p との相互作用が観察された。このことから、不安定型リゾチーム（D66H）が Cne1p との相互作用により小胞体に長く滞在していることが示唆された。これらの結果から、不安定型リゾチームが Cne1p を介した UPS 系で分解されることが示唆された。

また、*Pichia pastoris* で変異型リゾチームを発現させ、その分泌に対するオートファジー阻害剤ウォルトマンニンの効果を調べた。その結果、不安定型リゾチームの分泌がオートファジーの阻害により増加したことから、不安定型リゾチームの分解にはALS 系も関与することが示唆された。

今回の研究により、酵母でもタンパク質品質管理機構としてUPSとALSの2つの経路が機能し得ることが示唆された。

ERAD, autophagy, yeast

講演番号：4B18a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ B校舎18会場

出芽酵母のクロマチンリモデリング因子RSCによるミトコンドリア制御機構の解明

Regulatory mechanisms of RSC Chromatin-remodeling complex for mitochondria in budding yeast

○余　斐斐、今村　優子、岡根　杏、湯川　格史、土屋　英子（広島大院先端物質・分子生命）
○Feifei Yu, Yuko Imamura, Kyo Okane, Masashi Yukawa, Eiko Tsuchiya (Hiroshima Univ.)

【目的】

出芽酵母の ATP 依存性クロマチンリモデリング因子 RSC(Remodel Structure of Chromatin)は、転写制御、DNA 複製、染色体分配などの幅広い染色体高次構造変換に寄与していると考えられている。これまでに、RSC の中心因子である *NPS1* の温度感受性変異株である *nps1-105* 株との合成致死を示す候補株の網羅的解析(SGA)によって、ミトコンドリア関連遺伝子が多く取得された。そこで、本研究では、クロマチンリモデリング因子 RSC とミトコンドリアとの関連を解析することを目的としている。

【方法及び結果】

RSC欠損株におけるミトコンドリア機能について調べるために、エタノールとグリセロールを炭素源とする非発酵性培地(YPEG)において細胞増殖を調べたところ、RSC変異株では細胞増殖が顕著に低下し、G1期の細胞が蓄積した。また、蛍光顕微鏡によりミトコンドリア形態を観察したところ、RSC変異株ではミトコンドリアが凝集している細胞が多く観察された。さらに、ミトコンドリア欠損株である*rho*^{0}株の出現率を測定したところ、RSC変異株ではmtDNAの脱落率が増加していることがわかった。これらの結果より、RSC変異株では異常なミトコンドリアの蓄積により、代謝機能の低下やmtDNAの脱落が引き起こされていると考えられた。

異常なミトコンドリアの蓄積の原因の一つとして、タンパク質分解系であるオートファジーの異常が考えられる。また、SGA解析により*nps1-105*株と合成致死を示す遺伝子群の中に、オートファジー関連遺伝子である*ATG17*も取得されていた。RSC欠損株におけるオートファジーへの影響を調べるために、RSCの構成因子である*rsc2*欠損株又はautophagy欠損株にオートファゴソーム形成因子であるGFP-Atg8融合タンパク質を発現させ、窒素源飢餓培地又は非発酵性培地におけるGFP-Atg8の分解をwestern blottingにより検出した。*rsc2*欠損株では、窒素源飢餓培地においてGFP-Atg8の分解が正常に起こっていたが、非発酵性培地では遊離したGFPが検出されなかった。ゆえに、RSCはミトコンドリア依存的なオートファジーの分解を調節することが明らかになった。

本研究では、クロマチンリモデリング因子とミトコンドリアの機能的な相互作用をさらに解析したので報告する。

RSC, mitochondria, autophagy

講演番号：4B18a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ B校舎18会場

酵母*Saccharomyces cerevisiae*におけるミトコンドリアの新規プロリントランスポーターの探索
Screening of novel mitochondrial proline transporters in *Saccharomyces cerevisiae*

○西田 郁久[1,2]、戒能 智宏[1]、大津 厳生[1]、高木 博史[1]（[1]奈良先端大・バイオ、[2]学振特別研究員DC）
○Ikuhisa Nishida[1,2], Tomohiro Kaino[1], Iwao Ohtsu[1], Hiroshi Takagi[1]（[1]Grad. Sch. of Biol. Sci., NAIST, [2]JSPS research fellow DC）

【目的】アミノ酸のプロリン（Pro）は細胞内の浸透圧調節やレドックス制御などに関わることで、様々なストレスに対する細胞保護機能を有している。酵母*Saccharomyces cerevisiae*において、Proはサイトゾルでグルタミン酸（Glu）から３種類の酵素（Pro1, Pro2, Pro3）により合成される。一方、Proはミトコンドリアに存在する２種類の酵素（Put1, Put2）により分解され、炭素源や窒素源となる。また、ワインやビール醸造の原料となるブドウや麦汁等にはProが豊富に含まれ、酵母の生育においても重要である。しかしながら、Proの分解にはミトコンドリア内膜に局在するトランスポーターの関与が示唆されているものの、すべての生物においてその分子は同定されておらず、輸送機構や生理的役割も不明である。本研究では、細胞内におけるProの生理機能を明らかにすることを目的に、Proトランスポーターの探索を行った。
【方法と結果】Proをミトコンドリアに輸送できない株は、Proを分解できないと考えられる。酵母のゲノムには機能未知や推定上のものを含め、35種類のミトコンドリア輸送体遺伝子が存在している。その中から生育に必須でない遺伝子の破壊株（約30株）を用い、Proを単一窒素源とする培地で培養した。その結果、既知のアミノ酸トランスポーターやその類縁トランスポーターの遺伝子破壊株は、生育阻害を示さなかった。次に、酵母の野生株（BY4741）からミトコンドリアを調製し、アミノ酸含量を測定したところ、Proを含む少なくとも8種のアミノ酸が検出された。さらに、野生株とPut1遺伝子の欠損株（Δ*put1*株）から調製したミトコンドリアにProを添加し、その分解産物をアミノ酸アナライザーで分析した。その結果、野生株ではProの分解産物であるGluが生成していたが、Δ*put1*株ではProの分解は観察されなかった。また、放射性ラベルしたProを用いてミトコンドリアにおけるProの輸送活性を測定したところ、数分のインキュベーションで、ミトコンドリア内の放射活性の上昇が見られた。これらの結果から、酵母にもミトコンドリアに局在するトランスポーターを介したPro輸送経路が存在する可能性が示された。

さらに、複数のProトランスポーター遺伝子の欠損によりProを唯一の窒素源として利用できない大腸菌の変異株に酵母の各ミトコンドリアトランスポーター遺伝子を導入し、Pro資化能の回復を指標にトランスポーター候補遺伝子の絞り込みも行っている。現在までに、既知の有機酸トランスポーター等の過剰発現によってPro資化能の回復が見られており、今後はProの輸送活性や局在性等の解析を行う予定である。

yeast, proline transporter, mitochondria

講演番号：4B18a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ B校舎18会場

出芽酵母における分裂酵母液胞アミノ酸トランスポーターFnx1の機能発現

Functional expression of *Schizosaccharomyces pombe* Fnx1, a vacuolar amino acid transporter, in *Saccharomyces cerevisiae*

○ 真鍋　邦男[1]、Soracom Chardwiriyapreecha[1]、河田　美幸[2]、秋山　浩一[2]、関藤　孝之[1]、竹川　薫[3]、柿沼　喜己[1,2]（[1]愛媛大・農、[2]愛媛大・INCS、[3]九大・農）

○ Kunio Manabe[1], Soracom Chardwiriyapreecha[1], Miyuki Kawano-Kawada[2], Koichi Akiyama[2], Takayuki Sekito[1], Kaoru Takegawa[3], Yoshimi Kakinuma[1,2] ([1]Fac. Agr., Ehime Univ.,[2]INCS, Ehime Univ., [3]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

【目的】出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*と分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*の液胞にはアミノ酸が蓄積し、特に塩基性アミノ酸は細胞全体の70-90%が存在する。アミノ酸の液胞への取り込みや排出には液胞膜に存在する各種アミノ酸トランスポーターが機能し、サイトゾルアミノ酸濃度の適正化に働くと考えられる。*S. cerevisiae* においてVBAファミリーに属するVba1、Vba2、Vba3は液胞への塩基性アミノ酸（リジン、ヒスチジン、アルギニン）の取り込みに機能する。我々は*S. cerevisiae*のVBAファミリーが７種のホモログにより構成されるのに対し、*S. pombe*では3種のVBAホモログを見出している。さらに、*S. pombe*のVbaホモログFnx1は液胞膜に局在すること、生細胞のリジン、アスパラギン、イソロイシンの取り込み活性が、*fnx1*遺伝子欠損で低下することを報告した。しかし、*S. pombe*からの液胞の単離が困難であり、Fnx1のアミノ酸輸送活性については十分な検討が行なわれていない。本研究では、Fnx1を出芽酵母で発現させ、単離液胞膜小胞を用いてFnx1のアミノ酸輸送活性について解析を行なった。

【方法】Fnx1-GFP を *ADH* および *GPD* 二種類のプロモーターにより出芽酵母 *vba1*Δ*vba2*Δ*vba3*Δ*vba4*Δ株に発現させ、蛍光顕微鏡により細胞内局在を調べた。液胞膜小胞はフィコールを用いた超遠心分画により単離し、^{14}C 標識アミノ酸の取り込み活性を液体シンチレーションカウンターにより経時的に測定した。

【結果】*ADH* プロモーターより *S. cerevisiae* 細胞に発現させた Fnx1-GFP は液胞膜に選択的に局在した。液胞膜小胞を単離し、ATP 依存性のアミノ酸の取り込みを調べた結果、リジンおよびイソロイシンの取り込みに増加傾向がみられ、ヒスチジンの取り込みに変化はみられなかった。*GPD* プロモーターを用いて Fnx1-GFP を過剰発現し、液胞膜小胞へのアミノ酸の取り込み実験を行ったところ、リジンとイソロイシンの取り込み活性が大きく増加し、ヒスチジンの取り込み活性の増加もみられた。Fnx1 がヒスチジン取り込みに関わるかどうかは、生細胞を用いた実験では結論づけられなかったが、以上の結果は、Fnx1 がリジン、イソロイシンだけでなくヒスチジンの取り込みにも機能することを示唆している。Fnx1 の輸送基質を明らかにするために、現在、他のアミノ酸についても同様の解析を進めている。

vacuole, transporter, *Schizosaccharomyces pombe*

講演番号：4B18a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ B校舎18会場

出芽酵母新規液胞アミノ酸トランスポーター遺伝子の同定

Identification of the genes for vacuolar amino acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*

○森實 大貴[1]、杉本　直子[1]、本藤　加奈[1]、河田　美幸[2]、関藤　孝之[1]、柿沼　喜己[1,2]（[1]愛媛大・農、[2]愛媛大・INCS）

○Hiroki Morizane[1], Naoko Sugimoto[1], Kana Hondo[1], Miyuki Kawano-Kawada[2], Takayuki Sekito[1], Yoshimi Kakinuma[1,2] ([1]Fac. Agr., Ehime Univ., [2]INCS, Ehime Univ.)

【目的】出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*の液胞には細胞全体の50%以上のアミノ酸が含まれ、特に塩基性アミノ酸は細胞全体の70-90％が蓄積する。一方、酸性アミノ酸は10％程度しか存在しない。このような液胞内外のアミノ酸の偏在には、液胞膜を介した選択的なアミノ酸輸送が機能している。我々はMajor facilitator superfamily（MFS）に属するVba1、Vba2、Vba3が塩基性アミノ酸を液胞内に取り込むトランスポーターであることを報告した。MFSには液胞アミノ酸トランスポーター候補としての未同定遺伝子の存在も示唆されている。本研究では、Monocarboxylate transporter homolog（MCH）サブファミリー遺伝子およびErs1について液胞膜を介したアミノ酸輸送への関与について検討を行なった。

【方法】MCHのトランスポーター候補遺伝子ORFをGFP発現ベクターにクローニングし、酵母細胞に導入後、GFP融合タンパク質の細胞内局在を蛍光顕微鏡により観察した。銅処理により液胞画分を調製し、アミノ酸組成を調べた。フィコールを用いた超遠心分画により液胞膜小胞を調製し、アミノ酸取り込み活性を測定した。

【結果】MCHサブファミリーに属するMch4は、液胞膜に局在し、その動物ホモログの中にはアミノ酸輸送に機能するものも報告されているが、*S. cerevisiae* MCHトランスポーターの輸送基質は不明である。MCHトランスポーターサブファミリーの各タンパク質にGFPを付加し顕微鏡観察を行なったところ、GFP-Mch4だけでなくGFP-Mch1とGFP-Yjl163cも液胞膜局在を示した。*mch1*Δ株や*mch4*Δ株の液胞内アミノ酸組成に大きな変化は見られなかったが、*MCH1*を過剰発現したところ、野生株に比べトレオニンやヒスチジン、プロリンの液胞内含量が低下し、アルギニン含量が増加した。一方、*yjl163c*Δ株はリジンの液胞内含量が高く、その液胞膜小胞はリジンの取り込み活性増加を示した。これらはMCHトランスポーターが液胞膜を介したアミノ酸輸送に関与する可能性を示唆する。

Ers1は動物細胞でリソソームからのシスチン排出に機能するシスチノシンの出芽酵母ホモログである。そのGFP融合タンパク質の液胞膜局在を確認し、過剰発現株のアミノ酸組成解析を行ったところ、野生株と比較して多くのアミノ酸の液胞内含量の減少とアスパラギン酸含量の増加を検出した。さらにErs1過剰発現株から単離した液胞膜小胞は、セリンのATP依存的排出活性の増加を示した。Ers1の他のアミノ酸種の輸送能についても液胞膜小胞を用いて現在解析中である。

vacuole, transporter, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：4B18a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ B校舎18会場

出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt1は広い基質特異性を有する

Broad substrate specificity of vacuolar amino acid transporter Avt1 in *Saccharomyces cerevisiae*

○刀根 潤一[1]、吉村　鮎美[1]、河田　美幸[2]、関藤 孝之[1]、柿沼 喜己[1,2]（愛媛大・農、愛媛大・INCS）
○Junichi Tone[1], Ayumi Yoshimura[1], Miyuki Kawano-Kawada[2], Takayuki Sekito[1], Yoshimi Kakinuma[1,2]
([1]Fac. Agr., Ehime Univ, [2]INCS, Ehime Univ)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の液胞はアミノ酸を蓄積することが以前から知られ、液胞内外への選択的なアミノ酸輸送機構の存在が示されている。AVT トランスポーターファミリーの Avt1 は液胞膜小胞を用いた *in vitro* でのアミノ酸輸送活性測定により、グルタミン、チロシン、イソロイシンの液胞内への取り込みに機能することが報告されている。一方、Avt3 および Avt4 はこれらアミノ酸を逆に液胞外へ排出することが示唆されている。我々は Avt3/Avt4 の解析をさらに進め、これらが中性アミノ酸全般を液胞から排出すること、Avt4 については塩基性アミノ酸も排出することを明らかにした。本研究では Avt1 も同様に広い基質特異性を有するかどうかについて、アミノ酸組成解析および液胞膜小胞を用いたアミノ酸輸送活性測定により検討を行なった。

【方法】液胞画分は銅処理により調製し、アミノ酸自動分析計により解析した。液胞膜小胞はフィコールを用いた超遠心分画により単離し、0.1 mM ^{14}C 標識アミノ酸を加え、ATP 依存性の取り込みを液体シンチレーションカウンターにより経時的に測定した。また 0.5 mM の未標識アミノ酸を加え、競合阻害効果を調べた。

【結果】野生株と *avt1*Δ株の比較ではグルタミン、チロシン、イソロイシンをはじめ、その他のアミノ酸についても液胞内含量に大きな変化は見られなかった。一方、*avt3*Δ*avt4*Δ株を親株として、*AVT1* 遺伝子を破壊すると中性アミノ酸全般の含量が減少した。*AVT1* を過剰発現すると逆に中性アミノ酸含量が増加することから、Avt1 が中性アミノ酸全般を液胞内に取り込む可能性が示唆された。

次に液胞膜を介したアミノ酸輸送活性の変化をより直接的に調べるため、液胞膜小胞へのアミノ酸取り込み活性を調べた。*avt1*Δ*avt3*Δ*avt4*Δ株から単離した液胞膜小胞はATP依存的なイソロイシン取り込みを示さないが、*AVT1*過剰発現ベクター導入により取り込み活性を示した。このイソロイシンの取り込みに対する各種アミノ酸の競合阻害効果を調べた結果、中性アミノ酸全般および塩基性アミノ酸であるヒスチジンが阻害効果を示した。一方、アルギニン／リジンおよび酸性アミノ酸は阻害しなかった。さらに*AVT1*を過剰発現すると^{14}C標識したアラニンとヒスチジンの液胞膜小胞へのATP依存的な取り込みが大幅に増加した。以上の結果はAvt1がグルタミン、チロシン、イソロイシンだけでなく中性アミノ酸全般とヒスチジンも液胞内に取り込むことを示唆する。

vacuole, transporter, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：4B18a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ B校舎18会場

タイトル　下面ビール酵母の培養中における細胞表層及び細胞内タンパク局在の観察

Title　Observation of cell wall and intracellular proteins during propagation of brewing yeasts

〇朝田　圭、福田良一[1]、太田明徳[1]、佐藤雅英、執行達朗（サッポロビール・価値創造フロンティア研究所、[1]東京大学・大学院農学生命科学研究科）

〇Kei Asada, Ryouichi Fukuda[1], Akinori Ohta[1], Masahide Sato, Tatsuro Shigyo (SAPPORO BREWERIES LTD, [1]Department of Biotechnology, The University of Tokyo)

【目的】

我々は下面ビール酵母(*Saccharomyces pastrianus*, W34/70)において、ビール醸造上重要である細胞壁レクチンタンパク質　Lg-Flo1pと液胞内プロテアーゼ　Pep4pの挙動について調査した。下記の方法で得た遺伝子組換え下面ビール酵母の培養液からサンプリングを行い、増殖過程におけるそれぞれのタンパク質の細胞内局在を観察したので報告する。

【方法】

Lg-Flo1p可視化コンストラクトを以下の手順で作製した。*E. coli*を宿主として、Lg-*FLO1*のプロモーター上流領域、プロモーター領域、N末端領域をそれぞれサブクローニングした。その後、Lg-*FLO1*のプロモーター上流領域、薬剤耐性遺伝子、プロモーター領域、*EGFP*、N末端領域の順番でつなぎ合わせた。作製したベクターを下面ビール酵母へ導入し、染色体上で相同組換えが生じた株を薬剤耐性によりスクリーニングし、遺伝子組換え体（*GFP*-Lg-*FLO1*）を得た。

また、Pep4p可視化コンストラクトを以下の手順で作製した。*E. coli*を宿主として、*PEP4* ORF（終止コドンを除く）とプロモーター領域をサブクローニングした。その後、*PEP4*のC末端側に*EGFP*、その下流に薬剤耐性遺伝子を接続し、染色体組込み型酵母シャトルベクターに乗せ換えた。作製したベクターを下面ビール酵母へ導入し、染色体上で相同組換えが生じた株を薬剤耐性によりスクリーニングし、遺伝子組換え体（*PEP4-GFP*）を得た。

それぞれの遺伝子組換え下面ビール酵母について、コロニーPCR法により染色体上の目的の部分で遺伝子組換えが起こっていることを確認した後、蛍光顕微鏡を用いてそれぞれのタンパクの局在を観察した。

【結果】

GFP-Lg-*FLO1*組換え下面ビール酵母の増殖過程における細胞を蛍光顕微鏡で観察した結果、細胞壁と思われる部分に蛍光が観察された。また、*PEP4-GFP*組換え下面ビール酵母では液胞に蛍光が見られた。

Brewing Yeast, GFP, Flocculation

講演番号:4B18a09
講演日時、会場:3月25日10:38～ B校舎18会場

出芽酵母の細胞壁多糖、β-1,6-グルカンの合成に必須のKre6が機能を発揮するにはERの複数のシャペロン様タンパク質の働きが必要である

Action of Multiple ER Chaperon-like Proteins Is Required to Make Functional Kre6 Protein Essential for Yeast Cell Wall β-1,6-Glucan Synthesis

◯栗田 朋和、野田 陽一、依田 幸司（東大院・農生科・応生工）
◯Tomokazu Kurita, Yoichi Noda, Koji Yoda (Dept. Biotech, Univ. Tokyo)

【背景と目的】β-1,6-グルカンはグルコースがβ-1,6結合で結合した細胞壁多糖である。β-1,6-グルカンは細胞壁構造に必須であり、極性生長部位で盛んに合成されるとの報告がある。我々はβ-1,6-グルカン合成に必須のKre6の一部が極性成長部位の細胞質膜や輸送小胞に局在し、この局在がKre6の機能を発揮するのに必要である事を明らかにした。

今回はまずKre6のホモログであるSkn1の局在を検討する事にした。Skn1は酵素活性があると思われるC末端領域でKre6と高い相同性を示し、KRE6とSKN1の二重破壊で致死となる事から、機能重複があると考えられる。次にKre6の局在に必要な小胞体(Endplasmic Reticulum、 ER)の遺伝子産物について検討した。Keg1は、我々が解析を行ったERの必須膜タンパク質であり、β-1,6-グルカン合成に関わる事を以前に報告した。Calnexin cycleは、真核生物に広く保存されたERの品質管理機構であり、N糖鎖にUDP-glucose由来のグルコースを付加し、そのグルコース残基を標識としてタンパク質の折り畳みを行う。出芽酵母ではcalnexin cycleを構成するglycosidase I(Cwh41)、 glycosidae II(Rot2)、UGGT(UDP-glucose:Glycoprotein Glycosyl Transferase)(Kre5)、Calnexin(Cne1)の4種の遺伝子産物のホモログが見つかり、興味深い事にこれらもすべてβ-1,6-グルカン合成に関わるとの報告がある。Kre5、Cne1の細胞内の機能は不明であり、出芽酵母ではUGGT活性が検出できない為、Calnexin cycleは機能していないと考えられている。しかしKre5はKeg1と同じく必須遺伝子であり、何らかの重要な機能を有する事は間違い無い。Kre6はKeg1と結合し、ERにも多くのKre6が局在する事がわかっていた為、我々は、これらの遺伝子産物がKre6の折り畳みや局在に関わり間接的に細胞壁のβ-1,6-グルカン合成に影響するのではないかと予想した。

【結果】Skn1もKre6の破壊時には免疫蛍光染色で極性成長部位に強いシグナルが観察された。温度感受性変異株であるkeg1-1株の準許容温度においてKre6の分解が見られた。ERで機能するユビキチンリガーゼの破壊によりKre6の分解を抑制した株においてもKre6の極性生長部位への局在は見られず、Keg1はKre6の安定性だけでなく正しい局在にも必要と考えられた。CWH41、ROT2、CNE1の破壊とkeg1-1の二重変異による合成生育阻害、及びKre5, Cne1とKeg1の結合を検出した。これらの結果よりKeg1とこれらの遺伝子産物が協調的に働くと考えられた。さらに、Kre6はCne1と結合し、CNE1破壊株においてKre6の極性生長部位への局在が失われた。すなわち、Kre6の局在にはCne1も必要である事が示唆され、Cne1の潜在的な標的としてKre6が初めて同定された。

β-1,6-glucan, Yeast, Cell Wall

講演番号：4B18a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ B校舎18会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における α-1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsB* 破壊株および *agsA*, *agsB* 二重破壊株を用いた *ags* 遺伝子群の機能解析

Functional analysis of the *Aspergillus nidulans agsA*, *agsB* genes encoding α-1,3-glucan synthases with their disruptants in *Aspergillus nidulans*

○稲葉　梓[1]、吉見　啓[2]、阿部　敬悦[1,2]（[1]東北大院・生物産業創成、[2]東北大・未来研）
○Azusa Inaba[1], Akira Yoshimi[2], Keietsu Abe[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2] NICHe., Tohoku Univ.)

【目的】我々は *Aspergillus nidulans* の細胞壁構築シグナル伝達経路について、MAP キナーゼ MpkA 経路を中心に解析を進めてきた。これまでに、本菌の MpkA 経路は、出芽酵母には存在しない α-1,3-グルカン合成酵素（AGS）遺伝子 *agsA*、*agsB* の転写制御に特化していることを明らかにしている。近年，病原真菌 *Histoplasma capslatum* や植物病原性のイネいもち病菌において、α-1,3-グルカン（AG）が感染過程で重要な役割を担うことが明らかになり、真菌の生存戦略における AG の重要性が認識されつつある。これらの背景から、本研究室では *A. nidulans* に存在する 2 種の AGS 遺伝子の機能解析を進めてきた。これまでに、*agsA* 遺伝子破壊株の解析から、*agsA* は通常生育条件下ではほとんど機能していないことを明らかにしている。また、*agsB* 発現制御株を用いた解析から、本菌における AG の合成には主に AgsB が機能していることも示唆されている。しかしながら、*agsB* 遺伝子破壊の致死性および AGS 遺伝子完全欠損株取得の可否については明らかにされていない。そこで本研究では、*agsB* 遺伝子が必須遺伝子であるか否かを明らかにすることを目的とし、*agsB* 破壊株の造成を試みた。その結果、*agsB* 単独破壊株が取得できたので、その表現型を解析するとともに、AGS 遺伝子完全欠損株の造成を試みた。
【方法・結果】 *agsB* 遺伝子のプロモーターを含む領域を栄養要求マーカーに置換する *agsB* 破壊用コンストラクトを構築し、プロトプラスト PEG 法による *agsB* 破壊株の造成を試みた。その結果、*agsB* 破壊株の取得に成功し、*agsB* 遺伝子は必須遺伝子ではないことが明らかになった。次に、*agsB* 破壊株について、細胞壁にストレスを与える薬剤（Micafungin, Calcofluor white, Congo red）への感受性を評価したところ、Congo red に対してのみ感受性の上昇が認められた。また、熱水アルカリ抽出により野生株、*agsB* 破壊株の細胞壁を分画し、細胞壁の分析を行った。その結果、*agsB* 破壊株では AG が分画される画分の重量が減少し、NMR 解析においても野生株や *agsA* 破壊株では検出される AG のシグナルが検出されなかった。また、細胞壁構成糖を解析したところ、*agsB* 破壊株では AG が分画される画分において、グルコースが減少するだけでなく、野生株ではほとんど検出されないガラクトースやマンノースが検出された。以上より、*A. nidulans* における AG の合成は主に AgsB が機能していることが明らかになり、*agsB* 破壊により細胞壁の構成多糖が変化することが示唆された。さらに、*agsA* 破壊株を親株とした *agsB* 破壊株（AGS 遺伝子完全欠損株）を取得したので、この株の表現型解析の結果についても考察した。（本研究は生研センターより支援を受けた。）

Aspergillus nidulans, cell wall, α-1,3-glucan

講演番号：4B18a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ B校舎18会場

麹菌のグルコース抑制遺伝子変異株におけるマルトースパーミアーゼのエンドサイトーシス

Endocytosis of maltose permease in *Aspergillus oryzae* mutants defective in carbon catabolite repression-related genes.

○平本 哲也、田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農・生物産業創成）
○Tetsuya Hiramoto, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi(Grad Sch Agric Sci, Tohoku Univ)

【目的】

我々は、麹菌のデンプン分解酵素生産において、誘導基質であるマルトースの細胞内取込み系が重要であり、その取込みを担うマルトースパーミアーゼ(MalP)遺伝子はグルコースにより転写抑制を受けることをすでに明らかにしている[1)]。一方、出芽酵母で報告されているように、タンパク質レベルでエンドサイトーシス依存的に液胞へ輸送され分解を受ける機構が存在するか調べるため、GFP-MalP 融合タンパク質を MalP プロモーター制御下で発現させたところ、マルトース誘導条件下では主として GFP-MalP は細胞膜上に局在が観察された。これにグルコースを添加すると速やかに細胞膜からの GFP 蛍光の消失と液胞と推定されるオルガネラへの移行が認められた[2)]。本研究では、グルコース存在下における MalP のエンドサイトーシス依存的な液胞への移行の確認と、グルコース抑制に関わる遺伝子変異による MalP のエンドサイトーシスに対する影響について解析を行った。

【結果】

MalP の細胞内局在変化を観察するために GFP-MalP 融合タンパク質を *malP* プロモーター制御下で発現させ、共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察を行った。マルトース誘導条件下で細胞膜上への GFP-MalP の局在化を確認した後に、アクチン重合阻害剤である Latrunculin B で処理し、グルコース添加後の GFP-MalP の局在変化を観察した。その結果、Latrunculin B 処理を行った株ではグルコース添加後も細胞膜上の GFP 蛍光が消失しないことが明らかとなった。このことから、細胞膜上から液胞への GFP-MalP の輸送はエンドサイトーシス依存的な機構によるものであることが示された。

次にグルコース存在下における MalP のエンドサイトーシスによる液胞への輸送・分解機構を解析するために、カーボンカタボライト抑制転写因子である CreA、及び CreA の脱ユビキチン化に関与する CreB とユビキチン化に関与する CreD について、それぞれの遺伝子破壊株を作製し、GFP-MalP のエンドサイトーシスに及ぼす影響を調べた。*creA* 及び *creB* 破壊株における GFP-MalP の局在変化については解析中であるが、*creD* 破壊株においてはマルトース誘導後、グルコースを添加しても細胞膜上から液胞への GFP-MalP の移行が認められなかった。このことから、CreD は MalP のエンドサイトーシス依存的な細胞内への取込みと液胞への輸送に関与している可能性が示唆された。

1) Hasegawa et al. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 1-9 (2010).
2) 平本哲也ほか：第63回日本生物工学会大会講演要旨、p. 230 (2011).

Aspergillus oryzae, maltose permease, endocytosis

講演番号：4B18a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ B校舎18会場

麹菌 *A. oryzae* の微小管形成中心関連タンパク質 AoApsB の隔壁孔における機能

Functional roles of a microtubule-organizing center component AoApsB at septal pore in *A. oryzae*

○川畑絢平、矢萩大貴、丸山潤一、北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）
○Junpei Kawabata, Daiki Yahagi, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

【目的】麹菌 *A. oryzae* において、隣接する細胞は隔壁に存在する小さな穴である隔壁孔を介して細胞間連絡を行う。この性質は、ある細胞が溶菌した際に、隣接する細胞に溶菌が伝播する危険を伴う。子嚢菌類に属する糸状菌に特異的に存在するオルガネラ Woronin body が隔壁孔をふさぐことで、溶菌の伝播を防ぐことが知られているが、これ以外の因子の関与についてはあまり解析が進んでいない。我々は以前、*A. oryzae* の MAP キナーゼ AoFus3 が隔壁孔を取り囲むリング状の局在を示し、溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することを見いだした [1)]。一方で、*Aspergillus nidulans* において微小管形成中心(microtubule-organizing center)関連タンパク質 ApsB が、AoFus3 と同様に隔壁孔を取り囲むリング状の局在を示すとの報告があるが [2)]、溶菌の伝播を防ぐ機能での役割は不明である。本研究では、*A. oryzae* における微小管形成中心関連タンパク質の機能解析を行い、AoFus3 との関連を解析することを目的とした。

【方法及び結果】*A. nidulans apsB* 遺伝子の配列を用いて *A. oryzae* のゲノムデータベースで BLAST 検索した結果、相同性を示す遺伝子 AO090020000040 を見いだし、*AoapsB* と命名した。AoApsB の機能を調べるため、*AoapsB* 破壊株を作製した。*Aofus3* 遺伝子破壊株が感受性を示す細胞壁合成阻害剤 micafungin の存在下では、*AoapsB* 遺伝子破壊株の生育は阻害されなかった。一方で、寒天培地上のコロニーに水を加えて先端細胞の溶菌を誘導する低浸透圧ショック実験 [3)]を行った結果、*AoapsB* 破壊株で隣接する細胞に溶菌の伝播する割合が増加し，*Aofus3* 破壊株と同様の結果が得られた。また、*AoapsB* 破壊株において AoFus3-EGFP 融合タンパク質を発現し、蛍光顕微鏡で観察した結果、野生型株と同様に隔壁孔を取り囲むリング状の局在が見られた。このことから、AoApsB が AoFus3 の隔壁孔での局在に関係しないことがわかった。現在、AoApsB の隔壁孔への局在に AoFus3 が関与するかどうかの解析を行っている。

1) 佐々木ら　2011 年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 116.
2) Zekert *et al.* (2010) *Eukaryot. Cell* Vol. 9, 795-805.
3) Maruyama *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 331, 1081-1088.

Aspergillus oryzae, septal pore, microtubule-organizing center

講演番号：4B18a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ B校舎18会場

麹菌の隔壁孔に局在するMAPキナーゼAoFus3と相互作用する新規タンパク質の機能解析

Functional analysis of novel proteins interacting with “septal pore-localizing” MAP kinase AoFus3 in *Aspergillus oryzae*

○矢萩 大貴、丸山 潤一、Özgür Bayram[1]、Oliver Valerius[1]、Gerhard H. Braus[1]、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工、[1] ゲッティンゲン大学）

○Daiki YAHAGI, Jun-ichi MARUYAMA, Özgür BAYRAM[1], Oliver VALERIUS[1], Gerhard H. BRAUS[1], Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo,[1]Georg-August-Universität Göttingen)

【目的】

麹菌は多細胞生物であり、隣接する細胞は隔壁により仕切られているが、それにあいた小さな穴である隔壁孔を通じて細胞間連絡を行う。この性質は、ある細胞が溶菌した際に、隣接する細胞に溶菌が伝播する危険をもたらす。溶菌の伝播を防ぐ機能には、子嚢菌類に属する糸状菌に特異的なオルガネラWoronin bodyが必要であるが、それ以外に関与する因子についての解析はほとんど進んでいない。これまでに我々は、麹菌のMAPキナーゼAoFus3が、隔壁孔を取り囲むリング状に局在することを見いだした[1)]。さらに、*Aofus3*遺伝子破壊株において、隣接する細胞に溶菌が伝播する割合が増加した。しかし、AoFus3が隔壁孔における溶菌の伝播を防ぐ機能に関与する機構は不明である。最近我々は、AoFus3と相互作用し、隔壁孔に局在するタンパク質を2つ同定したので[2)]、今回、これらの機能解析を行った。

【方法・結果】

AoFus3と相互作用する2つのタンパク質は、各種データベースを検索したところ機能未知であることがわかったため、RACE解析によりそれぞれの遺伝子のコード領域を推定した。EGFPとの融合タンパク質として発現させ局在を観察した結果、両タンパク質ともにAoFus3と同様な隔壁孔を取り囲むリング状の局在を示した。これらの遺伝子破壊株を作製し、表現型解析を行ったところ、両遺伝子破壊株ともに分生子形成効率の低下を示した。次に隔壁孔での機能を調べるため、寒天培地上に生育させた麹菌のコロニーに水を滴下して、人工的に急激な低浸透圧条件を作り出すことにより菌糸先端細胞の溶菌を誘導した[3)]。その結果、両遺伝子破壊株において隣接する細胞に溶菌が伝播する割合が増加し、これは*Aofus3*遺伝子破壊株と同様の結果であった。

以上の結果から、前述の2種のタンパク質が隔壁孔においてAoFus3と相互作用することで、溶菌の伝播を防ぐ機能に関与していることが示唆された。現在、これらのタンパク質とAoFus3との溶菌の伝播を防ぐ機構における関係を解析している。

1) 佐々木ら、2011年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 116.
2) 丸山ら、2011年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 116.
3) Maruyama *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 331, 1081-1088.

Aspergillus oryzae, MAP kinase, septal pore

講演番号：4B18a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ B校舎18会場

麹菌AoSOタンパク質のストレス応答性の凝集が隔壁孔に局在する機構の解析

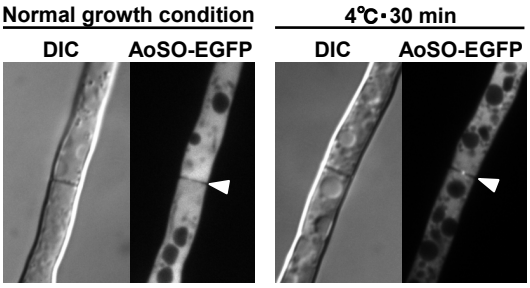
Localization mechanism of AoSO aggregation at the septal pore under stress conditions

○佐伯 圭、ESCAÑO Cristopher Salazar[1]、丸山潤一、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工、[1]BIOTECH-UPLB）

○Kei SAEKI, Cristopher Salazar ESCAÑO[1], Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo、[1]BIOTECH-UPLB)

【目的】

SO/Pro40は子嚢菌類に属する糸状菌に特異的に存在するタンパク質であり、有性生殖や菌糸融合に関与することが報告されている。我々は麹菌*Aspergillus oryzae*がこれと相同性を有するタンパク質AoSOをもつこと、またAoSOがストレスに応答して隔壁孔に凝集することを初めて明らかにした[1)]。このことから、AoSOが隔壁孔を介した細胞間連絡をストレス依存的に制御している可能性が示唆された。しかし、AoSOが隔壁孔特異的にストレス応答性の凝集を示すための制御機構は不明である。そこで今回は、AoSOタンパク質の各領域を欠失させた変異体を*A. oryzae*において発現させ、ストレス応答性の凝集が隔壁孔に局在するのに必要な領域の同定を試みた。



【方法および結果】

AoSOにEGFPを融合したタンパク質を発現させ、細胞内のAoSOの挙動を蛍光顕微鏡によって観察した。1195アミノ酸からなるAoSOタンパク質を効率良く解析するため、まず最初に酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いて欠失変異体の発現・スクリーニングを行い、AoSOの556-1146アミノ酸の領域がストレス応答性の凝集に必要かつ十分であることを確認した[2)]。次に、*A. oryzae*においてこの欠失変異体AoSO[556-1146]をEGFPと融合させて発現させたところ、細胞質にストレス応答性の凝集が観察されたが、隔壁孔には見られなかった。そこで、この領域にさらに他の領域を付加して同様に観察した結果、C末端の約50アミノ酸を加えた欠失変異体AoSO[556-1195]が正常に隔壁孔への局在を示した。以上のことから、AoSOの凝集が隔壁孔に局在するのにこのC末端領域（AoSO[1147-1195]）が必要であることが示された。また、寒天培地で生育したコロニーに水をかけ先端細胞を溶菌させる低浸透圧ショック実験[3)]において、欠失変異体AoSO[556-1195]が隣接する細胞への溶菌の伝播を防ぐのに十分であることが示唆された。現在はAoSOと相互作用する候補因子の解析を進めており、その破壊株の表現型やAoSOの各欠失変異体との特異的な相互作用を調べている。

1) Maruyama *et al.* (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 391, 868-873.
2) 佐伯ら、2011年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 116.
3) Maruyama *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 331, 1081-1088.

Aspergillus oryzae, stress, septal pore

講演番号：4B18a15
講演日時、会場：3月25日11:54～ B校舎18会場

麹菌*A. oryzae*の菌糸融合における菌核形成促進因子SclRの過剰発現の効果

Overexpression effects of SclR, a sclerotial formation regulator, on hyphal fusion ability in *Aspergillus oryzae*

和田 龍太、金 鋒傑[1]、小山 泰二[1]、○丸山 潤一、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工、[1]野田産研）

Ryuta WADA, Feng Jie JIN[1], Yasuji KOYAMA[1], ○Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, [1]Noda Ins. Sci. Res.)

【目的】

麹菌*A. oryzae*は有性世代が見つかっておらず、交配ができないため複数の株の優良な表現型を同時に備えた株の育種を効率的に行うことが困難である。しかし、ゲノム解析により有性生殖関連遺伝子をもつことが明らかになり、有性生殖を行う可能性が示されている。菌核(sclerotium) は菌糸が融合を繰り返して密集した厚膜の小粒塊であり有性世代の構造である子嚢殻(perithecium)と似ている。*A. oryzae*では菌核の形成能が低下しており、このことが有性世代の発見を困難にしている一因と考えられる。接合型の異なる菌株の菌糸が融合し、それぞれの核が同一細胞内に存在すれば、菌核内で核融合・減数分裂を経て有性胞子が形成されるのではないかと期待される。しかし、*A. oryzae*での有性生殖に関する菌核形成や菌糸融合の知見は非常に乏しい。本研究では、*A. oryzae*での菌糸融合能の評価系を構築し、菌核形成促進因子SclR[1)]の過剰発現による効果を検討した。

【方法と結果】

*A. oryzae*において菌糸融合を検出するため、アデニン要求性(Δ*adeB*)をもちさらに核を緑色蛍光で可視化した株、ウリジン/ウラシル要求性(Δ*pyrG*)をもちさらに核を赤色蛍光で可視化した株をそれぞれ作製した。それらの株を寒天培地で約2週間対峙培養し、コロニーの境界線上に形成された菌核を最少培地に植えたところ菌糸の生育が見られ、お互いの栄養要求性の相補が確認された。蛍光顕微鏡で観察すると、核には緑色・赤色両方の蛍光がみとめられた。これらのことから、形成した菌核内で異なる株の菌糸が融合したことが示唆された。さらに、液体培地の混合培養において、1~2日で異なる株の表現型をあわせもつ菌糸を得ることに成功した。これにより、対峙培養と比べて菌糸融合を検出するまでの時間を大幅に短縮することができた。以上の結果から、*A. oryzae*における菌糸融合能を解析するシステムを確立した。

上記のシステムを用いて、*A. oryzae*においてSclRを過剰発現させ、菌糸融合能における効果を検討した。その結果、寒天培地での対峙培養において、SclRの過剰発現により菌糸融合を経て形成したと考えられる菌核の割合が有意に上昇した。現在、液体培地での混合培養におけるSclR過剰発現による効果について検討している。

1) Jin *et al*. (2011) *Eukaryot. Cell* Vol. 10, 945-955.

Aspergillus oryzae, cell fusion, sclerotium

講演番号:4B19a01
講演日時、会場:3月25日09:00～ B校舎19会場

枯草菌-放線菌細胞融合による放線菌染色体への遺伝子の導入

Insertion of large DNA into Streptomyces linear genome.

○松田卓也[1], 板谷光泰[2], 片岡正和[1], ([1]信州大学大学院、[2]慶応義塾大学先端生命科学研究所)

○ Takuya Matsuda[1],Mitsuhiro Itaya[2],Masakazu Kataoka[1],([1]Grad. Sch. Eng. Shinshu Univ.[2]IAB, Keio Univ)

【目的】微生物発酵による酒や抗生物質などは、我々人類に有益なものをもたらしている。解析技術の発展により微生物の代謝制御は新時代に入ってきている。中でも遺伝子工学を用いた生合成反応のゲノムマイニングは盛んに研究されているが染色体レベルでの大規模 な遺伝子組み換えは、対象のDNAが大型化するほど困難さが増す。ゲノム操作技術での成功例ではベンター研の人工マイコプラズマゲノムの全合成(1)がある。本研究では放線菌の二次代謝産物の生産能力の高さと巨大な遺伝子を安定的に保持できる枯草菌ゲノムベクターシステム(2)を用いた、放線菌ゲノム上への大型遺伝子クラスター導入を最終目標にその手法の開発を試みた。

【概要・方法】通常の微生物は環状型のゲノム形状であるが複製起点から複製終了地点までの対称性を要求し、おおむねゲノムサイズが8Mbp以上だと構造上安定でないとされる。しかし放線菌は微生物では珍しい線状の染色体を持つため、対称性は問題とならず、またサイズ的には野性型で10Mbを超えるゲノムを有する種が存在しており、これらサイズや形状のバリアを解決できる可能性がある。枯草菌ゲノムベクターで構築した遺伝子にactinophageの*attP-int*システムを挿入し放線菌染色体に組み込む系の樹立を短期目標とした。遺伝子導入には放線菌―枯草菌プロトプラストによる細胞融合を用いた.

【結果】今回我々は放線菌―枯草菌のプロトプラストによる細胞融合を蛍光色素で標識することにより確認した。枯草菌に持たせたプラスミドにactinophageの*attP-int*システムを挿入した系を用いて細胞融合による遺伝子導入の条件を決定した。さらに枯草菌ゲノムベクターの導入を試みたところ、薬物耐性遺伝子マーカーの組み込みは確認できた。現在どのような組み込みが起こっているのかを検証中である。

【参考文献】

1) J. Craig Venter, Daniel G. Gibson science. 20 May 2010 1190719

2) Mitsuhiro Itaya, Kenji Tsuge Proc Natl Acad Sci 16 September 2005

講演番号：4B19a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ B校舎19会場

枯草菌における納豆菌挿入配列の転移制御機構に関与する宿主因子の探索

Exploration of host factor involved in the IS transpositon in *Bacillus subtilis*.

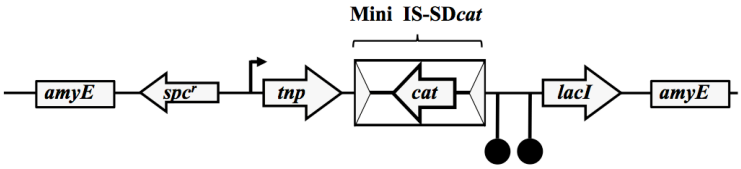
○明石基洋、茂木俊丞、大河内悠貴、高橋究、千葉櫻拓、加田茂樹[1]、山上圭吾[1]、関根靖彦[2]、吉川博文　（東京農大・バイオ、[1]ミツカン中研、[2]立教大学・理）

○Motohiro Akashi, Shunsuke Moki, Yuki Okoji, Kiwamu Takahashi, Taku Chibazakura, Shigeki Kada[1], Keigo Yamagami[1], Yasuhiko Sekine[2], Hirofumi Yoshikawa

(Dept of Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [1]Central Res. Inst., Mitsukan Group Co., Ltd, [2]Dept. of Life Sci., Rikkyo Univ.)

【目的】トランスポゾンの転移は宿主DNAの改変を招くが、これは進化の可能性を内包する一方で宿主にとっては細胞機能の恒常性維持という点において大きな問題となる。そのため、宿主細胞はトランスポゾンの転移制御機構を有することが示唆されているが、枯草菌においてその実体は不明である。納豆菌(*Bacillus subtilis* natto)はゲノム中にトランスポゾンの一種である挿入配列（IS)を複数持つ。一方、枯草菌168株は納豆菌に近縁であるにも関わらずISをもたない。我々はこの点に着目し、納豆菌のISを枯草菌168株に導入した株を構築し、転移制御機構に関与する宿主遺伝子の探索を行った。

【方法】納豆菌ISの枯草菌168株内での転移頻度を、枯草菌において定量的に計測できるJumping CAT Assayを構築した（図I)。7種の納豆菌IS（IS*4Bsu1*, IS*256Bsu1*, IS*3*, IS*4*, IS*5*, IS*8*, IS*9*)の転移活性を比較した。その中で唯一非常に高い転位頻度を示したIS*256Bsu1*を用い、ISの転移頻度を変化させる遺伝子の同定を試みた。



図I. Jumping CAT Assay使用株のコンストラクト

【結果】納豆菌各ISの転移頻度の比較により、枯草菌内ではIS*256Bsu1*が非常に高い転移活性を有する事が分かった。またISの転移活性はコンピテンス誘導培地で培養した際に顕著に高かった。ISの転移頻度を変化させる遺伝子の探索において、コンピテンス関連遺伝子群のマスターレギュレーターである*comK*や、その制御因子である*comA*, *comP*をそれぞれ破壊した株では転移頻度が低下した。また、*comK*の抑制因子である*rok*を破壊することにより、コンピテンス非誘導条件下においても転移頻度が上昇した。このような結果から、*comK*制御下にある因子が転移活性の上昇に必要であると考えられ、下流にある因子の一つである*recA*を破壊したところISの転移がほとんど見られなくなった。以上より、枯草菌においてはRecAがISの転移制御に深く関与する宿主因子であることが示された。

Bacillus subtilis natto, Insertion Sequence, competence

講演番号：4B19a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ B校舎19会場

枯草菌の胞子形成過程に与える *rrn* オペロンコピー数の影響の解析

Effect of the copy number of *rrn* operon on sporulation in *Bacillus subtilis*

○矢野 晃一、和田 哲也、鈴木 祥太、川口 康弘、七宮 英晃[1]、関根 靖彦、河村 富士夫（立教大・理、[1]東大院農生科・応生工）

○Koichi Yano, Tetsuya Wada, Shota Suzuki, Yasuhiro Kawaguchi, Hideaki Nanamiya[1], Yasuhiko Sekine, Fujio Kawamura (Rikkyo Univ., [1]Tokyo Univ.)

枯草菌のリボソームは、*rrn* オペロンがコードする 3 種の rRNA と、57 種のリボソームタンパク質からなる。枯草菌染色体上には *rrn* オペロンが 10 コピー存在する。各 *rrn* オペロンは完全に同一ではなく、染色体上の位置、プロモーターや rRNA 遺伝子の配列に heterogeneity が見出される。枯草菌において生育に必要な *rrn* オペロンのコピー数を調べるべく段階的に *rrn* オペロンを欠失していったところ、全ての *rrn* オペロンについて単一保有株を構築することができた（Nanamiya *et al*., 2010）。また、これらの *rrn* オペロン単一保有株の増殖速度や胞子形成率は野生株と比較して非常に低かった。

今回我々は、野生株並みの増殖速度や胞子形成能を保証する *rrn* オペロンのコピー数を調べるために *rrn* オペロンを 10～1 個保有する株を構築、解析した。その結果、4 コピー以上保有する株の胞子形成率は野生株並みだったが、増殖速度は 10 コピーまで保有させなければ野生株並みまで回復しなかった。また、*rrn* オペロンのコピー数の与える効果は 1 コピーから 2 コピーに増やした時が最も大きかった。さらに、*rrn* オペロンを 2 コピーずつ保有する全ての組み合わせの株を構築し、解析した。その結果、増殖速度、胞子形成率ともに 1 コピーと 3 コピーの間に位置づけられ、*rrn* オペロンに見られる heterogeneity のうち、コピー数が増殖速度等に最も影響を与えることが示唆された。一方で、*rrn* オペロン単一保有株は胞子形成過程初期に欠損があることが示されており（Nanamiya *et al*., 2010）、この点についてさらに解析したところ、胞子形成過程の開始に必須な *spo0A* 遺伝子の発現が遅れていることが分かった。本発表では *rrn* オペロンコピー数の異なる各変異株において胞子形成過程に関わる遺伝子の発現、ならびに *rrn* オペロンにおける heterogeneity の効果などについて解析を行った結果を報告する。

rrn operon, sporulation, *Bacillus subtilis*

講演番号：4B19a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ B校舎19会場

枯草菌べん毛モーター固定子におけるイオン流入経路に関与するアミノ酸残基の同定

Identification of amino acid residues which form the ion-conduction pathway of the flagellar stator complex from *Bacillus subtilis*.

○古山琴美[1,2]、伊藤政博[1,2]（[1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・バイオナノ）

○Kotomi Koyama[1,2], Masahiro Ito[1,2] ([1]Graduate School of Life Sciences and [2]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University)

【背景】べん毛モーターは、細胞膜によって隔てられた H^+ または Na^+ が形成する電気化学ポテンシャル差を利用することにより回転力を発生させている。モーター部分である基部体は回転子と固定子からなり、固定子はイオンチャネルとして機能する。大腸菌など多くの細菌は、H^+ を共役イオンとする H^+ 駆動型固定子 MotAB を持ち、好アルカリ性細菌は、Na^+ を共役イオンとする Na^+ 駆動型固定子 MotPS を持っている。これまでの研究で、大腸菌べん毛モーターの固定子 MotAB において、MotB の膜貫通領域内の保存されたアスパラギン酸残基を他のアミノ酸残基に置換すると運動性が失われることが報告されている。そのため、このアスパラギン酸残基はモーターの回転に重要であり、イオン結合部位であると推定された。さらに、べん毛モーターを持っている様々な細菌においても、MotB（MotS）の同様の箇所にアスパラギン酸残基が高度に保存されている。当研究室で研究されている枯草菌は、MotAB と MotPS の 2 種類の固定子を持っており、MotB の 24 番目と MotS の 30 番目にアスパラギン酸残基が保存されている。

【目的・方法】本研究では、枯草菌べん毛モーター固定子中の推定イオン結合部位であると考えられる保存されたアスパラギン酸残基が運動性に重要であるかどうか、また固定子のイオン入流経路を明らかにすることを目的とした。まず、枯草菌の MotB と MotS の保存されたアスパラギン酸残基を他のアミノ酸残基に置換した変異株をそれぞれ作製し、軟寒天培地での運動性試験を行った。

【結果・考察】軟寒天培地を用いた運動性試験の結果、作製した変異株は運動性を示さなかった。この結果から、MotB の 24 番目と MotS の 30 番目のアスパラギン酸残基はモーターの回転に重要な荷電アミノ酸残基であり、推定イオン結合部位であることが示唆された。さらに、作製した変異株を軟寒天培地上で植えつぐことにより、自然突然変異による運動性向上株の取得を試みた。その結果、複数の運動性向上株の取得に成功した。取得した運動性向上株のシークエンス解析を行ったところ、MotB と MotS の保存されたアスパラギン酸残基をグルタミン酸残基に置換した変異株において、固定子領域内に新たな変異が同定された。これらの変異箇所は、固定子のイオン流入経路の構造に影響を与える可能性が示唆された。

flagellar motor, ion binding site, *Bacillus subtilis*

講演番号：4B19a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ B校舎19会場

タイトル　枯草菌べん毛モーターの固定子における荷電アミノ酸の役割

Title　A role of charged amino acids in the stators of the flagellar motor of *Bacillus subtilis*.

○高橋優嘉[1、2]、伊藤政博[1、2]（[1]東洋大学院・生命科学、[2]東洋大・バイオナノ）

○ Yuka Takahashi[1,2], Masahiro Ito[1,2] ([1]Graduate School of Life Sciences, [2]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University)

【背景】多くの細菌はべん毛と呼ばれる運動器官を回転させることにより自由な遊泳を行うことができる。べん毛は大きく分けて、べん毛繊維であるフィラメント、モーター部分である基部体、べん毛繊維と基部体をつなぐフックの3つの箇所から構成されている。回転駆動力は、特異的なイオン(H^+またはNa^+)が膜を通過する際に形成される電気化学ポテンシャル差を用いている。モーター部分である基部体は主に回転子と固定子から構成されており、特に固定子はイオンチャネルである、エネルギー変換ユニットとして機能する。大腸菌などの多くの細菌ではH^+を共役イオンとするMotABが固定子として報告されており、好アルカリ性細菌や海洋性ビブリオ属細菌ではNa^+を共役イオンとする固定子MotPSおよびPomABが報告されている。これまでの研究から、大腸菌のH^+駆動型モーターでは固定子と回転子間の静電気的相互作用により回転駆動力が発生すると報告されているが、Vibrio属細菌のNa^+駆動型モーターではそのような回転駆動力は関与していないと報告されている。このため、べん毛モーターはH^+駆動型とNa^+駆動型で異なる回転駆動力発生機構が存在する可能性が示唆されている。

【方法】本実験では、1種類の回転子に対してH^+駆動型とNa^+駆動型の2種類の固定子を持つ枯草菌べん毛モーターに注目し研究を行った。駆動力発生に重要と考えられる固定子の細胞質ループに存在する荷電アミノ酸残基の置換変異体を作製し、それらの運動性試験や生理学試験を行った。固定子と回転子間の静電気的相互作用が駆動力発生に重要な役割を果たしているとすれば、荷電アミノ酸残基の置換により、運動性への影響が期待された。また、これまでの研究ではNa^+駆動型の研究においてMotPS型の固定子の研究結果は報告されていないことからNa^+駆動型固定子における新たな知見が得られるのではないかと考えられる。

【結果・考察】本実験から、枯草菌が持つ2種類の固定子H^+型MotAサブユニット、Na^+型MotPサブユニットの細胞質ループに存在する複数の荷電アミノ酸残基がべん毛モーターの回転に重要であることが明らかになった。この結果から、枯草菌のべん毛モーターの回転には、H^+駆動型、Na^+駆動型共に細胞質ループに存在する荷電アミノ酸残基と回転子FliGタンパク質のC末端側に存在する荷電アミノ酸残基と間での静電的相互作用が関与する可能性が示された。また、今回作製した変異株の運動性や固定子の発現量を解析して結果、①固定子の構造の安定化と②回転駆動力発生に寄与するグループに分類できた。

Bacillus subtilis, flagellar motor, stator

講演番号：4B19a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ B校舎19会場

DNA二重鎖切断部位の細胞核内での空間配置におけるSWR1およびINO80クロマチンリモデリング複合体の役割

Distinct roles of SWR1 and INO80 chromatin remodeling complexes in spatial arrangement of DNA double-strand break site in the nucleus

○小西 辰紀[1]、尾間 由佳子[2]、若林 一陽[2]、中山 景樹[2]、島田 健士[3]、Susan Gasser[3]、原田 昌彦[1,2]　([1]東北大・農、[2]東北大・院農、[3]Friedrich Miescher Institute, Basel)

○Tatsunori Konishi[1], Yukako Oma[2], Kazuaki Wakabayashi[2], Keyaki Nakayama[2], Kenji Shimada[3], Susan Gasser[3], Masahiko Harata[1,2]　([1]Facul. Agri., Tohoku Univ., [2]Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Agri.Sci., Tohoku Univ.,[3]Friedrich Miescher Inst., Basel)

【目的】DNA二重鎖切断(DSB)は、細胞死やがん化を誘発する重篤なDNA損傷であり、その修復にはクロマチンリモデリング複合体によるDSB部位周辺のクロマチンの構造変換が必要である。SWR1とINO80クロマチンリモデリング複合体はDSB部位周辺に結合することが知られている。さらに最近の出芽酵母を用いた解析により、DSBを核膜近傍にまで移行させる機構が存在しており、この核内のクロマチン空間配置の変化も修復に関与することが明らかにされた。その際にDSBは、核膜タンパク質であるMps3または核膜孔複合体(NPC)と結合することが示されており、この結合によって不必要なDNA鎖の組み換えが抑制されていると考えられている。しかし、DSBの核内空間配置を制御する機構は明らかにされていない。我々は、クロマチンの構造変化に加え、DSBの核膜近傍への移行にもSWR1とINO80クロマチンリモデリング複合体が関与していると予想し、両複合体の欠損によって、DSBの核膜近傍への移行がどのように変化するかを解析した。

【方法】解析には、ガラクトース添加によりMAT遺伝子座特異的に単一のDSBを導入することができる出芽酵母を用いた。*SWR1*を欠損させたSWR1複合体変異株および*ARP8*を欠損させたINO80複合体変異株を用いて、DSBを導入後、経時的にDSBのMps3への結合、およびDSBのNPCへの結合をクロマチン免疫沈降法により検出した。

【結果】野生株と比較して、SWR1複合体変異株ではDSBのMps3への結合、およびDSBのNPCへの結合が共に著しく低下していた。この結果は、SWR1複合体がDSBの核内空間配置に必要であることを示している。一方、INO80複合体変異株では、DSBのMps3への結合は著しく低下していたが、DSBのNPCへの結合は野生株と同程度か、さらに強い結合が観察された。これらの結果は、SWR1複合体とINO80複合体が異なる機構によって、DSBの核膜近傍への移行に寄与していることを示唆している。

double-strand break, chromatin-remodeling complex, actin-related protein

講演番号：4B19a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ B校舎19会場

遺伝子内でのドメイン配列移動（DoMo）：タンパク質の構造機能変換の新しい機構

Domain movement within a gene: a novel mechanism for protein structure/function switching

古田芳一[1,2]、河合幹彦[1,2,3]、内山郁夫[3]、○小林一三[1,2,4]（[1]東大・新領域、[2]東大・医科研、[3]基生研、[4]東大・理）

Yoshikazu Furuta[1,2], Mikihiko Kawai[1,2,3], Ikuo Uchiyama[3], ○Ichizo Kobayashi[1,2,4*]

1 Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan, 2 Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan, 3 Laboratory of Genome Informatics, National Institute for Basic Biology, Okazaki, Aichi, Japan, 4 Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan

タンパク質の機能は、その特定の位置にあるドメインのアミノ酸配列によって規定される。私たちは、同じ遺伝子の複数のドメインの間をアミノ酸配列が移動することを発見し、「ドメイン移動」(Domain Movement, DoMo)と名付けた。

この発見は、ピロリ菌の世界各地の株の全ゲノム配列を比較することによって得られた。I型の制限修飾系の配列特異性決定サブユニットでは、N側の標的認識ドメイン(TRD)1が認識配列の5’側を、C側のTRD2が3’側を認識する。そっくりの配列が、同じ座の遺伝子のTRD1にもTRD2にも存在することから、配列がこれらのドメイン間を移動したことが示唆された。これらの遺伝子の構成は、x-TRD1-y-x-TRD1-yで表される。x,yの長さは20-50 bpである。配列比較から、xとyでのDNA組換えによって「ドメイン移動」が起きる事が強く示唆された。「ドメイン移動」はピロリ菌のIIG型制限修飾系遺伝子、他の細菌のI型制限修飾系遺伝子でも発見された。

これは、全く新しい遺伝子とタンパク質の構造機能変換と進化の機構と考えられる。TRDの配列レパートリーに10種類があれば、「ドメイン移動」を含む配列の取り替えによって、10 x 10 = 100通りのDNA配列認識が実現すると推測される。このような遺伝子（座）がピロリ菌での場合のように４つあれば、100 x 100 x 100 x 100 = 100000000通りの配列認識パターンが実現される。これによって、ひとつのゲノム配列について100000000通りのエピゲノムが生じうる。これらが遺伝子伝達隔離の単位だけでなく、互いに僅かに異なるトランスクリプトームを規定することが推測される。「この無数のエピゲノムこそが、適応進化の基本単位となる」という、「エピゲノム進化モデル」を提唱する。

Yoshikazu Furuta, Mikihiko Kawai, Ikuo Uchiyama, Ichizo Kobayashi. PLoS ONE, 6(4): e18819 (2011)

Epigenetics, DNA methylation, recombination

講演番号：4B19a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ B校舎19会場

プロファージSPβ *nonA*遺伝子によるSP10ファージ感染防御機構の解析

Functional analysis of protection against SP10 phage infection by *nonA* gene of SPβ.

○山本　達也、Yee Lii Mien[1]、朝井　計[2]、中村　幸治（筑波大院生命環境、[1]東大生物工学セ、[2]埼玉大院理工・分子生物）

○Tatsuya Yamamoto, Lii Mien YEE[1], Kei Asai[2], Kouji Nakamura (University of Tsukuba, [1]The University of Tokyo, [2]Saitama University)

枯草菌Marburg株はSP10ファージの感染に対して耐性を持ち、*nonA*、*nonB*両遺伝子の変異によりSP10ファージの感染に対して感受性となる（Saito H *et al.* 1979. Mol Gen Genet.）。*nonB*遺伝子は枯草菌の制限系（*ydiR-ydiS-ydjA*オペロン）であり、*nonA*遺伝子は枯草菌プロファージSPβ領域内に存在する（Matsuoka S *et al.* 2004. Genes Genet Syst.）。SPβ領域の部分欠失により*nonA*遺伝子は*bnrdE-bnrdF*遺伝子間領域を含む826 bp内に存在し、*bnrdE-bnrdF*の逆鎖からアンチセンスRNAとして転写されていることが示唆された（Yee LM *et al.* 2011. Genes Genet Syst.）。そこで、本研究では*nonA*遺伝子の同定を行うと共に、*nonA*遺伝子によるSP10ファージ感染防御機構の解明を目的として行った。

*nonA*遺伝子の発現を確認するために枯草菌ASK3000株（Δ*nonB*）及びASK3002株（ΔSPβ、Δ*nonB*）にSP10ファージを感染させ、感染後0, 5, 15, 30, 45, 60分後に集菌、RNAを抽出し、RNAプローブを用いたノーザンブロットを行った。RNAプローブは*nonA*遺伝子がコードされていると示唆されている*bnrdE-bnrdF*遺伝子間領域を含む826 bpを*bnrdE*を含む領域と*bnrdF*を含む領域の2領域に分割し、それぞれセンスRNAプローブ、アンチセンスRNAプローブを作製し、用いた。その結果、*bnrdE*を含むセンスRNAプローブにより、約350 ntのバンドがASK3000株でのみ検出され、*nonA*は*bnrdE*のアンチセンス鎖で転写されていることが明らかとなった。また、その発現はファージ感染後5分では観察されず、感染後15分から発現し、30分で発現量が最大となることが明らかとなり、*nonA*による感染防御機構はファージ感染初期では機能せず、感染中期から後期にかけて機能することが示唆された。次に、ファージ感染時特異的な*nonA*遺伝子の転写領域を明らかにするためにファージ感染後30分のRNAを用いて5’/3’ RACEを行い、*nonA* RNAの5’末端と3’末端を同定した。その結果、*nonA*は370 ntのRNAとして転写されており、その内、3’領域の130 ntが*bnrdE* ORFとオーバーラップしていた。また、*nonA*転写領域内には72アミノ酸をコードするORFが予測された。

Bacillus subtilis., SP10, bacteriophage

講演番号：4B19a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ B校舎19会場

乳酸菌由来ゲノムDNAの抗炎症作用機構に関する研究

Study on anti-inflammatory effect of genomic DNA from lactic acid bacteria

○平松征洋、佐藤朝光、入江圭一、椎村翔太、奥野隆啓、Tanjina Sharmin、福光由起、上田紗織、中島幸彦、見明史雄、鹿志毛信広（福岡大・薬）

○Yukihiro Hiramatsu, Tomomitsu Satho, Keiichi Irie, Shota Shiimura, Takahiro Okuno, Tanjina Sharimin, Yuki Fukumitsu, Saori Uyeda, Yukihiko Nakashima, Fumio Miake, Nobuhiro Kashige (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University)

【目的】

多くの研究者が乳酸菌の抗炎症作用について報告しているが、その有効成分に関する研究は十分に行われていない。我々は、乳酸菌に含まれる有効成分として、乳酸菌のゲノムDNAに注目した。本研究では、H_2O_2を用いてヒト腸管上皮由来Caco-2細胞に炎症を誘発させ、炎症の指標であるIL-8の遊離量を測定することで、乳酸菌のゲノムDNAが抗炎症作用を持つかどうか調べた。さらに、小胞体やエンドリソソームに分布し、細菌のDNAを特異的に認識する受容体Toll-like receptor 9 (TLR9)と炎症性サイトカインなどの発現を誘発する転写因子nuclear factor-κB (NF-κB)およびInhibitor of NF-κB-α (IκB-α)との関連性を検討し、抗炎症作用機構の解明を試みた。

【方法】

Caco-2細胞にH_2O_2と5種類の*Lactobacillus*属乳酸菌（*L. acidophilus*、*L. casei*、*L. gasseri*、*L. plantarum*、*L. reuteri*)および大腸菌から抽出したゲノムDNAを曝露し、培養上清中へのIL-8遊離量をELISAで測定した。さらに、作用機構を解明するために、*L. casei*由来ゲノムDNAの抗炎症作用に焦点を当て、以下の項目を行った。1) *L. casei*の16s rRNA遺伝子に対するPCR法により、*L. casei*由来ゲノムDNAのCaco-2細胞内への侵入を確認した。2) RNAi法によりTLR9の発現を抑制したCaco-2細胞を用いて、*L. casei*由来ゲノムDNAのIL-8遊離抑制作用を評価した。3) H_2O_2と*L. casei*由来ゲノムDNAを曝露したCaco-2細胞から、時間依存的に細胞質と核を分画し、NF-κBの核内移行およびIκB-αの分解をWestern Blotで解析した。

【結果】

すべての乳酸菌ゲノムDNAは、Caco-2細胞においてH_2O_2により誘発されたIL-8の遊離を抑制することを明らかにした。しかし、大腸菌ゲノムDNAにこの作用は観察されなかった。また、最も高い抗炎症作用を示した*L. casei*由来ゲノムDNAの作用機構について検討した結果、1) H_2O_2の存在下で、*L. casei*由来ゲノムDNAがCaco-2細胞内に侵入すること、2) TLR9の発現を抑制したCaco-2細胞では、*L. casei*由来ゲノムDNAのIL-8遊離抑制作用が減少すること、3) *L. casei*由来ゲノムDNAは、H_2O_2を曝露したCaco-2細胞においてNF-κBの核内移行およびIκB-αの分解を抑制すること、さらに、この作用はTLR9シグナルに依存していることを明らかにした。これらの結果は、乳酸菌ゲノムDNAが細胞内へ侵入後、TLR9シグナルを介して、NF-κBの核内移行・IκB-αの分解を抑制することで、H_2O_2により誘発されるIL-8の遊離を抑制することを示している。

lactic acid bacteria, genomic DNA, anti-inflammatory effect

講演番号：4B19a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ B校舎19会場

有機塩素系殺虫剤γ-HCH分解細菌*Sphingobium japonicum* UT26株の炭素源非添加無機寒天培地上で生育する突然変異株の遺伝学的解析

Molecular genetic studies on oligotrophic mutants of a γ-HCH-degrading bacterial strain, *Sphingobium japonicum* UT26

○平野　丈、宇井　博紀、大坪　嘉行、永田　裕二、津田　雅孝（東北大院・生命科）
○Joe Hirano, Hiroki Ui, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda（Grad. Sch. of Life Sci., Tohoku Univ.）

【背景・目的】好気性従属栄養環境細菌は極貧有機炭素源環境下でも生育可能な機構を潜在的に有していると様々な状況証拠から推定されているが、その詳細は不明である。我々は、有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH)を唯一炭素源として生育・資化する好気性従属栄養細菌*Sphingobium japonicum* UT26株の研究過程で、炭素源非添加無機寒天培地上でコロニーが可視できるほどに生育するトランスポゾン挿入突然変異株を数株取得した。これら突然変異株のうち、複数株において、アルコールデヒドロゲナーゼと有意な相同性を示す遺伝子（*adhX*）の上流域にトランスポゾンが挿入されており、トランスポゾン上に存在する構成的なプロモーター活性による*adhX* 高発現が炭素源非添加無機寒天培地上での生育の要因であると予想された。本研究では、トランスポゾン突然変異株が本表現型を示す分子機構の解明を目的として、主に*adhX* に注目した解析を進めた。
【方法・結果】放射性ラベルで標識した$^{14}CO_2$の取り込み実験で、これら突然変異株が野生株に比べて効率的に大気中CO_2を生体成分として固定していることが判明した。UT26株の全ゲノム配列は解読済みであるが、既知のCO_2固定経路の鍵酵素をコードしていると推定される遺伝子は見出されず、新規のCO_2固定経路の存在が示唆される。一方、(i) RT-PCR解析で突然変異株で*adhX*が野生株より高発現していること、(ii) 構成的高発現プロモーターの支配下に*adhX* をおいた広宿主域ベクタープラスミドを野生株に導入した*adhX* 高発現株も同様の表現型を示すことから、*adhX* の高発現が本表現型の直接の要因であると結論した。*adhX* 産物は、NAD 依存的アルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）活性、または、ホルムアルデヒドジスムターゼ（FDM）活性を有すると予想され、現在、これらの活性が本表現型に必要であるか、(i) 活性に必須なアミノ酸残基に部位指定変異を導入した変異型*adhX*遺伝子の解析、(ii) 酵素活性の測定、などを通じて検討を行っている。さらに、*adhX* 高発現株のトランスポゾン挿入突然変異株のライブラリーを構築し、コハク酸添加無機寒天培地では生育するが、有機炭素源非添加無機寒天培地では生育不能な株を選択した。得られた複数の目的変異株のトランスポゾン挿入部位について、現在解析を進めている。

CO_2 fixation, *Sphingbium*, oligotroph

講演番号：4B19a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ B校舎19会場

海洋性紅色非イオウ光合成細菌*Rhodovulum sulfidophilum*の*ctrA*遺伝子はフロック形成に関与する

Response regulator gene, *ctrA*, is involved in the flocculation of the marine phototrophic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*

○山本　絢也、小松　浩之、鈴木　宏道、梅影　創、田中　照通、菊池　洋（豊橋技科大・環境・生命工学）

○Junya Yamamoto, Hiroyuki Komatsu, Hiromichi Suzuki, So Umekage, Terumichi Tanaka, Yo Kikuchi (Toyohashi Tech.)

【目的】海洋性紅色非イオウ光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* は α-プロテオバクテリアに属するグラム陰性細菌である。本菌は菌体外へ核酸を生成し、これを利用して菌の凝集体であるフロックを形成する能力を持つ (1)。しかし現在のところ、本菌のフロック形成機構の詳細な解析は行われていない。 *Rdv. sulfidophilum* の近縁種である *Rhodobacter capsulatus* はフロック形成の報告はないが、ウィルス様粒子 (Gene transfer agent : GTA) に自己のゲノム DNA を内包し菌体外へ生産することが知られており、この GTA 生産機構は、転写制御因子 CtrA によって制御されている。*ctrA* 遺伝子は α-プロテオバクテリアに属する多くの細菌のゲノム上にコードされており、様々な遺伝子の発現制御を行うことが知られている。本研究は、*Rdv. sulfidophilum* の *ctrA* 遺伝子を同定し、本菌のフロック形成に *ctrA* 遺伝子が関与しているか否かを明らかにすることを目的とする。

【方法と結果】まず我々は、サザンブロッティング及びノーザンブロッティングによりこの *ctrA* 遺伝子が本菌のゲノム上にもコードされ、転写されていることを明らかにした。また本菌の *ctrA* 遺伝子を単離し、塩基配列解析を行った。同定した *ctrA* 遺伝子と *Rba. capsulatus* の *ctrA* 遺伝子とを比較したところ、83%の高い相同性を示した。さらに、相同組換えにより本菌の *ctrA* 遺伝子欠損株を作製したところ、*ctrA* 遺伝子欠損株のフロックの形成能が失われた。CtrA 発現ベクターを作製し、*ctrA* 遺伝子欠損株に組み込んだところ、フロックの形成能が回復した。これらの結果より、本菌の *ctrA* 遺伝子がフロック形成に関与していることが明らかになった。

(1) Suzuki, H. *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 349-356 (2009)

Rhodovulum sulfidophilum、flocculation、*ctrA*

講演番号：4B19a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ B校舎19会場

*Pyrococcus horikoshi*のメチルマロニルCoAムターゼのサブユニット構造

Functional and Structural Analysis of Methylmalonyl-CoA Mutase from *Pyrococcus horikoshii.*

○薮田 行哲、亀井 由起子、米田 一成[1]、櫻庭 春彦[2]、大島 敏久[3]、中野 長久[4]、渡辺 文雄（鳥取大・農・生資環、[1]東海大・農・バイオ、[2]香川大・農・応用生、[3]九州大院・農・遺資工、[4]阪府大・生資センター）

○Yukinori Yabuta, Yukiko Kamei, Kazunari Yoneda[1], Haruhiko Sakuraba[2], Toshihisa Ohshima[3], Yoshihisa Nakano[4], Fumio Watanabe (Fac. Agr. Tottori Univ., [1]Dept. Biosci. Tokai Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Sci. Kagawa Univ., [3]Inst. Genetic Resources Kyushu Univ., [4]Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.）

【目的】メチルマロニルCoAムターゼ（MCM）は*R*-メチルマロニルCoAとスクシニルCoAの異性化反応を触媒し、その反応にはアデノシルビタミンB_{12}（AdoB_{12}）を要求する。MCMは様々な生物から発見されており、生物種によりαααとααβの異なる二量体サブユニット構造を有する。しかしながら、アーキアのMCMについては報告がなく、生物がB_{12}をいつから代謝に取り入れてきたのか興味深い。そこで、アーキアのゲノム情報よりMCM遺伝子を検索したところ、多くのアーキアに哺乳動物のαサブユニットに類似する配列が保存されていた。しかしながらそれは、B_{12}結合ドメインを含む部分とそれ以外の触媒部分が別々の遺伝子に分かれてコードされていた。特に*P. horikoshii*ではB_{12}結合ドメイン(PH0275)と触媒ドメイン(PH1306)をコードする遺伝子は離れて存在していた。そこで、アーキアのMCMの分子特性を明らかにするため、*P. horikoshii*のPH0275とPH1306のリコンビナントタンパク質を調製し、MCM活性およびサブユニット構造について解析を行った。

【方法】pET16を用いPH0275およびPH1306の大量発現系を構築し、大腸菌内でリコンビナント酵素を発現させた。発現タンパク質は各種クロマトグラフィーにより精製し、HPLCを用いてMCM活性を測定した。

【結果】PH0275とPH1306のリコンビナントタンパク質を精製した結果、PH1306のみ、精製タンパク質に加え小さい分子量のバンドが認められた。ウエスタンブロティングおよびアミノ酸シークエンスにより、このタンパク質はN末端側が切断されたPH1306タンパク質であることが明らかとなった。そこで、切断される部位を除いたPH1306タンパク質の発現系を作成し実験に用いた。

次に、精製PH0275およびPH1306タンパク質を用いてMCM活性の測定を行った結果、PH0275もしくはPH1306タンパク質単独ではMCM活性を示さず、両タンパク質を混和させた場合にのみAdoB_{12}依存MCM活性が認められた。そこで、この部分を含まないPH1306タンパク質の発現系を構築した。また、これらを等モルで混和することにより最大のMCM活性を示した。Blue-native PAGE、ゲル濾過により、PH0275とPH1306はそれぞれ2分子よりなるヘテロ四量体である事が明らかとなり、この構造の形成にはAdoB_{12}の存在が必須であった。

methylmalonyl-CoA mutase, vitamin B_{12}, *Pyrococcus horikoshii*

講演番号：4B19a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ B校舎19会場

相同性組換えによる超好熱始原菌ランダム変異法の確立

Development of random insertional mutagenesis by homologous recombination in hyperthermophilic archaeon

○足立　恭子、折田　和泉、中村　聡、今中　忠行[1]、福居　俊昭（東工大院生命理工・生物プロセス、[1]立命館大・生命科学・生物工学）
○Kyoko Adachi, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Tadayuki Imanaka[1], Toshiaki Fukui (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. & Biotechnol., Tokyo Tech., [1]Dept. Biotech., Col. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【目的】超好熱始原菌*Thermococcus kodakarensis*はゲノム解析がなされ、また超好熱菌としては世界で初めての遺伝子操作系が確立されていることから、超好熱菌研究における有用なモデル生物である。一方、本菌において2306個の遺伝子が推定されているが、その遺伝子機能の約半数は不明であり、これら機能未知遺伝子の機能解明が課題である。遺伝子機能を解析する手法として、染色体にランダムな変異をかけ、その変異体の表現型を指標とした解析を行うランダム変異法は有効な手段である。そこで本研究では*T. kodakarensis*における相同性組換えを利用したランダム変異法の確立を目的とした。

【方法】*T. kodakarensis*ゲノムDNAを超音波処理によって断片化し、アガロースゲル電気泳動により約2-3 kbpのゲノムDNA断片を回収した。この断片に3'-A付加し、T-ベクターであるpMT20とライゲーション後、*E. coli* DH5αを形質転換して*T. kodakarensis*ゲノムライブラリーを作製した。また、*T. kodakarensis*内で機能するマーカー遺伝子*pdaD* (アグマチン生合成遺伝子) と*E. coli*で機能するゲンタマイシン耐性遺伝子および*E. coli*における複製起点であるR6Kγ oriを配したトランスポゾンを作製した。EZ-Tn5 Transposaseを用いて*in vitro*でゲノムライブラリーへのトランスポゾン転移反応を行い、*E. coli* HST08株を形質転換してゲンタマイシン耐性株を選抜することでトランスポゾン転移ライブラリーを作製した。このトランスポゾン転移ライブラリーを用いて*T. kodakarensis* Δ*pdaD*株（アグマチン要求性）を形質転換し、アグマチン非含有個体培地で選抜した。

【結果】超音波処理による断片化ゲノムDNAから約3×10^4クローンからなる*T. kodakarensis*ゲノムDNAライブラリーを作製した。このライブラリーにトランスポゾンを*in vitro*転移させ、約1×10^5個のゲンタマイシン耐性クローンからなるトランスポゾン転移ライブラリーを作製した。得られたクローンのうち、およそ70%において*T. kodakarensis*ゲノムDNA断片内へトランスポゾンが転移していた。このトランスポゾン転移ライブラリーを用いて*T. kodakarensis* Δ*pdaD*株を形質転換し、アグマチン要求性が相補された形質転換体を多数取得した。得られた形質転換体についてPCR解析およびサザンブロッティング解析を行ったところ、トランスポゾンがランダムに宿主染色体に挿入されていることを確認した。さらに、得られた形質転換体からR6Kγ oriを利用したトランスポゾン挿入領域のレスキューについて検討した。

Hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*, random mutagenesis, homologous recombination, transposon

講演番号：4B19a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ B校舎19会場

高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* のゲノム上に見出されたフィトエンデヒドロゲナーゼ遺伝子ホモログの解析

Analysis of phytoene dehydrogenase gene homologs found in *Haloarcula japonica* genome

○安藤 藍、八波利恵、高市真一[1]、福居俊昭、仲宗根薫[2]、藤田信之[3]、関根光雄[3]、高品知典[4]、中村 聡 (東工大院生命理工、[1]日本医大生物、[2]近畿大工、[3]NITE、[4]東洋大生命科)

○Ai Ando, Rie Yatsunami, Shinichi Takaichi[1], Toshiaki Fukui, Kaoru Nakasone[2], Nobuyuki Fujita[3], Mitsuo Sekine[3], Tomonori Takashina[4], Satoshi Nakamura (Tokyo Tech, [1]NMS, [2]Kinki Univ., [3]NITE, [4]Toyo Univ.)

【目的】植物や細菌が生産するカロテノイドは、8 つのイソプレン（C_5）単位が結合した C_{40} の構造をもつ。一方で、ある種の高度好塩性古細菌は C_{50} のカロテノイドを生産することが知られている。しかしながら、高度好塩性古細菌の生産するカロテノイド種の詳細、およびカロテノイド生合成系に関与する遺伝子はいまだ明らかにされていない。最近になり、高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* の全ゲノム配列が明らかにされた。本研究では、*Ha. japonica* におけるカロテノイド生合成系の解明を目的とした。すなわち、細菌のカロテノイド生合成系においてフィトエンからリコペンに至る 4 段階の不飽和化反応への関与が知られているフィトエンデサチュラーゼ（CrtI）に注目し、*Ha. japonica crtI* 遺伝子ホモログの解析を行った。

【方法と結果】*Ha. japonica* の全ゲノム配列のアノテーションの結果、*crtI* 遺伝子と相同な 4 つの遺伝子ホモログが見出された。このうち、相同性のより高い 2 つの遺伝子ホモログ（*c0507* および *d1086*）の破壊株を構築した。*d1086* 遺伝子破壊株の生産するカロテノイド類は野生株と同様であった。一方で、野生株のコロニーがバクテリオルベリン由来の赤色を呈するのに対し、*c0507* 遺伝子破壊株のコロニーは黄色となった。*c0507* 遺伝子破壊株の生産するカロテノイド類を分析した結果、*c0507* 遺伝子破壊株においては、野生株で見られた C_{50} カロテノイドは検出されず、フィトエン、フィトフルエン、ζ-カロテン、ニューロスポレンおよびリコペンが検出された。また、野生株には見られなかった、水酸基を 1 つもつ共役二重結合数 11 のカロテノイドを蓄積していることがわかった。

次に、*c0507* 遺伝子断片を高度好塩性古細菌-大腸菌シャトルベクター pWL102 に連結し、上で構築した *c0507* 遺伝子破壊株に形質転換した。その際、プロモーターは *Ha. japonica* 細胞表層糖タンパク質遺伝子由来のものを用い、*c0507* 遺伝子の下流には His タグ配列を付加した。この *c0507* 遺伝子再導入株の生産するカロテノイド類を分析した結果、野生株同様、C_{50} カロテノイドを再び蓄積するようになることがわかった。また、*c0507* 遺伝子破壊株に特徴的な水酸基を 1 つもつ共役二重結合数 11 のカロテノイドは見られなくなり、共役二重結合数 13 の 3',4'-ジデヒドロリコペン、および共有結合数 14 の新規カロテノイドである 3',4'-ジデヒドロイソペンテニルデヒドロロドピンが新たに少量検出された。

現在、他の 2 つの *crtI* 遺伝子ホモログについても、遺伝子破壊株の構築と解析を進めている。

carotenoid biosynthesis, extremely halophilic archaeon, genome

講演番号：4C20a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ C校舎20会場

外来Δ17 不飽和化酵素遺伝子導入による油糧微生物 *Mortierella alpina* での常温 EPA 生産

EPA production under normal temperature by *Mortierella alpina* expressing exogenous Δ17-desaturase gene

○安藤晃規[1,2]、根来宏明[2]、奥田知生[2]、菊川寛史[2]、櫻谷英治[2]、島　純[3]、清水　昌[4,2]、小川順[2]（[1]京大・生理化学、[2]京大院農・応用生命、[3]京大・微生物科学、[4]京都学園大・バイオ環境）
○Akinori Ando[1,2], Hiroaki Negoro[2], Tomoyo Okuda[2], Hiroshi Kikukawa[2], Eiji Sakuradani[2], Jun Shima[3], Sakayu Shimizu[2,4], Jun Ogawa[2] ([1]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ. [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ. [3]Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ. [4]Dep. Biosci. Biotechnol., Fac. Bioenviron. Sci., Kyoto Gakuen Univ.)

【目的】

我々は、土壌より糸状菌 *M. alpina* 1S-4 を単離し、アラキドン酸の商業生産に成功している。また、本菌の分子育種法の構築にも取り組み、宿主－ベクター系の開発にも成功している。現在までに、脂肪酸生合成系に関与する内在性の酵素遺伝子の制御による脂肪酸組成の改変を報告してきた。本発表では、外来Δ17 不飽和化酵素遺伝子を本菌に導入することで、常温培養時における EPA 生産能の付与を試みたので報告する。

【方法】

ω3 不飽和化酵素欠損変異株である *M. alpina* ST1358 をホスト株として用い、糸状菌 *Saprolegnia diclina* 由来Δ17 不飽和化酵素遺伝子のコドン使用頻度を *M. alpina* 様に改変し、構成的発現プロモーターである histone プロモーターにて制御した発現カセットを構築した。本発現カセットをウラシル要求性のマーカー遺伝子とタンデムに連結したバイナリーベクターを構築し、アグロバクテリウムを介した ATMT 法にて本菌に導入した。

【結果】

形質を安定して保持する形質転換株を選抜後、10 ml の GY 培地（グルコース 2%、酵母エキス 1%）、28ºC ならびに 12 ºC 、300 rpm にて培養後、脂肪酸を抽出、ガスクロマトグラフィーに供し分析した。結果、28 ºC 常温培養ならびに 12 ºC 低温培養いずれにおいても、外来遺伝子であるΔ17 不飽和化酵素の発現に起因するω3 系脂肪酸の蓄積が確認できた。常温培養下では、総脂肪酸あたり 10%以上のエイコサペンタエン酸（EPA）の蓄積が確認された。

Mortierella alpina, PUFA, heterologous gene expression

講演番号：4C20a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ C校舎20会場

コリネ型アミノ酸生産菌GapN発現株の生育を改善するサプレッサー変異の解析

Analysis of suppressor mutations that improve the growth of a *gapN*-expressing *Corynebacterium glutamicum*

○竹野誠記、品川宗一郎、村田了祐、林 幹朗[1]、妹尾彰宏[1]、三橋 敏[1]、池田正人（信州大農・応生科，[1]協和発酵バイオ）

○Seiki Takeno, Soichiro Shinagawa, Ryosuke Murata, Mikiro Hayashi[1], Akihiro Senoo[1], Satoshi Mitsuhashi[1], Masato Ikeda（Shinshu University, [1]Kyowa Hakko Bio）

我々は、自前のNAD型GapAに代えて、ミュータンス菌のNADP型GapNを発現するコリネ菌の育種を行ってきた。このGapN発現株は残念ながらグルコースで良好に生育できなかったが、同株から生育が部分的に改善されたサプレッサー株が容易に取得できることを見出した。これらサプレッサー株から選択した代表2株はいずれも生育速度が改善されているものの増殖特性は同じではない。このことは、それらの持つ変異が異なることを意味する。既に1株については全ゲノム解析を行い、アレル特異的PCR法を交えてそのサプレッサー変異を特定している（昨年度大会)。今回、もう一方のサプレッサー株についても同様にしてサプレッサー変異を特定したので、現在までの結果をまとめて報告する。

Corynebacterium glutamicum, GapN, suppressor mutation

講演番号：4C20a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ C校舎20会場

コリネ型アミノ酸生産菌の微好気生育に関わる核酸合成系遺伝子の機能解析

Functional analysis of nucleic acid biosynthesis genes relevant to the microaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum*

○塚本修平、白倉大輔、馬場将弘、三橋 敏[1]、竹野誠記、池田正人
（信州大農・応生科、[1]協和発酵バイオ）
○Nobuyoshi Tsukamoto, Daisuke Shirakura, Masahiro Baba, Satoshi Mitsuhashi[1], Seiki Takeno, Masato Ikeda (Shinshu University, [1]Kyowa Hakko Bio)

我々はコリネ型アミノ酸生産菌の微好気生育に関わる遺伝子の１つとして、シチジル酸キナーゼ遺伝子Cgl1427を同定した。その破壊株では確かに微好気生育能が低下し、Cgl1427を含むプラスミドの導入で回復する。しかし、興味深いことに、破壊株の微好気生育能は、シチジル酸キナーゼ反応に続くDNA合成酵素リボヌクレオチドレダクターゼの遺伝子群をセットで含むプラスミドでも回復した。一方、好気的条件の撹拌培養では破壊株はラグ期が延びるという不可解な現象を認めたが、このラグ期長期化の現象もリボヌクレオチドレダクターゼの増強で有意に改善された。以上の結果をもとに、シチジル酸キナーゼと微好気生育との関連を考察する。

Keyword1, *Corynebacterium glutamicum*　Keyword2,microaerobic growth　Keyword3,nucleic acid biosynthesis

講演番号：4C20a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎20会場

コリネ型アミノ酸生産菌のグルコースバイパス輸送に関わる第3のグルコースリン酸化酵素

The third enzyme responsible for phosphorylation of glucose involved in a PTS-independent glucose uptake bypass of *Corynebacterium glutamicum*

○林 昌宏、粟根真一、三橋 敏[1]、竹野誠記、池田正人（信州大農・応生科、[1]協和発酵バイオ）
○Masahiro Hayashi, Shin'ichi Awane, Satoshi Mitsuhashi[1], Seiki Takeno, Masato Ikeda(Shinshu University , [1]Kyowa Hakko Bio)

我々は、コリネ型アミノ酸生産菌の*ptsH*欠失破壊株からグルコース生育が回復したサプレッサー株を自然突然変異によって容易に取得できること、そして、そのグルコース輸送を担うタンパク質がイノシトール輸送体であることを明らかにしてきた。さらにそのサプレッサー変異がイノシトール代謝系の調節遺伝子内のフレームシフト変異であること、同変異をリジン生産菌から誘導した*ptsH*欠失破壊株に導入してグルコース培養を行うとグルコースを消費して対照株に比べて有意に高いリジンを生産することを報告してきた。今回、グルコース輸送バイパス株におけるグルコースの細胞内でのリン酸化に公知の2遺伝子に加え、新たな遺伝子が関わっていることを明らかにしたので報告する。

Keyword1, *Corynebacterium glutamicum* Keyword2, glucose uptake Keyword3, phosphorylation of glucose

講演番号：4C20a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎20会場

*Corynebacterium glutamicum*の*NCgl1221*遺伝子産物を介したグルタミン酸排出に関する電気生理学的解析

Electrophysiological analysis of the protein which encoded by *NCgl1221* in *Corynebacterium glutamicum*

○橋本　賢一、矢部　勇、中松　亘、川崎　寿（東電大工・環境化）
○Kenichi Hashimoto, Isamu Yabe, Tsuyoshi Nakamatsu, Hisashi Kawasaki
(Dep. Green. Sust. Chem. TDU)

【目的】*Corynebacterium glutamicum*(*C. glu.*)は特定の条件下で著量のグルタミン酸を細胞外へ蓄積する工業的に優れた微生物であるが、その詳細な仕組みは完全には解明さていない。近年、この微生物が有する*Ncgl1221*遺伝子を破壊するとグルタミン酸過剰生成条件における培養液中のグルタミン酸蓄積量が著しく低下し、この遺伝子に変異を加えるとグルタミン酸非過剰生成条件にも関わらず培養液中にグルタミン酸が蓄積することが確認された（Nakamura et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4491-4498 (2007)）。この遺伝子産物は細胞に低浸透圧ストレスがかかった際発生する膜張力により活性化し、細胞内の低分子物質を細胞外に排出するとされるメカノセンシティブチャネル(Msc)と相同性がある。従って、グルタミン酸はこのチャネルを通過して細胞外へ排出されている可能性が考えられるが、その機能は解明されていない。本研究では電気生理学的手法を用いて*NCgl1221*遺伝子産物の機能を解析することを目的とした。

【方法】本研究では、Msc解析のため、パッチクランプ法を用いることにした。パッチクランプ法は、単一細胞に直接ピペットをアクセスさせ、細胞膜を通したイオンの流れを電流としてリアルタイムに観測する時間分解能に優れた物質輸送担体の解析手法である(Pflügers et al., *Arch. Eur. J. Physiol.*, **391**, 85-100 (1981))。しかし、ピペットを直接細胞にアクセスする必要があるため、動物細胞など大きな細胞にしか用いることができなかった。近年、微生物細胞を巨大化することで微生物細胞膜中の膜タンパク質をパッチクランプ法を用いて解析することが可能になった(Kuroda et al., *J. Bio. Chem.*, **273**, 16897-16904 (1998))。我々はこの手法を用い、ピペット内の圧力をコントロールすることで細胞膜の張力を変化させ、*C. glu.*由来Mscの物質透過性を検討する。本研究ではパッチクランプ法の適用実績のある*Bacillus subtilis*(*B. sub.*)を宿主とし、*B. sub.*の本来持っているMscをコードする遺伝子である*mscL*, *ykuT*, *yhdY*, *yfkC*の破壊後、*C. glu.*由来Mscを異種発現させ、微生物パッチクランプ法を用いた電気生理学的な機能解析を行った。

【結果】上記実験手法を用い、*NCgl1221*遺伝子産物が細胞膜張力に依存して活性化すること(Hashimoto et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2546-2549 (2010))、このときグルタミン酸を濃度依存的に通過させると考えられるデータを得た。

mechanosensitive channel, *Corynebacterium glutamicum*, glutamate

講演番号：4C20a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎20会場

*Corynebacterium glutamicum*由来mechanosensitive channelの*Escherichia coli*での発現とその影響

Analysis of mechanosensitive channel of *Corynebacterium glutamicum* expressed in *Escherichia coli*

○根本 正祥、白井 智史[1] 、村田 潤[1]、中松　亘、 川崎　寿（東電大院工・物質工、[1]東電大工・環境化）

○Nemoto Masayoshi, Shirai Satoshi[1], Murata Jun[1] ,Nakamatu Tuyoshi Kawasaki Hisashi (Mat. Sci. Eng. TDU, [1]Green. Sust. Chem. TDU)

【目的】*Corynebacterium glutamicum*(*C. glu.*)は特定の条件下で著量のグルタミン酸を細胞外へ蓄積する工業的に優れた微生物であるが、その詳細な仕組みは完全には解明さていない。近年、この微生物が有する*NCgl1221*遺伝子を破壊するとグルタミン酸過剰生成条件における培養液中のグルタミン酸蓄積量が著しく低下し、この遺伝子に変異を加えるとグルタミン酸非過剰生成条件にも関わらず培養液中にグルタミン酸が蓄積することが確認された（Nakamura et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4491-4498 (2007)）。この遺伝子産物は細胞に低浸透圧ストレスがかかった際発生する膜張力により活性化し、細胞内の低分子物質を細胞外に排出するとされるmechanosensitive channel(Msc)と相同性がある。従って、グルタミン酸はこのチャネルを通過して細胞外へ排出されている可能性が考えられる。グルタミン酸非過剰生成条件にてグルタミン酸を細胞外へ蓄積する変異を有するBL2株、BL3株の変異型Mscを*Escherichia coli*で発現させ、その影響を調べる。

【方法】グルタミン酸非過剰生成条件にてグルタミン酸を細胞外へ蓄積する変異を有するBL2株、BL3株の変異型Mscを*E. coli* W3110にpUC19を用いて導入し、IPTGによる発現誘導を行った。

【結果】BL2 型、BL3 型 *NCgl1221* を導入した *E. coli* は、生育、糖消費とも大きな変化はなかったが、脂肪酸合成阻害剤である celurenin を添加すると非導入株と比較し、細胞あたりのグルタミン酸生成量が顕著に増加していた。またこのとき、細胞外 α-KG の量も増加していることが分かった。

Corynebacterium glutamicum, mechanosenstive channel, *Escherichia coli*

講演番号：4C20a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ C校舎20会場

*Corynebacterium glutamicum*のPDH/ODH活性制御におけるタンパク質アセチル化の関与 The role of protein acetylation in regulation of the PDH/ODH activity in *Corynebacterium glutamicum*

○齋藤 奏、久保 翔世、川崎 寿、古園 さおり[1]、吉田 稔[1]（東電大院・工、[1]理研・基幹研）
○ Kanade Saito, Shosei Kubo, Hisashi Kawasaki, Saori Kosono[1], Minoru Yoshida[1] (Tokyo Denki Univ, [1]RIKEN-ASI,)

【目的】*C. glutamicum*は、ビオチン制限、ペニシリン添加、Tween40のような脂肪酸エステル系界面活性剤の添加によりグルタミン酸を過剰生産することが知られ、発酵工業において重要な位置を占める細菌である。グルタミン酸生産誘導時には特徴的な代謝変換が起こっていると推察されるが、その分子メカニズムは必ずしも明らかではない。近年、代謝酵素の制御メカニズムとしてタンパク質アセチル化が注目されている。我々は、*C. glutamicum*のグルタミン酸生産誘導にタンパク質アセチル化が関与する可能性について、特にグルタミン酸生産の鍵となるピルビン酸脱水素酵素（PDH）及び2-オキソグルタル酸脱水素酵素複合体（ODH）に注目して検討を行った。
【方法】PDH/ODH複合体を単離するため、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ（E1p）、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（E1o）、もしくはジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ（E3）サブユニットにHis_6-Flag-Flagタグを付加した融合タンパク質発現株を構築した。複合体の単離は、Niレジンを用いたアフィニティー精製により行った。タンパク質アセチル化の検出は、アセチルリジン抗体を用いたウェスタンブロット及びLC-MS/MS解析により行った。
【結果】*C. glutamicum*のゲノムにはE2サブユニットに相当する遺伝子が１つしか見つからず、PDHとODHは共通のE2サブユニットを利用することが推定されている。IP-WBにより、E1oタグによるIP画分にE1pが、E1p抗体によるIP画分にE1oが検出されたことから、E1pとE1oは同じ複合体内に共存し、PDH/ODH超複合体を形成していると考えられた。Tween40添加によるグルタミン酸過剰生産誘導条件では、E1pの全体レベルは非誘導条件と差は見られなかったが、E2やE3との結合が低下しており、複合体が解離していることが示唆された。また、PDH/ODHサブユニットのうちE2がアセチル化されていることが判明した。現在、複合体の安定化にE2のアセチル化が関与する可能性について検討している。

Corynebacterium glutamicum, protein acetylation, PDH/ODH

講演番号：4C20a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ C校舎20会場

大腸菌を用いたL-アスパラギン直接発酵法の開発

Direct fermentative production of L-asparagine using *Escherichia coli*

○三橋敏、西野恒代 （協和発酵バイオ）
○Satoshi Mitsuhashi, Tsuneyo Nishino (Kyowa Hakko Bio)

【目的】今日、ほとんどのアミノ酸は微生物を利用したプロセスによって生産することが可能となっている。しかし、L-アスパラギン(Asn)は植物からの抽出やアスパラギン酸の化学的アミド化により生産されるが、微生物による生産を報告した例はほとんどない。我々は、環境負荷がより少ないことが期待される微生物プロセスによる生産法構築を目的に、大腸菌を用いたAsn直接発酵を始めて示すことに成功したので、これを報告する。
【方法と結果】はじめに、大腸菌W3110株を親株としてAsn合成酵素遺伝子(*asnA*あるいは*asnB*)をプラスミドにより増強した株を造成したが、これらでAsn生産は確認できなかった。つぎに、Asn分解活性が報告されている因子の遺伝子(*ansA*、*ansB*および*iaaA*)を欠失した株で同様にAsn合成酵素をプラスミドにより増強したところ、有意なAsn生産を検出することができた。また、Asn合成酵素をプラスミドによって増幅せずに分解酵素遺伝子のみを欠失した株を評価したところ、わずかではあるがAsnの生産が検出されたことから、分解酵素欠失がAsn生産に重要であることが示唆された。細胞膜透過性に関しては、Asn取込み因子遺伝子*asnP*が知られ、さらに今回Asn排出因子としての機能が示唆される遺伝子を見出すことに成功したので、これら遺伝子の改変によるAsn生産性への影響ついても報告する予定である。

L-asparagine, direct fermentation, *Escherichia coli*

講演番号：4C20a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ C校舎20会場

酸性条件下におけるグルタミン酸発酵法の開発

Glutamic acid fermentation under acidic condition

○原吉彦、泉井裕、守屋美加、平野聖子、伊藤久生、小野栄治、松井和彦（味の素）
○Yoshihiko Hara, Hiroshi Izui, Mika Moriya, Seiko Hirano, Hisao Ito, Eiji Ono, Kazuhiko Matsui (Ajinomoto Co., Inc)

【目的】現在グルタミン酸はコリネ型細菌を用いて広く世界中で発酵生産されているが、コリネ型細菌がグルタミン酸を過剰生産できるのは中性付近においてのみである。従ってグルタミン酸発酵では窒素源としてだけでなく、発酵液のpHを維持するためにも大量のアンモニアを添加している。本研究はグルタミン酸の溶解度が低い酸性条件下（pH3～5）でグルタミン酸発酵を行うことにより、この発酵工程の中和に必要となるアンモニア、更に単離精製工程で使用する酸類を削減する新規なグルタミン酸製法を開発することを目的とする。

【方法】酸性条件下で生育でき、かつ安全な菌株を自然界より単離し、育種することにより、酸性条件下でもグルタミン酸を高生産する菌株を構築する。

【結果】耐酸性及び高濃度グルタミン酸に対する耐性を指標として、自然界よりスクリーニングを行い、腸内細菌群に属し植物常在菌として知られる *Pantoea ananatis* AJ13355 株を単離した。この菌株は、pH4.0 のグルタミン酸結晶が存在する条件下でも良好に生育でき、また *E. coli* で機能する遺伝子ツールが使用できることから、この菌株からのグルタミン酸発酵菌の育種を以下のように実施した。

① 自然変異による菌体外多糖生成能低下株の誘導
② αケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の弱化によるグルタミン酸分解能の抑制
③ グルタミン酸生合成の律速酵素であるクエン酸シンターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、そしてグルタミン酸デヒドロゲナーゼの活性強化

これらの育種により、我々は pH4.6 の酸性条件下で 13g/L のグルタミン酸を蓄積する菌株を育種することに成功した。

講演番号：4C20a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ C校舎20会場

タイトル　イソプロピルアルコール高生産大腸菌の開発

Title　Development of High Isopropyl Alcohol-Producing *Escherichia coli*

○天野仰[1]、白井智量[1,2]、松本佳子[1]、平野淳一郎[1]、高橋均[1]、竹林のぞみ[1]、森重敬[1]、舘野俊博[1]、古澤力[2]、平沢敬[2]、清水浩[2]、和田光史[1]（三井化学(株)・触媒研[1]、阪大院情報・バイオ情報[2]）

○Koh Amano[1], Tomokazu Shirai[1,2], Yoshiko Matsumoto[1], Junichiro Hirano[1], Hitoshi Takahashi[1], Nozomi Takebayashi[1], Takashi Morishige[1], Toshihiro Tateno[1], Chikara Furusawa[2], Takashi Hiraswa[2], Hiroshi Shimizu[2], Mitsufumi Wada[1] (Mitsui Chemicals, Inc., Catalysis Science Lab.[1], Osaka Univ., Dept. of Bioinformatic Engineering[2])

【目的】汎用プラスチックであるポリプロピレン（PP）は、現在化石資源から生産されている。近年、環境問題といった観点から我々は非化石資源であるバイオマス由来PPの製造に注目しており、PPの原料となりうるイソプロピルアルコール（IPA）をバイオマスから生産する技術開発に取り組んでいる。本研究では、遺伝子工学・代謝工学的手法を用いてIPA高生産大腸菌を開発することを目的とした。

【方法と結果】我々は、アセチルCoAからIPAの生合成に必要な4遺伝子のうち、チオラーゼ（atoB）、CoAトランスフェラーゼ（atoDA）の2遺伝子を大腸菌から獲得し、クロストリジウムよりアセト酢酸デカルボキシラーゼ（adc）、イソプロピルアルコールデヒドロゲナーゼ（IPAdh）の2遺伝子を取得した。これら4つの遺伝子を導入した大腸菌を作製し、グルコースからIPAを生産することを試みた。培養は3Lジャーファーメンターを用い一定通気量のもとでグルコースを流加し、IPAの回収はガスストリッピング法にておこなったところ、72時間での生産性は49g/Lであった。

上記結果からさらに生産性を向上させるべく、代謝工学的手法を用いて大腸菌の改変をおこなった。上記IPA生産株について細胞内代謝産物の解析をおこなったところ、アセチルCoAが蓄積していたことからatoBによるアセチルCoAからアセトアセチルCoAへの反応が律速になっていることが予想された。そこで、IPA生産株においてさらにatoBの発現量を増加させたところ、生産性が約1割向上し54g/Lとなった。次に、IPAの生合成で必要な還元力であるNADPHを供給するため、大腸菌由来トランスヒドロゲナーゼ（pntAB）を高発現させたところ、生産性が56g/Lとなった。しかしながら、IPAの前駆体であるアセトンが副生物として培地中に蓄積していたことから、十分にNADPHが供給されていないことが予想された。そこで、さらにリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（maeB）を高発現させたところ、98g/Lまで生産性が向上した。

本発表では、上記結果に加えて上記経路とは異なる代謝経路の改変結果についても併せて報告する。

Isopropyl alcohol, *E. coli*, Metabolic engineering

講演番号：4C20a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ C校舎20会場

タイトル　高エタノール生産*Zymomonas mobilis*変異株の呼吸鎖の解析
Title　Analysis of respiratory chains of high ethanol producing *Zymomonas mobilis* mutants.
○林　毅，加藤　剛士，古川　謙介（別府大・食栄科）
○Takeshi Hayashi, Tsuyoshi Kato, Kensuke Furukawa (Beppu univ.)

【目的】これまでエタノール発酵細菌*Z. mobilis*において，好気条件下で高いエタノール生産能を有する変異株（RDM株）を計11株単離した．これらRDM株は高温条件下においても高いエタノール生産能を示すことから，熱耐性能も同時に有することを明らかにした．またRDM株は高いエタノール理論収率を示すことが明らかとなり（97%以上），以上の結果からRDM株は高エタノール生産*Z. mobilis*であることが分かった．次にRDM株の高エタノール生産性のメカニズムを明らかにするために表現系を調べたところ，RDM株は遺伝子組換え体以外では初の呼吸欠損*Z. mobilis*であることが分かった．本研究では*Z. mobilis*の呼吸欠損による高エタノール生産能の獲得の要因について詳細に理解するために，酵素及び遺伝子レベルでのRDM株の呼吸鎖の解析を行った．
【方法】*Z. mobilis*の呼吸鎖はタイプII NADHデヒドロゲナーゼ→キノン（Q_{10}）→チトクロム*bd*タイプユビキノールオキシダーゼもしくはキノン（Q_{10}）→チトクロム*c*ペルオキシダーゼが主要な電子伝達経路で，Q_{10}以下は2つの経路が存在することが知られている．これらの呼吸鎖酵素の活性測定は好気条件下および高温条件下で培養した菌より細胞膜を抽出し，分光光度学的に各酵素の活性の測定を行った．さらに遺伝子変異の解析は，これら呼吸鎖遺伝子の塩基配列を野生株とRDM株間で比較した．呼吸鎖遺伝子の転写量の解析は定量PCR法を用いた．
【結果】呼吸鎖酵素の活性測定の結果，RDM-1，RDM-2，RDM-3，RDM-6，RDM-7はチトクロム*bd*タイプユビキノールオキシダーゼが，RDM-10はチトクロム*c*ペルオキシダーゼの酵素活性が低下した呼吸欠損株であることがわかった．さらにRDM-4，RDM-5，RDM-8，RDM-9，（RDM-11）はNADHデヒドロゲナーゼ活性が欠失（低下）した呼吸欠損株であることが明らかとなった．特にこれらのRDM株は，全RDM株の中でも顕著に高い好気エタノール発酵能と熱耐性能を示した株であった．また以前にこれらのRDM株の呼吸能が著しく低下していること，加えて好気培養下では他の株と比べて細胞内の酸化ストレスが低下していることを報告している．

さらにこれらの酵素活性の低下（欠失）の原因を調べるために各呼吸鎖遺伝子の転写量を調べた結果，転写量の変化が酵素活性に直接的には関係しないことが分かった．次に遺伝子変異について調べた結果，NADHデヒドロゲナーゼ欠失株はすべて遺伝子変異（欠失，フレームシフト変異，点変異）によって酵素活性が欠落したことが明らかとなった．

以上の結果から，呼吸鎖の機能低下による酸化ストレスの低減が高エタノール生産性に関与していることが示唆される．チトクロム*bd*タイプユビキノールオキシダーゼもしくはチトクロム*c*ペルオキシダーゼの活性の欠損はお互いで電子伝達機能を補完し合うことが出来ることから，*Z. mobilis*においてはNADHデヒドロゲナーゼの欠失が最も強力なエタノール生産能の獲得につながることが明らかとなった．

Zymomonas mobilis, ethanol fermentation, respiratory chain

講演番号：4C20a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ C校舎20会場

酵母 *S. cerevisiae* の環境中の窒素濃度に応答し、窒素取り込みを制御する遺伝子の検索

Genome screening of the genes affected by the nitrogen concentration in the cultural environment and those regulate nitrogen uptake in *S. cerevisiae*

○渡部 貴志[1,2]、家藤 治幸[3]、長村 吉晃[4]、北本 宏子[1]（[1]農環研、[2]JSPS-PD、[3]酒総研、[4]生物研）
○Takashi Watanabe[1,2], Haruyuki Iefuji[3], Yoshiaki Nagamura[4], Hiroko K. Kitamoto[1]
（[1]NIAES, [2]JSPS-PD, [3]NRIB, [4]NIAS）

【背景・目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、環境中のリン濃度に応答し、リンの取り込みを制御する*PHO* 遺伝子群によるシグナル伝達系が解明されている。これまで我々は、この知見を基に「リン応答の変異株の中からリンを高蓄積する酵母の育種方法」を開発し、排水中から高濃度のリンを除去する方法を提案してきた。一方、同じく環境負荷物質である窒素については、アンモニウムイオン（NH_4^+）やアミノ酸等の個々の窒素化合物についてのトランスポーターや細胞の遺伝子応答解析や代謝系について詳細な解析がなされている。これらのことから、窒素においても同様に、「高濃度の窒素を取り込む酵母の育種および排水処理への利用」が期待できる。そこで本研究では、*S. cerevisiae* の「窒素源の種類に依存せずに窒素濃度を感知し、窒素取り込みを制御している機構」の解明を目的として、窒素濃度に応答する遺伝子の検索、および検索した遺伝子破壊株の窒素取り込み能の評価を行った。
【方法・結果】まず、DNAマイクロアレイに供する培養条件を決定するため、*S. cerevisiae* が窒素濃度に応答して、窒素の取り込みを制御していることの確認試験を行った。硫酸アンモニウムを窒素源として用いた場合、アンモニウムイオン（NH_4^+）を消費した後、培地中に硫酸イオン（SO_4^{2-}）が残存してpHが低下するため、低pHストレスもかかる。そこでペプトンを有機態の窒素源として用いることにした。その結果、低窒素培地で培養した酵母 *S. cerevisiae* S288c株に新たに充分な窒素源を加えてやると、酵母細胞が急激に窒素を取り込み、高窒素培地で培養した酵母細胞より単位菌体量あたりの窒素蓄積量が多くなる現象を確認した。このように、本実験条件下で酵母細胞が環境中の窒素濃度を検知し、遺伝子発現レベルで窒素の取り込みを制御していることが認められたことから、DNAマイクロアレイによって網羅的な遺伝子発現解析を行った。なお、窒素源の種類による影響を減らすため、ペプトンとアスパラギンの二種類を用いたところ、いずれの窒素源でも窒素濃度により遺伝子発現量は大きく変動した。まず、発現抑制により窒素の取り込みを促進する遺伝子を検索することにし、二種類の窒素源に共通して高窒素条件下に比べ、低窒素条件下で発現量が抑制される遺伝子を選別した。その中で破壊が致死でない256個の遺伝子について、*S. cerevisiae* BY4741株を親株とした非必須遺伝子破壊株セットを用い、遺伝子破壊による窒素蓄積に与える影響を調べた。その結果、15個の遺伝子破壊株が元の株より単位菌体量中の窒素蓄積能が高くなっていた。

本研究は、（独）日本学術振興会特別研究員-PD 研究奨励金および科学研究費補助金（特別研究員奨励費）により行った。

Nitrogen, *Saccharomyces cerevisiae*, regulation system

講演番号:4C20a13
講演日時、会場:3月25日11:32～ C校舎20会場

Rhizopus 培養液の酵母アルコール耐性増強物質

Substance in *Rhizopus* culture liquid contributing to the enhancement of yeast ethanol tolerance.

○鈴木　豪、門倉　利守、蛭田　淳史、中山　俊一、中里　厚実（東農大応生科・醸造）
○Go Suzuki, Toshimori Kadokura, Atsushi Hiruta, Shunichi Nakayama, Atsumi Nakazato (Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】*Rhizopus* 属を通気撹拌培養して調製した*Rh.*培養液には、通常酵母が増殖しない11%エタノール存在下において酵母の増殖能アルコール耐性を増強し、酵母の増殖を促す作用がある。これまでに演者らは、この作用が米麹や*Rh.*菌体抽出液にも認められることを報告した。さらに、*Rh.*培養液を加えたWickerham合成培地で培養した酵母を、11%エタノールストレス下に置いた場合にmRNAの核内への蓄積が見られず、ストレスが掛からないことも報告した。*Rh.*培養液中に含まれる酵母アルコール耐性増強物質に関しては、*Rh.*培養液をエタノールによって分画した沈殿画分に強い増強作用があり、その沈殿は糖質、核酸、タンパク質等を含んでおり、酵母アルコール耐性増強作用を付与する物質が*Rh.*菌体由来である可能性を示唆した。また、*Rh.*培養液を添加してエタノールストレスを掛けて培養した酵母は、細胞壁の糖質とタンパク質が増加し、菌体脂肪酸組成は飽和脂肪酸が減少し、オレイン酸が増加することも報告した。本報告では、*Rh.*培養液のエタノール沈殿を各種酵素により消化し、アルコール耐性増強作用物質の検索を行った。
【方法】*R. javanicus* 055M株を通気撹拌培養して*Rh.*培養液とし、4倍量のエタノールで沈殿を回収して凍結乾燥した。この沈殿画分をProtainase K、DNase I、RNase Aの各至適pHと温度でそれぞれ消化し、失活後pH5.5に調整した。この処理画分を添加して、これまでと同様に清酒酵母ATCC32700の増殖能とmRNAの核内への局在化からアルコール耐性増強作用を検討した。また同様に、*Rh.*菌体を破砕した菌体抽出液からもエタノール沈殿を回収し検討した。
【結果】*Rh.*培養液のエタノール沈殿画分を各種酵素処理し、11%エタノール存在下での清酒酵母の増殖能を検討したところ、プロテアーゼにより十分に消化した画分の添加では酵母が増殖せず、アルコール耐性増強作用が失われた。しかし、DNaseやRNaseなどのヌクレアーゼ処理を施したものは、酵素処理前の沈殿画分と同様にアルコール耐性増強作用が認められた。また、エタノールストレス下での酵母細胞でのmRNAの核内への局在化に関しても、プロテアーゼ処理画分ではmRNAの局在化が認められ、ヌクレアーゼ処理画分では処理前と同様に局在化はなかった。そして、*Rhizopus* 菌体抽出液のエタノール沈殿でも同様の結果が得られ、*Rh.*培養液に含まれる増強作用をもたらす物質は菌体に由来するタンパク質を含む物質である可能性が示唆された。これは、これまでに報告した培養液を調製する際の*Rhizopus* 菌体の生育が、ペレット状よりパルプ状の方がアルコール耐性増強作用が強いこと、および丸山ら[1)] の固体培養の麹などでは菌糸先端が溶菌して、細胞質成分が漏出するという報告からも支持されるものと考えられた。

1)丸山ら，第63回日本生物工学会大会講演要旨集，p.100(2011).

Rhizopus mycelium, yeast, ethanol tolerance,

講演番号：4C20a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ C校舎20会場

エタノール発酵糸状菌の二形性制御とその特徴

Dimorphism mechanism and its characterizations of ethanol-fermenting fungus

○高野 真希、星野 一宏（富山大院・理工）
○Maki Takano, Kazuhiro Hoshino (Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama)

【目的】新規なエタノール発酵糸状菌*Mucor* sp.は単糖から多糖類まで種々の糖質を高効率で発酵が可能である。しかし糸状菌を用いたエタノール生産では菌糸が槽内に局在化するため、物質移動の阻害による発酵効率の低下や連続培養が不可能であるなど様々な問題が生じる。一方、*Mucor*属糸状菌は環境の変化に応答し酵母体と糸状体の二形成挙動を示すことが知られており、酵母体*Mucor*を利用することにより操作性の向上やエタノール発酵の効率化が期待できる。形態変化の要因は主に通気ガスなどの環境因子であり、嫌気培養することで酵母体を形成することが知られている。また、培地への界面活性剤や菌糸形成抑制物質の添加が形態変化へ影響を及ぼすこともわかっている。しかし糸状菌の形態変化メカニズムや、糸状体と酵母体における細胞膜構成の相違は明らかではない。そこで本研究では酵母体形成に関与する細胞膜合成経路の検討および細胞膜構成成分であるキチンやエルゴステロール分析により、糸状菌*Mucor* sp.の二形性メカニズムの解明を試みた。

【方法】糸状菌*Mucor* sp.が酵母体を形成する環境として100% N_2または70% N_2+30% CO_2の混合ガスを封入した培地を用いた。菌性形成抑制物質および界面活性剤としてエルゴステロールおよびTween 80を培地に添加し、位相差倒立顕微鏡により形態を観察した。酵母体および糸状体におけるエタノール生産およびエタノール耐性を比較するため、*Mucor* sp.を20～200 g/LのGlucoseを炭素源として培養を行い、HPLCによりGlucoseおよびエタノールを分析した。両形態における細胞膜内のエルゴステロールを抽出し、GC分析により定量した。

【結果】*Mucor* sp.を100% N_2または70% N_2+30% CO_2の混合ガスを封入した環境で培養した結果、両条件ともに酵母体を形成した。ただし100% N_2の場合は形態変化が不安定であり、CO_2を封入することでほぼ100%酵母体を形成したことから、酵母体の形成にはCO_2が大きく関与すると考えられる。また、エルゴステロールおよびTween 80を様々な濃度で添加し酵母体形成に対する影響を検討した結果、0.02 g/Lのエルゴステロールおよび0.4 g/LのTween 80を添加した場合に最もよく酵母体を形成していた。両形態におけるエタノール生産を検討した結果、Glucoseの消費および菌体増殖ともに酵母体の方が速くなり、また、初期Glucose濃度を200 g/Lまで上昇させた場合、エタノール生成量は糸状体において約40 g/Lであったのに対し酵母体の場合、最大60 g/Lにも達した。一般的な酵母では細胞膜中のエルゴステロール含量が高いとエタノール耐性が上がるという報告があり、Tween 80によりエルゴステロールが細胞膜に侵入し易くなったため、酵母体ではエタノール耐性が上昇したと考えられる。一方、酵母体および糸状体の細胞膜中のエルゴステロール含量はそれぞれ75 mg/g-wet cellおよび429 mg/gであった。現在、エルゴステロールの生合成と形態変化の関連性について検討中である。

Mucor, dimorphism, ergosterol

講演番号：4C21a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ C校舎21会場

*Aspergillus oryzae*におけるペントース代謝

Pentose catabolism in *Aspergillus oryzae*

渥美　元規、○井上　泰宏、金丸　京子、小林　哲夫（名大院生命農・生物機構）

Motoki Atsumi, ○Yasuhiro Inoue, Kyoko Kanamaru, Tetsuo Kobayashi (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

D-キシロースとL-アラビノースは植物細胞壁を構成するヘミセルロースの主要構成五単糖であり、炭素源として多くの糸状菌に利用される。我々は、*Aspergillus oryzae*におけるこれらペントースの資化がそれぞれXlnR、AraRと呼ばれる転写因子により制御されることを明らかにし、XlnR、AraR制御下遺伝子のDNAマイクロアレイ解析による同定とペントース代謝経路の酵素遺伝子候補の抽出、候補遺伝子産物の大腸菌を宿主とした発現と基質特異性の解析を通して、*A. oryzae*におけるペントース代謝経路を構築した。すなわち、D-キシロースからキシリトールへの変換を担うD-キシロースリダクターゼ(XyrA)、L-アラビノースからキシリトールへの変換を担うL-アラビノースリダクターゼ(LarA)、L-アラビニトールデヒドロゲナーゼ(LadA)、L-キシルロースリダクターゼ(LxrA)、キシリトールからD-キシルロースへの変換を担うはキシリトールデヒドロゲナーゼ(XdhA)をそれぞれコードする遺伝子の同定である。

本報告では、上記で構築された*A. oryzae*ペントース代謝経路を検証するため、本経路を構成する全遺伝子について破壊株を構築し、D-キシロース、L-アラビノースならびに代謝経路中間体の資化能を解析した。その結果、初発反応を触媒する*xyrA*と*larA*の単独破壊株ではD-キシロース、L-アラビノース資化への影響は観察されず、二重破壊株ではD-キシロース資化能が消失、L-アラビノース資化能も著しく低下した。すなわち、前者の資化にはこれら両酵素のみが用いられ、後者にはバイパスまたはアイソザイムが存在すると考えられる。同様な解析により、*ladA*はL-アラビノース資化に必須であることが示されるとともに、LxrA, XdhAの触媒する反応にはバイパスまたはアイソザイムが存在することが明らかとなった。酵素学的解析からLxrAはNADPH依存型であるが、細胞抽出液にはNADH依存型のL-キシルロースリダクターゼも存在する。また、LxrAはL-xyluloseだけでなくD-xylulose も基質とするため、L-キシルロースからD-キシルロースまで一酵素で変換する可能性がある。さらに、*xdhA*に極めて相同性の高い*xdhB*遺伝子も存在する。これらが、L-キシルロースからキシリトールを経てD-キシルロースに至る反応を複合的に触媒している可能性があり、*A. oryzae*におけるペントース代謝経路の完全理解のための鍵となっている。

Aspergillus oryzae, pentose catabolism

講演番号：4C21a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ C校舎21会場

糖新生制御因子AcuM、AcuKの新機能に関する解析

Novel function of gluconeogenesis regulatory factor AcuM, AcuK in filamentous fungi

○浅井　雄一郎、金丸　京子、小林　哲夫（名大院生命農・生物機構）
○Yuichiro Asai, Kyoko Kanamaru, Tetsuo Kobayashi(Graduate sch. of Bioagric. Sci, Nagoya Univ.)

Aspergillus nidulans の AcuM, AcuK は糖新生酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ(FBP)をそれぞれコードする遺伝子 *acuF*、*acuG* の発現を制御することが知られている。一方で、野田産業科学研究所との共同研究により、*Aspergillus oryzae* の *acuK* 破壊株はセルラーゼ生産量が減少することが明らかとなった。そこで、AcuM、AcuK は糖新生だけでなく、セルラーゼ生産にも関与していると予想し、*A.nidulans* の *acuM* 破壊株、*acuK* 破壊株を用いて糖新生の基質（プロリン）のみを炭素源とした培地とカルボキシメチルセルロース（CMC）を炭素源とした培地で生育を観察したところ、両方の培地で生育の顕著な低下がみられた。また、*A.nidulans* の *acuM* 破壊株、*acuK* 破壊株のセルラーゼ活性を測定した結果、WT と比べてセルラーゼ活性が約半分に減少することがわかった。これらのことは *A.nidulans* の AcuM、AcuK は糖新生・セルラーゼ生産の両方を制御していることを示唆している。一方で、炭素源として CMC にセルラーゼの誘導物質であるセロビオースを添加すると生育能は回復し、セルラーゼ活性も８割ほどに回復した。このことから、*acuM* 破壊株、*acuK* 破壊株はセロビオース生産、すなわちセロビオハイドロラーゼ生産を制御し、セルラーゼ遺伝子群の発現を間接的に制御しているということが示唆された。そこで、各セルラーゼ遺伝子(*eglA, eglB, cbhA, cbhB, cbhC*)の発現量を qPCR によって定量した結果、セロビオハイドロラーゼだけではなく、すべてのセルラーゼ遺伝子の発現量が WT と比べて約半分に低下することがわかった。また、*acuM* 過剰発現株においてもセルラーゼ活性・セルラーゼ遺伝子の発現量を調べたところ、セルラーゼ活性・*eglA, eglB, cbhA, cbhB* の発現量には顕著な差は見られなかったが、*cbhC* の発現量のみが劇的に上昇した。

以上から、AcuM、AcuK はセルラーゼ遺伝子の発現に関与しているが、現時点では直接的か間接的か不明である。これを明らかにするため、これら転写因子のプロモーターへの結合について解析を行っている。

本研究の一部は、生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われた。

Aspergillus, cellulase, AcuM・AcuK

講演番号:4C21a03
講演日時、会場:3月25日09:22～ C校舎21会場

麹菌アミノ酸トランスポーターの解析

Analysis of amino acid transporter in *Aspergillus oryzae*.

○佐野元昭、尾関健二、大箸信一（金沢工大）
○Motoaki Sano, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi (KIT)

【目的】外界の様々な栄養源を取り込むため、栄養源の取り込みや代謝に関わる遺伝子は、外界の栄養源の濃度や種類により複雑な制御を受けることが近年の研究によって明らかとなってきている。麹菌(*Aspergillus oryzae*)は約12,000個の遺伝子を有しており、そのうち600個程度はトランスポーターとして働くと考えられている。また、アミノ酸トランスポーター遺伝子に限定しても、少なくとも80個程度を麹菌は有していると推測される。

麹菌のトランスポーター遺伝子の機能にかかわる解析はあまり進んでいないのが現状である。そこで今回、酵母で解析が進んでいるアミノ酸やγ-アミノ酪酸(GABA)の取り込みにかかわるGeneral amino acid permease(Gap1)と高い相同性を有する麹菌の遺伝子について解析を行ったので報告する。

【方法と結果】 酵母のGap１と高い相同性を有する遺伝子を、麹菌のデータベース中から抽出し、*A. oryzae*ligD破壊株を宿主にして遺伝子破壊株の作製を行った。今回作製した破壊株では、GABAを単一窒素源とした培地で生育確認を行ったところ、酵母のGap1破壊株と同様に顕著な生育不良が確認された。また、他のアミノ酸の場合でも同様な生育不良が確認された。この結果から、今回破壊した遺伝子は、アミノ酸の取り込みに関わる重要な遺伝子であることが判明した。

今までに解析を行ったDNAマイクロアレイ結果より、本遺伝子は炭素源や窒素源が制限されている条件下で高発現していることが確認されている。そこで炭素源を制限した状況で本遺伝子を破壊した影響を調べ、麹菌Gap1様遺伝子の機能解析について現在さらに解析を進めている状況である。

Aspergillus oryzae, transporter, permease

講演番号:4C21a04
講演日時、会場:3月25日09:33～ C校舎21会場

糸状菌*Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産に関与する推定トランスポーター遺伝子の機能解析

Functional analysis of a gene encoding the putative cello-oligosaccharide transporter in filamentous fungus *Trichoderma reesei.*

○日下　秀行，古川　隆紀，深谷　英嗣，志田　洋介，小笠原　渉（長岡技大・生物）
○Hideyuki Kusaka, Takanori Furukawa, Eiji Fukaya, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara(Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

【目的】
糸状菌 *Trichoderma reesei* は，細胞外のセルロースやその誘導体に応答してセルラーゼを誘導的に生産する。しかし，セルロースは不溶性基質であり細胞膜を透過出来ないことから，誘導の初段階においてどのように細胞外セルロースの認識がおこなわれているかは不明である。従来提唱されてきたモデルにおいては，構成的に発現しているセルラーゼの作用により生じた微量のセロビオースやソホロースの取込みが引き金となりセルラーゼ誘導生産が引き起こされると推定されているが，その詳細は明らかになっていない。これまでに，我々はDNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析および推定トランスポーター遺伝子の破壊実験を行い，セルラーゼ誘導生産に関与すると考えられる推定トランスポーターMFS031 を見出してきた。本研究では，セルラーゼ誘導物質の取込み経路および基質認識における MFS031 の役割を明らかとすることを目的としてその機能解析を行った。

【方法と結果】
セルラーゼ誘導条件下における野性株(*T. reesei* PC-3-7 株)とΔMFS031 株の遺伝子発現パターンをリアルタイム PCR 法により解析した。その結果，炭素源としてセロオリゴ糖を使用した場合野性株ではセルラーゼ遺伝子の応答が見られたのに対して，ΔMFS031 株ではセルラーゼ遺伝子の応答が観察されなかった。一方，ソホロースを炭素源として使用した場合には，ΔMFS031 株においても野性株と同程度のセルラーゼ遺伝子の発現が観察された。次に，MFS031 の糖取込みへの関与が予想されたことから同一誘導条件下において各糖の取込みを測定したところ，野性株とΔMFS031 株間で糖取込み速度に違いは見られなかった。これらの結果から，MFS031 はセルラーゼ誘導性基質の取込みに関与しているのではなく，基質認識やセルラーゼ生産誘導のシグナル伝達経路において重要な働きをしている可能性が示唆された。また，セロオリゴ糖とソホロース間でセルラーゼの発現誘導メカニズムは異なる可能性が考えられた。現在，酵母を用いて MFS031 の異種宿主発現を行い，糖取込みについての詳細な解析を行っている。

transporter, sugar sensing, signal transduction

講演番号:4C21a05
講演日時、会場:3月25日09:44～ C校舎21会場

出芽酵母の有機酸生産関連遺伝子の解析

Identification and characterization of genes related to the production of organic acids in budding yeast

○吉田 聡、横山 亜紀、中嶋 桂子、小林 統（キリンホールディングス・フロンティア技術研）
○Satoshi Yoshida, Aki Yokoyama, Keiko Nakashima, Osamu Kobayashi (Cent. Lab. Front. Technol., KIRIN HD)

【目的】アルコール系飲料において、有機酸は香味上重要である。特に、酢酸、ピルビン酸、コハク酸などは酵母の発酵過程を経て作られるために、これらの生産は酵母を制御することにより調整することが可能である。本研究においては、酵母において有機酸生産に関与する遺伝子を同定し、それらの遺伝子改変による有機酸の生産制御を目的として以下の実験を行った。

【方法】一倍体のパン酵母非必須遺伝子破壊株コレクションを用いて、ブロモクレゾールパープル(BCP)を含んだ寒天プレート上でpHが低下し、コロニーが黄色に変化した遺伝子破壊株をスクリーニングした。さらに、これらスクリーニングによって得られた各遺伝子のコード領域を、*GPD*プロモーターの下流に挿入して遺伝子発現ベクターを構築し、パン酵母、および下面発酵酵母を形質転換することで、遺伝子過剰発現株を作製した。また、有機酸生産量については、酵母を静置培養で発酵させ、培地成分をHPLCにより測定した。

【結果】5000弱の酵母遺伝子破壊株の中から、BCPプレートを用いて酸生産能が高い株を選抜した。これらの候補遺伝子について、遺伝的背景の異なるパン酵母で遺伝子破壊を行い、再現性を調査し、最終的に有機酸高生産に関与する遺伝破壊株として36株が単離された。これらは、TCAサイクル、転写因子、シグナル伝達、タンパク質のユビキチン化に関与するタンパク質をコードする遺伝子の破壊株であった。次に、これらの遺伝子破壊株を用いて発酵試験を行い、酢酸、ピルビン酸、コハク酸を中心に有機酸生産量を調査した結果、*GTR1, GTR2, LIP5, LSM1, PHO85, PLM2, RTG1, RTG2, UBP3*とコハク酸脱水素酵素に関連した*EMI5, SDH1, SDH2, SDH4, TCM62, YDR379C-A*がこれらの有機酸の生産に関与していることが示唆された。また、これらの中で*LIP5*のみが、パン酵母において過剰発現により酢酸生産量を増大させた。さらに、*EMI5, LIP5, RTG2, UBP3* の過剰発現は、下面発酵酵母において酢酸、クエン酸、乳酸、コハク酸生産量のいずれかに影響を与えた。育種を視野に入れて、パン酵母の遺伝子破壊株の表現型を解析したところ、これらの破壊株の多くはアザセリン、クエン酸、エチオニン、亜硫酸に対して感受性、若しくは耐性となった。以上のことから、上記の化合物に対する感受性株、もしくは耐性株を取得することにより、有機酸生産に関与する遺伝子に変異を起こさせ、有機酸生産量の異なる目的の酵母株を育種できる可能性が示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, yeast, organic acid

講演番号：4C21a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎21会場

遺伝子スイッチを用いた出芽酵母の代謝変換制御

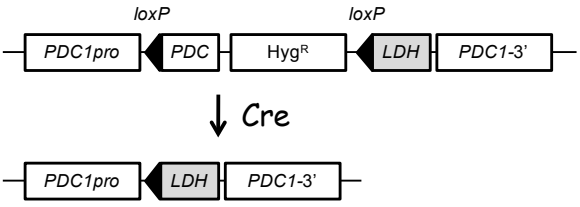
A genetic switch to dynamically control metabolic flow in *Saccharomyces cerevisiae*

○松山 崇、山西 守（豊田中研・松山研究グループ）
○Takashi Matsuyama, Mamoru Yamanishi (TCRDL)

【目的】　遺伝子工学を取り入れた代謝工学の発展に伴い、代謝主経路の大幅改変が可能となり、バイオ燃料やバイオ樹脂原料物質の発酵プロセスが実現化しつつある。しかしながら、導入形質を発酵工学的な手法で制御する事が困難な場合があるため、代謝経路の切り替えをCre DNA組換え酵素を用い、ゲノムレベルで制御する新技術の開発を行った。

【方法】　解糖系の中間産物・ピルビン酸を基質として、PDC（ピルビン酸デカルボキシラーゼ）が働くとエタノール発酵、LDH（乳酸デヒドロゲナーゼ）が働くと乳酸発酵となる。*Δpdc*形質は菌体増殖を強く阻害するため、LDH遺伝子を導入した乳酸生産酵母において、エタノール生成を抑制しつつ、乳酸の生産速度を向上させることは困難となる。

そこで、増殖期にエタノール発酵（PDC on, LDH off)、生産期に乳酸発酵（PDC off, LDH on）を実現するため、PDC-LDH遺伝子カセットを出芽酵母のPDC1座に導入した。PDC1→LDHの切り替えは、*lox*P部位をターゲットにしたCre DNA組換え酵素により制御される（コンストラクト１)。Cre酵素遺伝子は、ガラクトース誘導性GAL1プロモーターにより制御する（コンストラクト２)。これらの遺伝子は、ガラクトース応答性を高めた遺伝子組換え酵母[1]に導入した。



（コンストラクト１）



（コンストラクト２）

【結果】　図１に示したように、最終代謝産物が、エタノール(非誘導株：91.7%)から乳酸(誘導後12時間株：85.4%)に変換された[2]。以上の結果より、増殖期と生産期の代謝をゲノムレベルで厳密に制御する新たな発酵制御法の開発に成功した。

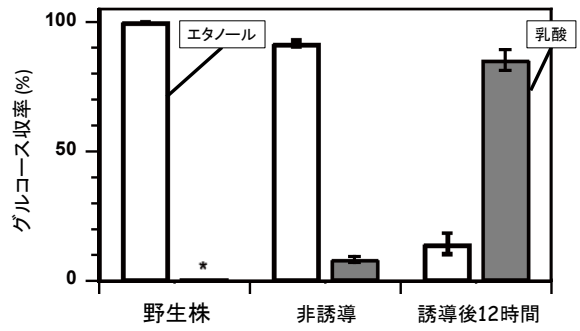


図１．Cre の誘導による代謝変換。

1) T. Matsuyama* et al., J. Biosci. Bioeng., 111, 175-177 (2011).
2) M. Yamanishi, T. Matsuyama*, submitted
*:corresponding author
e-mail:e1215@mosk.tytlabs.co.jp

Metabolic engineering, Cre-*lox* genetic switch, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：4C21a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ C校舎21会場

セレノメチオニン含有タンパク質生産のための硫黄代謝改変酵母株の創生

Genetic Engineering of Sulfur Metabolic Pathway for Selenomethionine-containing Protein Production

○喜多島　敏彦、地神　芳文、千葉　靖典（産総研・糖鎖医工学）
○Toshihiko Kitajima, Yoshifumi Jigami, Yasunori Chiba (AIST)

【目的】セレノメチオニン（SeMet）を含むタンパク質は、X線結晶構造解析における位相決定に有効である。しかしながら、SeMetの毒性により組み換えタンパク質の生産性は著しく低下してしまう。これまでに我々は、細胞内チオール化合物の特異的な減少がSeMetにより誘発されること、さらにSeMetにより引き起こされる生育阻害が、培地中へのシステインの添加により緩和されることを見出している。本研究では、硫黄代謝経路を改変することで野生型酵母へのSeMet耐性の付与を試みるとともに、これを用いたSeMet含有タンパク質生産の可能性について検討した。
【方法・結果】チオール化合物の前駆体であるシステインを高生産すべく、大腸菌由来のシステイン合成酵素遺伝子群（*cysE*、*cysK*）を酵母細胞内で高発現させた。酵母は本来*O*-acetylhomoserine依存的にシステインを合成するが、これら遺伝子を導入することで、*O*-acetylserine依存的なシステイン合成経路を併せ持つこととなる。実際、*cysE*、*cysK*高発現株における細胞内システイン含量を測定したところ、野生株に比べ約3倍にまで増加していた。一方、内在性システイン合成酵素遺伝子（*CYS3*）の破壊株に*cysE*、*cysK*を導入した、*O*-acetylserine依存的なシステイン合成経路のみをもつ酵母株は、システインを野生株の2倍程度しか蓄積しなかったにも関わらず、きわめて強いSeMet耐性を示した。この新規SeMet耐性株で発現させたモデルペプチドのSeMet置換率は約80%に達し、結晶構造解析において位相を決定するに十分であることが明らかとなった。以上の結果は、内在性のシステイン合成系がSeMetの細胞毒性発揮に寄与することを示唆するものであり、これを回避した株はSeMet含有タンパク質の実用的な生産に有用であることが本研究により実証されたといえる。

selenomethionine, cysteine synthesis, metabolomics

講演番号：4C21a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ C校舎21会場

分裂酵母の *ura4* 遺伝子破壊株における細胞溶解現象の解析

Analysis of cell lysis induced in *S. pombe ura4* mutants

○西野耕平、松尾祐児、水野康平、戒能智宏、川向　誠（島根大・生物資源・生命工学）
○Kouhei Nishino, Yuzy Matsuo, Kouhei Mizuno Tomohiro Kaino and Makoto Kawamukai (Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University)

ポリペプトンはカゼインタンパク質を酵素分解したものでアミノ酸や低分子量のペプチドを豊富に含んでいる窒素源であり、微生物の培養の際によく用いられる。このポリペプトンを含む培地（以下、YPD 培地）は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では頻繁に用いられているが、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においては敬遠されている。これはポリペプトンが分裂酵母の増殖に阻害的な効果を与えるためと言われているが、その詳細なメカニズムは不明である。

これまでの解析により分裂酵母の *ura4* 遺伝子破壊株(以下、*Δura4*)は YPD 培地で培養することで劇的な細胞溶解を起こすことを見出している。また、ポリペプトンの成分であるアミノ酸を培地に添加した場合も *Δura4* の細胞溶解を促進している。YPD 培地で培養した *Δura4* はザイモリエース感受性であり、またこの細胞溶解はソルビトールの添加によって抑圧されたことから YPD 培地における *Δura4* の示す細胞溶解は細胞壁の脆弱性に起因すると考えている。

ura4 遺伝子は *de novo* UMP 生合成経路において OMP を脱炭酸することで UMP を生成する酵素をコードしているが、*ura4* 遺伝子以外の UMP 生合成経路の酵素（Ura1、Ura2、Ura3、Ura5）をコードする遺伝子破壊株においては YPD 培地における細胞溶解は見られなかった。また、*ura4* 遺伝子以外の UMP 生合成経路の遺伝子破壊により *Δura4* の示す細胞溶解は抑圧された。さらにユビキノン生合成に関わる *coq8* 遺伝子と *ura4* 遺伝子の二重遺伝子破壊株においても細胞溶解は抑圧された。これは、UMP 生合成酵素の１つ Ura3 にユビキノンが必要であることを示唆している。これらのことから、YPD 培地における *Δura4* の細胞溶解は前駆物質である OMP の蓄積が関係している可能性が示唆された。

この細胞溶解現象を解明するために、我々は YPD 培地における *Δura4* の細胞溶解を抑圧する復帰突然変異株の取得を行い、その遺伝学的解析を行なった。復帰突然変異株の８株について遺伝学的に解析したところ、①それらはおそらく単独変異であること、②それらの単独変異株はウラシル要求性を示すこと、③それらの原因遺伝子は全て同一であることが分かった。これらの復帰突然変異株の原因遺伝子を同定するために、ゲノムライブラリーを導入して、原因遺伝子のスクリーニングを行なった。取得した候補プラスミドをシークエンスした結果インサート部位に *ura1* があることが分かった。これは、*ura1* に変異が入る事で *Δura4* の細胞溶解が抑圧されたと考えられ過去結果と一致する結果となった。今後、復帰突然変異株のゲノム上の *ura1* に変異があるかを確認するためにゲノムシークエンスを行う予定である。

metabolism, cell wall, polypeptone

講演番号：4C21a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ C校舎21会場

タイトル：【豆乳乳酸発酵で生成されるジアセチル低減に関する基礎的検討】
Title：【Analysis for lowering ジアセチル produced by lactic acid fermentation in soy milk】
○金子 大輔、五十嵐　俊教、青山 顕司（キッコーマン株式会社 研究開発本部 応用研究開発部）
○Daisuke Kaneko, Toshinori Igarashi, Kenji Aoyama (Kikkoman corp.)

【目的】ヨーグルト用スターターには、*Streptococcus thermophilus* と*Lactobacillus bulgaricus* が広く利用されているが、豆乳中では*S. thermophilus* のみが生育する。*S. thermophilus*単独で発酵した豆乳では青臭い香りが感じられることからその改善を目的とした。
【方法】供試菌株として*S. thermophilus* NBRC13957株を用いた。乳酸発酵で生じる芳香成分の揮発性代謝物質の定量にはヘッドスペースGC-MSを用いた。糖源の影響は半合成培地で確認し、窒素源の影響は豆乳をMF膜でろ過処理した透過液（豆乳ホエー）を用いて確認した。代謝に関わる各酵素の遺伝子発現は豆乳ホエーで培養した乳酸菌体からmRNAを抽出し、real-time PCR(SYBR Green I検出系)を用いてその転写量を測定した。発酵物の風味の官能評価は、2点比較法、3点比較法を用いた。
【結果】*S. themophilus*で豆乳を発酵すると、牛乳を発酵した場合に比較してジアセチルが多く生成された。一般的に豆乳のオフフレーバーの主要原因物質はヘキサナールと言われるが、豆乳発酵物中では乳酸菌が生成するジアセチルもオフフレーバーの一因であることが官能評価により確認された。ジアセチルの生成量に対する糖の種類の違いを調べたところ、ラクトースとスクロースでは差が認められなかった。一方、豆乳ホエーにカザミノ酸を添加して発酵したところ、ジアセチルの生成が抑制されたことから、豆乳と牛乳の窒素源の違いがジアセチル生成量に影響を及ぼしている可能性が示唆された。ジアセチルの生成経路は分岐鎖アミノ酸であるバリンの生合成経路から分岐しており、前駆体であるα-アセト乳酸から変換されることからジアセチルの生成にアミノ酸が強く影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、豆乳ホエーに各種アミノ酸を添加してジアセチルの生成量を比較したところ、分岐鎖アミノ酸（特にはバリン）を添加することで、ジアセチルの生成が著しく抑えられることが確認された。ジアセチルの生成に関連する酵素群の転写量をバリン添加と非添加の豆乳ホエーで比較したところ、バリン添加群において、acetolactate synthase, acetolactate decarbolxylaseの転写量が増加し、ketol-acid reductoisomeraseの転写量は減少した。バリンを添加することでα-アセト乳酸からアセトインまたはそれ以降の物質への代謝が促進され、ジアセチルの生成が抑えられたものと推察される。以上の結果から、豆乳にバリンを添加して供試菌で発酵させたところ、ジアセチルの過剰生成が抑制され、官能評価の結果でも有意に風味が改善された豆乳発酵物を得ることができた。

diacetyl, soymilk, *Streptococcus thermophilus*

講演番号：4C21a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ C校舎21会場

ピペロナール代謝微生物の探索

Screening of microorganisms involved in aldehyde metabolism

○土居志織、富田千晶、橋本義輝、小林達彦（筑波大院・生命環境）
Shiori Doi, Chiaki Tomita, Yoshiteru Hashimoto, and Michihiko Kobayashi
(Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】

ピペロナール（3-ベンゾジオキソール-5-カルボアルデヒド）は独特の甘い芳香を有する芳香族アルデヒドであり、香水や一般化粧品、食品香料の調合基剤、医薬品や麻薬の合成原料として使用され、今後も多分野での応用が期待される化合物である。ピペロナールはイソサフロールの酸化などによって化学的に合成されるが、コショウやバニラなどの植物から抽出される精油にも含まれ、自然界にも存在する天然化合物である。しかし、微生物によるピペロナール分解・代謝についてはこれまで全く報告がなく、生物における分解経路および代謝に関わる酵素は未解明である。本研究では、ピペロナールを代謝する微生物を探索することを目的とする。

【方法・結果】

各所から土壌サンプルを採集し、0.01 %ピペロナールを単一炭素源とする最少培地に添加し、28℃で7日間振盪培養を行った。培養液を新しい液体培地に植菌し(1 %)、最少培地中のピペロナール濃度を0.03 %まで段階的に上げながら、同条件で繰り返し集積培養を行った。培養液をピペロナール最少寒天培地に塗布し、コロニーを単離した。得られた複数の微生物のピペロナール代謝活性を休止菌体および無細胞抽出液を用いて高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定した。最も高いピペロナール代謝活性を持つ菌株の菌学的諸性質を調べた結果、運動性を持つグラム陰性の桿菌であると推定された。さらに、ピペロナールからの反応生成物をHPLCから分取・精製し、解析した。現在、本株を用いて炭素源、窒素源などの培地組成を検討し、ピペロナール代謝活性が最大となるような最適培養条件を検討しているところである。

【Key words】
screening, microorganism, metabolism

講演番号：4C21a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ C校舎21会場

二機能性ホルムアルデヒド固定酵素遺伝子を導入したメタノール資化性細菌の生育と代謝物動態
Metabolic alteration by introducing bifunctional formaldehyde-fixing enzyme into the methylotrophic bacterium; growth and metabolite dynamics

○梶原大輔、由里本博也、阪井康能（京大院農・応用生命）
○Daisuke Kajihara, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai (Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】
3-ヘキスロース-6-リン酸シンターゼ（HPS）と6-ホスホ-3-ヘキスロイソメラーゼ（PHI）は、メタノール資化性細菌のホルムアルデヒド固定経路の１つであるリブロースモノリン酸経路の鍵酵素である。我々はこれまでに*Mycobacterium gastri* MB19株由来の*hps*と*phi*を融合した二機能性ホルムアルデヒド固定酵素(HPS-PHI)を作製し、大腸菌や植物体で異種発現することにより、宿主にホルムアルデヒド耐性や資化能を付与することに成功している[1),2)]。本研究では、もう一つのホルムアルデヒド固定経路であるセリン経路をもつメタノール資化性細菌*Methylobacterium extorquens* AM1株にHPS-PHIを導入し、セリン経路とリブロースモノリン酸経路を共存させた際の生育への影響と代謝物動態を解析した。
【方法と結果】
M. extorquens AM1株において、HPS-PHIをセリン経路の鍵酵素であるセリン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子のプロモーター*PsgaA*の下流で発現させた株(*M. extorquens* AM1[*PsgaA*- HPS-PHI]株)、メタノールデヒドロゲナーゼのラージサブユニットをコードし*PsgaA*の20倍以上のプロモーター活性をもつ*PmxaF*の下流で発現させた株(*M. extorquens* AM1[*PmxaF*- HPS-PHI]株)、およびベクターのみを導入したコントロール株を作製した。メタノールを単一炭素源とする培養では、*M. extorquens* AM1[*PsgaA*- HPS-PHI]株ではコントロール株と比較してバイオマス収量が向上する一方で、*M. extorquens* AM1[*PmxaF*- HPS-PHI]株では低下した。この生育低下を補うことを目的として、HPS-PHI高発現により供給が不足することが予想されるリボース-5-リン酸およびエネルギー源であるギ酸を培養液中に添加したところ、*M. extorquens* AM1[*PmxaF*- HPS-PHI]株のバイオマス収量および生育速度が回復した。これを検証するためにペントースリン酸経路上の代謝産物および異化経路で生産されるNAD(P)HをLC-MS/MSを用いて測定した結果についても併せて報告する。

1) I. Orita *et al. Appl Microbiol Biotechnol.* **2007**, 76, 439-445.
2) Chen LM *et al. Biosci Biotechnol Biochem.* **2010**, 74, 627-35.

hps/phi, ribulose monophosphate pathway, methylotroph

講演番号：4C21a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ C校舎21会場

メチロトローフ細菌*Methylobacterium extorquens*のレアアース依存的メタノール代謝における*xoxF*の機能解析

Functional analysis of the *xoxF* gene in the methanol metabolism depending on the rare-earth in the methylotrophic bacteria *Methylobacterium extorquens*

○田代晋也、三井亮司[1]、谷明生[2]、佐々健太郎、岩間智徳、早川享志、中川智行、河合啓一[3]（岐大院・応生科、[1]岡山理大・理、[2]岡山大・植物研、[3]東海学院大）

○Shinya Tashiro, Ryoji Mitsui[1], Akio Tani[2], Kentaro Sasa, Tomonori Iwama, Takashi Hayakawa, Tomoyouki Nakagawa, Keiichi Kawai (Fac of Appl Biol Sci, Gifu Univ, [1] Fac of Sci, Okayama Univ of Sci, [2] Inst. Plant Sci. Res., Okayama Univ, [3] Tokai Gakuin Univ)

【目的】レアアースは様々な高度工業製品の性能向上に使用されているが、これら金属種の生態系への影響や生体内における役割など、その生物学的意義についてはほとんど解明されていない。我々はいくつかのメチロトローフ細菌において、レアアースによってメタノール脱水素酵素（MDH）活性が顕著に誘導されることを見いだしてきた[1)]。また、レアアース誘導型MDHは根粒菌などにも広く分布するが[2)]、その役割は不明である。本研究ではメチロトローフ細菌*Methylobacterium extorquens* AM1株におけるレアアース誘導型MDHの解析を行った。

【結果・考察】AM1株をはじめとする多くのメチロトローフ細菌はMDHがCa依存性であることから、メタノール／Ca培地で培養を行う。そこで、メタノール／Ca培地にレアアースであるLaを添加してMDH活性を測定した。その結果、メタノール／Ca+La培地に生育した菌体はメタノール／Ca培地での生育に比べ約3倍のMDH活性を示した。また、メタノール／Ca+La培養菌体からMDHを精製したところ、そのMDHの補因子はLaであった。さらに、そのN末端アミノ酸配列は主要なMDHとして報告されているMxaFではなく、第2のMDH遺伝子であるXoxFと完全に一致した。Δ*mxaF*株はメタノール／Ca培地には生育できないが、La添加によってそのメタノール生育能は完全に回復した。一方、Δ*xoxF*株はLaが存在してもメタノールに対して著しい生育阻害を示した。これらのことからAM1株は、Ca存在下でのメタノール生育ではCaを補因子とするMxaFがメタノール代謝を担っているが、La存在下ではLaを補因子とするXoxFがメタノール代謝において重要であることが明らかとなった。

本報告は生物におけるレアアース依存的な代謝系を見いだした初めての報告である。

[1)] Hibi *et al*. (2011) *J Biosci Bioeng*. 111: 547-549.
[2)] Fitriyanto *et al*. (2011) *J Biosci Bioeng*. 111: 613-617.

Methylobacterium extorquens, *xoxF*, rare-earth

講演番号:4C21a13
講演日時、会場:3月25日11:32～ C校舎21会場

メタン産生アーキア*Methanospirillum hungatei*におけるRuBisCOとPRKを利用した新規CO_2固定回路の解析

Bona fide phosphoribulokinase and RuBisCO in methanogenic archaeon, *Methanospirillum hungatei*

○河野 卓成、遠藤 千夏子、Mehrotora Sandhya、横田 明穂、蘆田 弘樹（奈良先端大・バイオ）
○Takunari Kono, Chikako Endo, Sandhya Mehrotora, Akiho Yokota, Hiroki Ashida (Grad. Sch. of Biol. Sci., NAIST)

【目的】カルビン回路は植物、藻類、光合成細菌などの光合成生物が利用する主要なCO_2固定回路である。Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)とphosphoribulokinase (PRK)はこの回路でのみ機能する。我々はメタン産生アーキア*Methanospirillum hungatei*がRuBisCO、PRKホモログ遺伝子を有していることを見出した。これまでRuBisCOとPRKを同時に有するアーキアは報告されておらず、アーキアにおけるこれら酵素の機能に興味が持たれた。本研究では、これらホモログの生化学的解析を行った。【方法】MhRuBisCOホモログ及びMhPRKホモログ大腸菌組換えタンパク質を用い、酵素学的解析を行った。【結果】MhRuBisCO及びMhPRKは、それぞれカルボキシラーゼ活性（V_{max} = 0.146 ±0.022)、PRK活性(V_{max} = 29.3 ±1.7, $K_{m(Ru5P)}$ = 0.28 ± 0.05)を有していることが明らかになった。しかし、*M. hungatei*は、カルビン回路酵素のfuructose-6-phosphateからribulose-5-phosphateへのステップを触媒する酵素遺伝子を欠いていた。興味深いことに、*M. hungatei*はリブロースモノリン酸経路の酵素遺伝子ホモログを有しており、これらの酵素が働くことで、欠けたステップが補完されると考えられた。このようなCO_2固定回路はこれまでに報告されておらず、新規の回路である。この発見はカルビン回路の進化的完成に関して、新たな知見が与えられると期待される。

Calvin cycle, Archaea, Photosynthesis

講演番号：4C21a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ C校舎21会場

海洋性硫黄酸化細菌*Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株のテトラチオン酸ハイドロラーゼに関する研究

Studies on a tetrathionate hydrolase from marine sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* strain SH

○金尾忠芳、橋本由希[1]、峠達也[1]、菊川寛史[1]、上村一雄（岡山大院・自科、[1]岡山大・農）
○Tadayoshi Kanao, Yuki Hashimoto[1],Tatsuya Toge[1], Hiroshi Kikukawa[1], Kazuo Kamimura
(Grad. School Natural Science, Okayama Univ., [1]Facul. Agri.,Okayama Univ.)

【目的】当研究室にて岡山県下津井の海水より単離された *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株は、その生育にナトリウムイオンを要求する好塩性硫黄酸化細菌である。低品位鉱石から有用金属を溶出させるバイオリーチングは塩濃度の高い環境下で行われる場合もあり、その際は好塩性の硫黄酸化細菌の利用が必要となる。本研究ではSH株のバイオリーチングへの応用に重要な硫黄酸化機構を解明するため、この代謝に関わる鍵酵素、テトラチオン酸ハイドロラーゼ（4THase）について研究を行った。我々は既に、テトラチオン酸を唯一のエネルギー源として無機塩独立栄養生育した SH 株菌体細胞より4THaseを精製し、その性質を明らかにした。本研究では、これをコードする遺伝子の単離と組み換え発現による活性型酵素の取得と解析を目的とした。
【方法】SH 株の4THase遺伝子を獲得するために、精製した本酵素のN-末端アミノ酸配列および同じ *Acidithiobacillus* 属の *A. ferrooxidans, A. caldus* に由来する同酵素の一次配列の共通部分よりプライマーをそれぞれデザインし、SH 株のゲノムDNAを鋳型にPCRを行った。これによって得られた約 0.5kbpの遺伝子断片をプローブとして、SH 株ゲノムプラスミドライブラリーよりコロニーハイブリダイゼーションによって本酵素遺伝子を獲得した。推定されるシグナル配列を除去した遺伝子（SH-*tth*）を大腸菌に導入した。組み換えタンパク質の封入体は、6M グアニジン塩酸塩により変性させた後、酸性条件下にて refolding 処理を行った。4THase 活性測定は、反応液中のテトラチオン酸をシアノリシス法により定量し、その減少量から求めた。
【結果】PCRによって得られた約0.5 kbpのSH-*tth* 遺伝子断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを行った結果、約1.5 kbpの断片に目的遺伝子がコードされていた。シグナルペプチドを除いた SH 株の4THase遺伝子は、1443 bp, 481アミノ酸から成るタンパク質をコードしていた。SH-Tthは一次構造において*A. ferrooxidans* 由来の*Af*-Tth と57%の同一性（73%の相同性）を示した。この遺伝子の発現ベクターを構築し、大腸菌に導入・発現したところ、不溶性の封入体を形成し、活性は検出できなかった。しかしながら、この封入体をグアニジン塩酸塩で変性後に 酸性条件下（pH4.0）で refoldingすることによってSH-Tthを活性型酵素として獲得することに成功した。組み換え型本酵素の反応最適 pH は pH3.0 と決定され、好酸性細菌であるSH 株の細胞質外酵素としての特徴を示した。また、酸性条件下におけるrefoldingによる活性の回復は、SH株の菌体においては、本酵素がシグナル配列を介して酸性のペリプラズム空間に分泌された後に折りたたまれて成熟することを示唆している。

tetrathionate hydrolase, sulfur metabolism, acidophilic bacteria

講演番号：4C21a15
講演日時、会場：3月25日11:54～ C校舎21会場

ギンネム土壌由来*Arthrobacter*属ミモシン資化性菌の持つミモシン分解酵素のクローニング及びその発現制御

Purification and cloning of mimosine degradation enzyme from *Arthrobactor* sp. *Leucaena* soil bacteria and its regulation.

○安里 将仁、小林 広幸、大城 拓人、福田 雅一、多和田 眞吉（琉球大・農）
○Masahito Asato, Hiroyuki Kobayashi, Hirito Oshiro, Masakazu Fukuta, Shinkichi Tawata (Department of Bioscience and Biotechnology, Ryukyu University)

【目的】熱帯・亜熱帯に繁茂するマメ科植物ギンネムは、非タンパク性毒性アミノ酸ミモシンを有している。ギンネム周辺の環境では、ミモシン資化性菌と呼ばれる土壌細菌、反芻動物のルーメンバクテリア、ギンネムキジラミなど、ミモシン分解酵素を持つことによりミモシンを炭素・窒素源として生活する生物が存在している。本研究室では琉球大学の土壌より単離した、いくつかのミモシン資化性菌の中の一つである、*Arthrobactor*属ミモシン資化性菌が持つミモシン分解酵素の精製、及びミモシン分解酵素遺伝子のクローニングを行うことにより、ミモシン分解酵素遺伝子の構造、分子進化的由来、ミモシンにより誘導され、グルコースにより抑制される発現制御機構等を調べることにより、ギンネムとその周辺環境生物との関係を探ることを目的とする。
【方法】ギンネム土壌よりミモシンを含む寒天培地で生育する菌のうち、16SrDNAの解析により*Arthrobactor*属と判明したミモシン資化性菌をミモシン含有液体培地で培養し、超音波破砕により粗酵素を抽出した。その後、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、HPLCを行うことによりミモシン分解酵素を精製した。さらにクリーブランド法、トリプシン消化を行い、プロテインシーケンサーを用いて内部アミノ酸配列の分析後、縮重プライマーを用いたPCR、Inverse PCRによりミモシン分解酵素遺伝子の塩基配列を決定した。また、得られたミモシン分解酵素のアミノ酸配列についてBlast searchを行った後、ClustalWでにより系統樹を作成した。
【結果】この*Arthrobactor*属のミモシン資化性菌のミモシン分解酵素遺伝子は1167bpの塩基配列、388残基のアミノ酸からなり、計算された分子量43024.7Daは、SDS-PAGEによって得られた分子量である約43kDaとほぼ一致した。ホモロジー解析から、*geodermatophilus*属のシスタチオニンβ-リアーゼと56%と最も高い相同性を示した。唯一報告されているHawaii大学のグループによる*Rhizobium*属の持つミモシン分解酵素とは28%の低い相同性を示した一方、本研究室でクローニングしたギンネム、オジギソウのミモシン分解酵素とはさらに低い相同性を示し、これらは進化的に異なる起源を持つ事が推察された。また、ゲノム解析により、コード領域の上流にはSD、-10様配列、下流にはトランスポーターと思われる配列が見出された。

Leucaena, mimosine degradation enzyme, regulation

講演番号：4C22a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ C校舎22会場

キシラン添加による*Lactobacillus brevis*の沈降作用について

Effect of xylan addition on sedimentation of *Lactobacillus brevis*

○齋藤 勝一、舟根 和美（農研機構・食総研）
○Katsuichi Saito, Kazumi Funane (NARO-NFRI)

【目的】乳酸菌は乳製品に加え漬物や醤油など古くから植物を原料とする発酵食品の製造に関わる主要な発酵菌種である。近年では植物に由来する乳酸菌の飲料などへの積極的利用が行われ、これら乳酸菌がプロバイオティクス乳酸菌として乳製品由来の乳酸菌とは異なる能力を有していることが明らかになってきた。しかし、これまで植物由来乳酸菌の自然界における局在や植物との相互作用などの生態特性は明らかになっていない。そこで本研究では、乳酸菌と植物の相互作用の解明に向け、乳酸菌と植物質基質の吸着能に着目し、吸着・凝集能を有する乳酸菌株と植物質基質の探索を目的に検討を行った。
【方法】乳酸菌として(独)製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源部門(NBRC) 及び当所保有の*Lactobacillus*属、*Leuconostoc* 属、*Pediococcus*属等乳酸菌計14種41菌株を用い、植物質基質としてセルロース、キシラン、ペクチン、ポリガラクツロン酸、グルコマンナンなどの多糖成分並びに小麦ふすま、小麦胚芽、小麦粉、麦稈など計15種を用いた。各乳酸菌株をMRS培地で30℃、24時間静置培養し、得られた培養液2 mlに対し植物質基質20 mgをそれぞれ添加、混合後、室温で静置し目視により試料の観察を行った。また、静置試料から一定時間毎に上層液を抜き取りOD_{600}を測定し、沈降作用の定量的な評価を行った。加えて、MRS培地のグルコースをキシロースなどその他炭素源に置き換えた培地を用い、30℃、24時間の静置培養を行い、HPLC、TLCにより培養上清中の有機酸、残糖の分析を行った。
【結果】各種乳酸菌株と植物質基質を組み合わせ作用を確認した結果、*Lactobacillus brevis* NBRC 3960と燕麦由来のキシランの混合により顕著かつ速やかな菌体の沈降が認められた。そこで*Lactobacillus pentosus* NBRC 106467およびセルロースを対照に、初発OD_{600}をおよそ1に調製し菌体沈降の定量評価を行ったところ、混合4.5時間後には*Lb. brevis* NBRC 3960とキシランの組み合わせでは菌体は完全に沈降し上層液のOD_{600}も培地バックグラウンドに相当する約0.2まで低下した。それに対し、菌体のみの場合や*Lb. brevis* NBRC 3960とセルロース、*Lb. pentosus* NBRC 106467とキシランなどの場合のOD_{600}はいずれも0.7以上で懸濁状態を維持していた。また、*Lb. brevis* NBRC 3960をキシランの構成糖であるキシロース、アラビノースを炭素源とした培地で培養した場合には菌体生育及び乳酸の生成が確認できたのに対し、キシランを炭素源とした場合には生育及び乳酸生成共に確認できなかった。このためキシラン添加による*Lb. brevis* NBRC 3960の沈降作用は、この組み合わせの場合にのみ生じる特異的な作用であり、キシランの資化、分解を伴わない吸着等の作用により生じるものと推察された。現在、キシラン添加による*Lb brevis* NBRC 3960の沈降機構の解明に向け、菌体の調製条件やキシラン添加時のｐH、添加濃度などの影響について検討を行っている。

Lactobacillus brevis, xylan, sedimentation

講演番号：4C22a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ C校舎22会場

沖縄ヤンバル林のセルロース分解微生物

Cellulolytic soil microbes in the Yambaru forest, Okinawa.

○藤井　克彦、大杉　紋可、関内　詩織（山口大・農）
○Katsuhiko Fujii, Ayaka Osugi, Shiori Sekiuchi (Yamaguchi University)

【目的】セルロース分解微生物として、反芻動物や昆虫の消化器に棲息する嫌気性細菌や倒木表面で活動する木材腐朽菌がよく研究されているが、土壌中でセルロース分解に関わる種の全容は十分には解明されていない。また、集積培養で分解微生物の分離を試みる場合は、最も生育が速い種や抗菌物質を生産する種が優占種として生育し、それら以外の種は培養中に淘汰される傾向にある。演者らは以前の研究で、優占種による他種微生物の淘汰を抑制できる微生物分離法を検討し、温帯森林土壌のセルロース分解微生物を分離したところ、1箇所の土壌から8属にわたる糸状菌株ならびに2属の細菌株を分離でき、従来法と較べて広範な属種を探索できることがわかった。そこで本研究では、亜熱帯土壌に生息するセルロース分解微生物ならびにその酵素活性について検討することとした。

【方法】沖縄県北部国頭村に位置する琉球大学附属亜熱帯フィールド科学教育研究センター与那フィールド演習林にて森林土壌を採集した。無機塩寒天培地を調製し、これに森林土壌懸濁液を接種し、その上から滅菌済ろ紙をかぶせた上で30℃にて静置培養した。ろ紙上に出現したコロニーは形態学的特徴に基づいて分離を行うとともに、各分離株のリボソームDNA部分塩基配列を決定し、系統解析を行った。さらに、分離株のセルラーゼ、キシラナーゼ、ラッカーゼ活性を測定した。

【結果】ろ紙をかぶせた寒天培地で土壌懸濁物を2週間培養した結果、ろ紙上に様々なコロニーが出現した。そのコロニー数はグルコースを炭素源とする無機塩寒天培地で出現した数の約1%であった。リボソームDNAに基づく分類では、糸状菌株は3属（*Trichoderma*, *Gliocephalotrichum*, *Chaetomium*）、細菌は9属（*Burkholderia*, *Kitasatosporia*, *Streptomyces*, *Leifsonia*, *Sphingomonas*, *Silvimonas*, *Pandoraea*, *Elwinia*, *Dyella*）に分けられた。それぞれの属の代表株について酵素活性を検討したところ、セルラーゼに加えてキシラナーゼあるいはラッカーゼ活性も併せ持つ株が多かった。

Cellulolytic microbe, Okinawa, subtropical forest

講演番号：4C22a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ C校舎22会場

タイトル 衣類の黒斑汚れ解析

Title Analysis of fungal species causing black spots in clothes

久保田 浩美、千田 昌子、○佐藤 惇、三谷 あさこ、伊澤 啓文[1]、田中 篤[2]、山口 紀子[1]、矢口 貴志[3]、人見 潤

花王 安全性研、[1]花王 HH研、[2]花王 解析研、[3]千葉大 真菌医学研究センター

Hiromi Kubota, Shouko Senda, ○Jun Sato, Asako Mitani, Yoshifumi Izawa[1], Atsushi Tanaka[2], Noriko Yamaguchi[1], Takashi Yaguchi[3], Jun Hitomi

Kao Corp. Safety Science, [1]Kao Corp. Household Products, [2]Kao Corp. Analytical Science, [3]Chiba University

【目的】生活者が洗濯衣類の中で頻繁に経験する不快な着色汚れとして細かい斑点状の黒色汚れ（黒斑汚れ）があげられる。本研究ではこの黒斑汚れには微生物が関わっていると考え、関与微生物を単離して同定を行った。

【方法および結果】黒斑汚れを有する様々な衣類35点を回収し、そのまま、あるいは黒色部分の繊維を取り出して光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡を用いて観察を行ったところ、汚れの主体は黒色の真菌であると考えられた。各サンプルの黒色部分の繊維から直接DNAを抽出し、28S rRNA遺伝子のD2領域の塩基配列の解析を行ったところほとんどのサンプルでDNAの配列の解読が可能であったため、優占して存在する菌種が存在していると推定された。一方、黒色部分の繊維を生理食塩水に浸漬、攪拌して抽出した溶液を ポテトデキストロース寒天（PDA）培地に塗沫後、25℃で培養して得られたコロニーを単離し、28S rRNA遺伝子のD2領域の塩基配列の解析を行った。次に、直接抽出して得られたDNAのD2領域の塩基配列と一致した配列を持つ単離菌株を各衣類サンプルにおいて黒斑汚れを形成している主原因菌として、コロニー観察、顕微鏡による形態観察、およびD2領域の塩基配列を基にした系統樹解析による同定を行った。その結果、各サンプルの主原因菌は*Exophiala* sp.、*Phialophora* sp.、*Phoma* sp.などの黒色真菌と同定された。これらが黒斑汚れの原因であることは初めての知見である。この中で、最も頻度高く原因となる*Exophiala* sp.は、D2領域において分子系統的に既知の種とは一致しなかった。さらに、これらの菌は様々な衣類中では環境ストレスに強い状態、例えば厚膜胞子様の形態で存在していることも明らかとなった。

black spots, black fungi, *Exophiala*

講演番号：4C22a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎22会場

せんだんご製造工程中におけるデンプン分解微生物の解析

Microbial degradation of the starch in the process of Sendango production

○熊谷　浩一、岡　大貴、田中　尚人[1]、佐藤　英一、岡田　早苗（東農大応生科・化学、[1]東農大・菌株）

○Koichi Kumagai, Daiki Oka, Naoto Tanaka[1], Eiichi Satoh, Sanae Okada (Dept. Appl. Biol. Chem. Tokyo Univ. Agr., [1]NRIC, Tokyo Univ. Agr.)

【目的】長崎県・対馬地方の「せんだんご」は冬季の数カ月間サツマイモに多種多様な微生物が増殖して製造される固有の食品加工素材である[1)]。せんだんごをさらに麺状に加工した「ろくべえ」は、サツマイモとは全く異なる特徴的な食感がある。この食感は、せんだんごの構成成分である約90%を占めるデンプンと5%程の食物繊維が関与しており、特にデンプンにおいて、サツマイモデンプンとは異なった分子量分布を示し、アミロペクチンが特異的に分解されていると考えられている[2)]。筆者は、せんだんご製造工程中から分離したカビのデンプン分解能を調べ、2種のカビによる分解がサツマイモデンプンの物性変化の一因である可能性を報告した[3)]。そこで本研究では、せんだんご製造における、物性変化を引き起こす微生物の作用を理解するため、せんだんご製造に関与する微生物を明らかとすることを目的とした。

【方法・結果】供試菌株としてカビは過去に分離・選抜された*Penicillium* sp. 38-1及び40-6の2株を用いた。細菌は、過去に分離した164株を用い、サツマイモデンプン含有寒天培地・15℃にて培養後、ヨウ素添加によるハロ形成の確認によりデンプン分解細菌を選抜した。デンプン分解細菌を同液体培地・15℃にて培養後、培養上清を回収し、薄層クロマトグラフィー(TLC)によりデンプン分解産物の検出パターン解析を行い、各パターンから細菌の代表株を1株ずつ選抜し供試菌株とした。各代表株により発酵させたデンプンの分子量分布を検討するため、同液体培地・15℃にて培養後、分解によって生じるデンプンを回収し、ゲルろ過法にて解析した。

デンプン分解細菌を15株選抜し、TLCにより3パターンのデンプンの分解が確認された。各パターンから*Bacillus* sp. 4-1、*Paenibacillus* sp. 37-2及び10-10を代表株として選抜した。せんだんごデンプンの分子量分布は、サツマイモデンプンと比較して、高分子量のアミロペクチン(F1,F2画分)の割合が減少し、低分子量(F3画分)の割合が増加していることから、アミロペクチンが分解されていることがわかった[2)]。供試菌株により発酵させたデンプンの分子量分布では、*Penicillium* sp. 38-1はF1画分の割合が、*Penicillium* sp. 40-6ではF2画分の割合が減少した。また、*Bacillus* sp. 4-1、*Paenibacillus* sp. 37-2及び10-10は、F1,F2画分の割合が減少し、F3画分の割合が増加した。以上の結果より、選抜した菌株は、アミロペクチンを分解し、せんだんごデンプンの分子量分布に類似する分解パターンを示すことが示唆された。

[1)]熊谷ら　2010年度日本農芸化学会　大会講演要旨集　p. 63
[2)]岡ら　日本食品科学工学会　第57回大会講演要旨集　p. 86
[3)]熊谷ら　2011年度日本農芸化学会　大会講演要旨集　p. 232

Sendango, starch, microoganism

講演番号：4C22a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎22会場

新規ポリ塩化ビフェニル分解細菌の単離

Isolation of Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacteria

○室月 祥枝、田中 俊也、髙塚 由美子、神尾 好是、原 富次郎（山形大院・理工）
○Sachie Murotsuki, Toshiya Tanaka, Yumiko Takatsuka, Yoshiyuki Kamio, Tomijiro Hara (Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University)

【背景と目的】

難分解性有機塩素化合物であるポリ塩化ビフェニル（PCB）は、生体の内分泌系を攪乱することが顕著な有害物質である。PCB は残留性有機汚染物質（Persistent Organic Pollutants；POPs）の一つに含まれ、POPs による地球規模での汚染が懸念されている背景から、国際的に協調した廃絶・削減の取組みが進められている。

PCB に有効な無害化方法の一つとして微生物による分解が挙げられるが、PCB を分解する微生物については、これまでに土壌などの環境中試料から数種属が単離され、それらの諸性質や機能等に関して報告されてきた。我々はダイオキシン等の内分泌攪乱物質の生物分解による無害化研究の過程において、山形県米沢市内の土壌や汚泥などの環境中試料より、新規 PCB 分解細菌株を単離した。今回、本菌株の性質および機能について報告する。

【方法と結果】

米沢市内および近郊で採取した土壌や浄水場の活性汚泥など 17 種類を試料として用い、ビフェニルを炭素源とし、pH を変化させた３種類の合成培地でビフェニル分解菌をスクリーニングした。生育したビフェニル資化菌（群）24種類の中から、生育の速い１種類を選抜して単離し、16S rDNA 解析およびアピキットにより判定した結果、*Comamonas testosteroni* と同定され、本菌株を YU14-111株と命名した。

YU14-111株における PCB 分解活性を、凍結保存後にリン酸緩衝液中で解凍した菌体を用いて検討した。PCB 標準品であるカネクロール KC-300と撹拌反応させた結果、本菌体は、5 時間後に 70%以上、さらに 16 時間後に 80%以上と、短時間で極めて高い分解活性を示した。本菌のPCB分解特性を詳細に解明するため、現在、本菌株ゲノム上のビフェニル分解酵素遺伝子（*bph*）群の構造を解析中である。

本菌株の凍結融解菌体が高い PCB 分解活性を保持した知見は、将来の細菌製剤化への可能性を示唆しており、今後は実用化に向けた検討も行っていく予定である。

polychlorinated biphenyls, biodegradation, *Comamonas testosteroni*

講演番号：4C22a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎22会場

カルバゾールを分解する新規海洋性細菌の分布に関する研究

Distribution research for new carbazole degradation marine bacteria

○小和田 真純、茂野 俊也、岩田 健一、大森 俊雄（芝工大・シ工・生科）
○Masumi Owada, Toshiya Shigeno, Kenichi Iwata, Toshio Omori (Department of Bioscience and Engineering, Shibaura Institute of Technology)

【目的】当研究室では、海水や土壌からカルバゾール等の難分解性環境汚染物質を分解する細菌を多数単離し、その諸性質を検討している。これらの細菌の16S rRNA遺伝子配列に基づく系統樹を作成した結果、海水から分離された５菌株は１つの独立したグループを形成し、相同性検索の結果から近縁の既存種が存在しないことが明らかになっている。このため、本グループは新属と考えられ、*Aequoricola*属を提案している。本研究では、*Aequoricola*属細菌が、海洋にのみ存在する海洋性細菌であるのかを土壌試料等を用いて特異的ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により検討した。
【方法】16S rRNA遺伝子配列を対象とした*Aequoricola*属に特異的なPCR用プライマーを作成し、その特異性を確認した。検出感度を高めるためにnested-PCRの適応も検討した。検出限界値の検討は、*Aequoricola*属細菌OC6S株の培養細胞を水試料及び土壌試料に添加して行った。土壌試料を用いた場合は、滅菌水に懸濁後、超音波処理を行い、低速遠心分離で土壌粒子を除いた後、フィルター（ポアサイズ0.2 μm）にて細胞を捕集した。捕集された細胞はフィルターと共にビーズビーダーで破砕を行って実験に供した。PCRおよびnested-PCRで得られた増幅産物は、アガロース電気泳動法でサイズを確認した。さらに３種類の制限酵素（*BssS*Ⅰ, *Sma*Ⅰ, *Sph*Ⅰ）による切断パターンの確認及び塩基配列のシークエンスによって*Aequoricola*属グループとの相同性を検討した。
【結果】*Aequoricola*属の16S rRNA遺伝子を対象とした特異的プライマー（AC-F, AC-R）をデザインした。PCRにより特異性の確認を行った結果、*Aequoricola*属細菌（５菌株）からのみ期待される約644bpのPCR産物が検出された。これらのPCR産物のシークエンスを行ったところOC6S株の16S rRNA遺伝子の塩基配列と99パーセントの相同性が見られた。OC6S株の培養細胞を用いた土壌添加回収実験において特異的プライマーを用いた結果、検出限界が求められなかった。そこで、検出感度を高めるため、真正細菌用のユニバーサルプライマーである1500-Rと組み合わせたnested-PCRを検討した結果、100cells/tubeの感度での検出が可能となった。以上の結果を踏まえ、大学周辺の8ヶ所から採取した土壌試料を対象として*Aequoricola*属細菌の検出を行ったところ２試料から*Aequoricola*属細菌と思われるPCR産物を得た。このPCR産物は、３種類の制限酵素による切断パターンも*Aequoricola*属細菌と一致し、シークエンスの結果、*Aequoricola*属細菌と96-99パーセントの相同性を示した。現在、このPCR産物の由来と考えられる細菌の単離を行っている。

Aequoricola, carbazole, marine bacteria

講演番号:4C22a07
講演日時、会場:3月25日10:16～ C校舎22会場

便器表面より単離した*Rhizobium* 属細菌 R8株のバイオフィルム形成に関与する生体分子

Biomolecules that are related to biofilm formation of *Rhizobium* sp. R8 isolated from a toilet bowl

○深野 透、高橋 康徳、五味 満裕[1]、大崎 幸彦[1]、三輪 京子、森川 正章
北大院環・分子生物,[1]小林製薬・中研
○Toru Fukano, Yasunori Takahashi, Mitsuhiro Gomi[1], Yukihiko Osaki[1], Kyoko Miwa, Masaaki Morikawa
Graduate Sch. of Environ. Sci, Hokkaido University [1]Central R&D Labo., Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd.

【背景・目的】便器の黒ずみを形成する原因の１つであるカビの付着には、便器表面に初期付着した細菌が形成するバイオフィルムの関与が示唆されている。私たちはこれまでに、洗浄して3日後の便器表面に形成されたバイオフィルムサンプルから培養可能な細菌 11菌株を単離し(R1～R11)、その中で最もよくバイオフィルムを形成するものが *Rhizobium* 属細菌 R8株であることを報告している。本研究では R8株に注目し、系統解析および、そのバイオフィルム形成に関与することが予想される膜タンパク質と細胞外多糖(EPS)の分析を行った。
【方法・結果】分子系統解析の結果、R8株は *Rhizobium giardinii* H152^{T}株と最も近縁であり 16S rRNA 遺伝子配列で98.9%の相同性を有していた。しかし、人工尿培地や R2A培地などにおいて高いバイオフィルム形成能力を有する R8株に対して *R. giardinii* NBRC107135^{T} (＝H152^{T})株はバイオフィルムをほとんど形成しなかったことからR8株は便器表面環境によりよく適応した新規細菌であることが示された。

次に、R8株の浮遊細胞とバイオフィルム細胞のタンパク質発現パターンを比較した。菌体を破砕した後、超遠心分離により膜画分と可溶性画分とに分画し、それぞれをSDS-PAGEに供した。その結果、バイオフィルム細胞に特異的に発現している約 60kDaの膜タンパク質(MP60)が検出された。MP60の N末端アミノ酸配列を 10残基決定しデータベース検索を行なった結果、類似のものはなく新規膜タンパク質であることが示唆された。

一方これまでに *Rhizobium* 属細菌においてマンニトールが EPS生産を促進することが報告されている。そこで、マンニトールを含む YM寒天培地で R8株を培養したところ大量の EPSの生産を確認した。また、R2A培地においてマンニトールを添加したところバイオフィルム形成量が上昇した。すなわち、本 EPSがバイオフィルム形成に関与していることが予想されたので、粗精製及び分析を行った。R8株のコロニーを回収し、滅菌水で懸濁して遠心分離により菌体を除去した後に、50%エタノール沈殿により EPSを回収した。次に、加水分解の後ピリジルアミノ化誘導体を作成し HPLCにより構成糖を分析した。その結果、グルコースが含まれていることが示唆されたが、一般的な *Rhizobium* 属細菌の EPSの構成糖であるガラクトース、グルクロン酸は含まれていなかった。現在、HPLCで分画した各ピークを分取して、NMRなどによる解析を計画している。

toilet bowl, biofilm, *Rhizobium*

講演番号：4C22a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ C校舎22会場

循環型モデル浄化槽における細菌叢遷移とタンパク質分解反応に関わる酵素活性の解析

Dynamics of the bacterial community composition and the enzymatic activities involved in proteolytic mechanism in the lab-scale wastewater treatment system

○菊池 駿太郎、下村 和之、冨岡 顕治、中田 京[1]、甲木 幸枝[1]、鈴木 智順（東理大院理工・応生科、[1]東理大理工・応生科、）

○ Shuntarou Kikuchi, Kazuyuki Shimomura, Kenji Tomioka, Miyako Nakata, Sachie Katsuki, Tomonori Suzuki (Touridai)

【目的】環境中における普遍的な有機物分解反応の詳細な解明を目的として、本研究では複合微生物系におけるタンパク質の合成、分解反応に着目した。

【方法】生物学的な有機物分解過程を細菌叢、水質の両面でモニタリングすることが可能な循環型モデル浄化槽を構築した。この循環型モデル浄化槽の細菌叢を 16S rDNA を対象として複数のプライマーセットを用いた PCR-DGGE 法によって解析した。 また、タンパク質の合成、分解に伴う代謝活性を推定する為に 16S rRNA を抽出し、逆転写と PCR を介した RT-PCR-DGGE 法によりに rRNA 量の変化を解析した。さらに各種プロテアーゼ（Aminopeptidase、Trypsin、Chymotrypsin、Elastase、Cathepsin 型の計 5 種類）および AST (Aspartate amino Transferase) 活性の測定を行った。この他に、汚水処理時の水質をモニタリングする指標として BOD、COD、タンパク質量、$N\text{-}NH_3$ 量をそれぞれ定量した。

【結果】PCR-DGGE 法による細菌叢解析の結果、処理装置内には *Bacteroidetes* 門、*Alcaligenes* 属、*Firmicutes* 門に属する細菌が恒常的に定着していることが判明し、処理時間(0～120 h)に伴う細菌叢の大きな変化は見られなかった。これに対し RT-PCR-DGGE 法では有機物分解に積極的に関与していると考えられる濃い DGGE バンドとして *Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門に属する細菌が確認され、そのバンドパターンは時間経過により変化した。なお、RT-PCR-DGGE と PCR-DGGE のバンドパターンは必ずしも一致せず、優先種として定着した細菌は常に活発な代謝活性を持つわけではないことが確認された。また、汚水処理中は BOD、COD が経時的に減少したが、タンパク質量は汚水処理中期 48 h まで増加し、その後を追う形で各種プロテアーゼは処理後期 72 h で最大の活性を示した。これに対し、AST 活性は処理初期(3～24 h)に顕著な上昇を示し、中期(36～60 h)まで一定の活性を維持した。このように COD 計測により観察された総体的な有機物の減少とは独立してタンパク質量とその分解酵素活性は複数のピークを示し、有機物の分解過程は合成と分解による顕著なタンパク質の増減が繰り返されて進行することが確認された。また、その各反応と連動する形で RT-PCR-DGGE バンドパターンは変化しており、代謝活性の変化を示す 10 種類以上の細菌に由来するバンドが検出された。

Bacterial flora, PCR-DGGE, Proteolytic enzyme

講演番号：4C22a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ C校舎22会場

循環型モデル浄化槽内の細菌・バイオフィルム・真核微生物における代謝活性変動のrRNAを用いた比較解析

Comparative analysis of rRNA on the metabolic activity of bacteria, biofilm, eukaryote in the lab-scale wastewater treatment system

○甲斐 隆之、冨岡 顕治、下村 和之
高城 茉那[1]、真辺 春香[1]、鈴木智順（東理大院理工・応生科、[1]東理大理工・応生科）
○Takayuki Kai, Kenji Tomioka, Kazuyuki Shimomura, Mana Takagi, Haruka Manabe, Tomonori Suzuki(Touridai)

【目的】循環型モデル浄化槽内では細菌・真菌・原生生物などが存在し、バイオフィルムを形成している微生物や単独で浮遊している微生物など様々な形態をとって浄化槽内に定着している。本研究ではその中で、有機物分解に関与する微生物叢および、細菌と真核微生物との相互作用やバイオフィルムの形成が有機物分解能に与える影響の解明を目的としている。
【方法】細菌や真核微生物などが混在する通常の浄化槽（通常型浄化槽）に加え、メンブレンフィルターとチオファネートメチルを用いて真核微生物を除去し、細菌のみにした浄化槽（細菌型浄化槽）、メンブレンフィルターを用いてバイオフィルムを形成している微生物のみにした浄化槽（バイオフィルム形成型浄化槽）計3種類の浄化槽を構築した。各浄化槽の有機物分解能は、人工汚水を200 ml 加えた際の水質挙動を経時的に追う方法を行い、BOD, COD, pH, アンモニア態窒素量、微生物数、バイオフィルムの大きさを測定することで比較した。微生物の代謝活性変動は、rRNAを抽出し、RT-PCR-DGGE法により解析した。
【結果】BOD・CODの挙動から有機物分解能は「通常型浄化槽」＞「細菌型浄化槽」＞「バイオフィルム形成型浄化槽」の順に高い値を示した。このことから細菌と真核微生物が共生している状態が最も有機物分解能が高くなると考えられる。さらに、バイオフィルムの大きさの比較からバイオフィルムが大きいほど有機物分解能が上昇し、*Bacteroidetes*門、*Sphingobacteriaceae*門、*Porphyromonadaceae*門に属する細菌が主にバイオフィルムを形成していた。16S rRNA代謝活性解析の結果、*Bacteroidetes*門、*Sphingobacteriaceae*門に属する細菌の代謝活性量が高いことがわかった。通常型浄化槽のRT-PCR産物のDGGEバンドパターンから0～24hでは好気層細菌、36～72hでは嫌気層細菌の代謝活性が高く、細菌型浄化槽では、3, 24, 36, 72, 96hで好気層細菌の代謝活性が高く、嫌気層細菌では0, 96hのみ代謝活性が高かった。通常型浄化槽の18S rRNA代謝活性解析から、真核微生物は原生生物であるCercoza門、Collpodella門の代謝活性が高く、RT-PCR産物のDGGEバンドパターンから、18, 36, 48, 60hのみ代謝活性が高かった。原生生物の代謝活性量が低い時間帯でもBOD値は下がっており、原生生物自体は有機物分解に関与していないと考えられるので、今後は純粋分離で得られた真菌で浄化槽を構築し、真菌の浄化機能を解明していく予定である。

Microbial ecology, Metabolic activity, RT-PCR-DGGE

講演番号:4C22a10
講演日時、会場:3月25日10:49～ C校舎22会場

蛍光菌Pf0-1株のバイオフィルム形成を促進するジグアニル酸シクラーゼの同定

Identification of diguanylate cyclases promoting biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1

○吉岡　資郎、ニューウェル　ピーター[1]、オツール　ジョージ[1]（分子研、[1]ダートマス医大）

○Shiro Yoshioka, Peter D. Newell[1], George A. O'Toole[1] (Institute for Molecular Science, [1]Dartmouth Medical School)

【目的】c-di-GMPは、GGDEFドメインを含むジグアニル酸シクラーゼ（以下DGC）により２分子のGTPから合成される環状ジヌクレオチドであり、バクテリアに特有のセカンドメッセンジャーとして機能する。蛍光菌*Pseudomonas fluorescens* Pf0-1株は無機リン酸存在下バイオフィルムを形成するが、これは細胞内のc-di-GMPの濃度上昇に応じて巨大接着タンパク質LapAが細胞表面に局在化する事により達成される。ごく最近の研究から、２回膜貫通型タンパク質LapDが細胞質内のc-di-GMPを検知し、ペリプラズムに存在するLapGのプロテアーゼ活性を阻害する事によってLapAの局在化を制御している事が明らかにされた。一方、本菌のゲノム解析によってDGCに分類された遺伝子は３８も存在するが、どのDGCがc-di-GMPを合成しバイオフィルム形成を促進するのかこれまで明らかにされていなかった。本研究では、蛍光菌Pf0-1株のバイオフィルム形成を促進するDGCの同定を試みた。

【方法】GGDEFまたはGGEEFモチーフを持ち酵素活性を有すると推定される３０のDGC遺伝子に着目し、相同組換えにより各DGC遺伝子の機能を阻害した変異体を作製した。これら変異体についてバイオフィルムアッセイを行い、天然型に比べてバイオフィルム量が減少するものを探索した。バイオフィルムアッセイは市販の塩化ビニル製９６ウェルマイクロプレートを用いて行い、クリスタルバイオレット(CV)により可視化した。３０％酢酸水溶液により可溶化したCV水溶液の550nmの吸光度を定量する事で、各変異体のバイオフィルム形成量を見積もった。

【結果】グリセリンとトリプトンを主成分とする合成培地を用いてバイオフィルムアッセイを行ったところ、Pf101__0623、1058、1789および4666の４つの変異体において有意なバイオフィルム量の減少が認められた。これらの遺伝子の変異を組み合わせるとバイオフィルム量は徐々に減少し、４つの遺伝子を全て欠損させた変異体ではバイオフィルム形成はほとんど認められなかった。以上から、これら４つのDGCが蛍光菌Pf0-1株のバイオフィルム形成を促進していると結論付けられる。一方、細胞表面に局在するLapA量について調べたところ、Pf101__1789および4666変異体では天然型に比べ大きく減少している事が分かった。また、寒天プレートを用いた運動性アッセイを行ったところ、Pf101__0623および4666変異体は天然型より高い運動性を持つ事が分かった。つまり、LapAの局在化と運動性の制御における各DGCの寄与の程度は異なっており、それらの複合効果として蛍光菌Pf0-1株のバイオフィルム形成が制御されていると考えられる。

【参考文献】Newell et al., *J. Bacteriol.* **193**, 4685-4698 (2011).

biofilm, diguanylate cyclase, c-di-GMP

講演番号：4C22a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ C校舎22会場

タイトル　微生物由来タンパク質の二次元電気泳動法による分離

Title　Separation of proteins derived from microorganisms by using 2D polyacrylamide gel electrophoresis

○和田 潤、泊 直宏、高阪 千尋、廣岡 青央、山本 佳宏（京都市産技研）

○Jun Wada, Naohiro Tomari, Chihiro Kohsaka, Kiyoo Hirooka, Yoshihiro Yamamoto (KITC)

【目的】生命の仕組みを理解するためにゲノムプロジェクトの名のもとに、まずは生命の設計図であるゲノム情報が多くの生物種で明らかにされてきた。近年では、ゲノムに引き続き遺伝子発現、タンパク質、代謝物などの網羅的な解析が盛んに行われている。とりわけタンパク質は生命現象の多くの機能を直接的に担っているため、細胞のタンパク質を網羅的に研究するプロテオーム解析は非常に重要となっている。長年、タンパク質の分離手段としては簡便ながら分離能が高い電気泳動法が用いられてきた。プロテオーム解析には等電点の違いと分子量サイズの違いで分離する二次元電気泳動法が用いられる。昨今、分子量の測定や解析の自動化によってタンパク質解析のハイスループット化が進んでいるが、良好な試料を提供するためにはタンパク質サンプルの安定した分離技術が必要になる。これまで我々は生体試料の分画キットの開発を行ってきた。本キットを用いることによって酒造用酵母菌体で良好にサンプル調製が行えるようになり、二次元電気泳動法で再現性の高い結果を得られるようになった。本研究では酵母よりも菌体サイズの小さい細菌を用いても同様に安定した結果が得られるか調べた。

【方法】我々は細菌菌体を凍結融解させながら、独自に開発したタンパク質抽出試薬キットの抽出剤とガラスビーズを用いて菌体を物理的に破砕し、遠心後の破砕液上清に同キットを用いて前処理を施したものを本研究用試料とした。同じく独自に開発した等電点電気泳動試薬セットとガラスチューブを用いて作製した等電点ゲルに試料を投与して一次元目の等電点電気泳動を行った。泳動後に洗浄とバッファー置換を行い、さらに二次元目のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってタンパク質の分離を行った。

【結果】電気泳動後のゲルを染色してタンパク質のスポットを検出したところ、細菌からタンパク質が良好に抽出できていることが分かった。再現性を確認するために菌体を培養した後、均等にサンプルを分け、それぞれに対して上記の一連の操作を行ったゲル数枚の画像を目視で比較したところ非常に類似していた。このことから、細菌由来タンパク質のサンプル調製と二次元電気泳動が安定して行われ、タンパク質が再現性高く泳動および分離されたことが分かった。さらに、画像解析ソフトウェアを用いてタンパク質のスポットを数値化して考察を行ったところ、タンパク質の定量値の再現性も高かった。これらのことからサンプルと対照サンプルを準備して、各群複数枚分の二次元電気泳動を行った結果を比較することによって、大きく挙動の変わった特定のタンパク質について優位性を検証できることが示唆された。

2D polyacrylamide gel electrophoresis, microorganism

講演番号：4C22a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ C校舎22会場

タイトル 抗生物質多剤耐性菌の同定・定量法の改良

Title Improvement of the method to identify and enumerate Multi-Drug resistant bacteria

○渡辺　克二、坂田　紘将、末永　宜信（福工大・生命環境）

○Katsuji Watanabe、Masahiro Sakata、Yoshinobu Suenaga(FIT)

【目的】これまでに最確数・制限酵素断片長多型解析法が、抗生物質多剤耐性菌群等の細菌群集の同定・定量に有効であることを見いだしてきた。多様な属に跨る多剤耐性菌の実態を簡便に把握できる手法の開発を目的とし、ここではﾏｲｸﾛﾁｯﾌﾟ電気泳動装置(MCE-202 MultiNA;島津製作所)で得たデータから、この方法で効率的に抗生物質多剤耐性菌群の同定・定量を行うための条件検討を行った。

【方法】段階的に希釈した試料を抗生物質（ｽﾄﾚﾌﾟﾄﾏｲｼﾝ、ｸﾛﾗﾑﾌｪﾆｺｰﾙ、ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ、ｼﾌﾟﾛﾌﾛｷｻｼﾝ等　各25 ppm）を添加した培養液で培養し、短期間に増殖してくる細菌を抗生物質耐性菌として、これに由来する16S rDNAの制限酵素断片長多型解析法により属名を推定した。推定された菌群を各希釈段階毎に集計し最確数法で計数した。この方法を用い様々な有機性廃棄物や堆肥に含まれる抗生物質多剤耐性菌（ｽﾄﾚﾌﾟﾄﾏｲｼﾝ、ｸﾛﾗﾑﾌｪﾆｺｰﾙ、ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ、ｼﾌﾟﾛﾌﾛｷｻｼﾝ　各25 ppm）の分類・定量を行った。

【結果】ﾏｲｸﾛﾁｯﾌﾟ電気泳動装置(MCE-202 MultiNA;島津製作所)では、サンプルが自動で連続的に分析され制限酵素切断長データも連続して出力されてくるため、データを類縁性解析システムに連続的に取り込み簡便に解析するための方法を考案した。またこの類縁性解析方法では、用いるDNAﾌﾟﾗｲﾏｰに合わせた対照用ﾃﾞｰﾀﾍﾞｰｽが必要となるため、様々な対照用ﾃﾞｰﾀﾍﾞｰｽを入れ換えて管理するﾃﾞｰﾀﾍﾞｰｽ管理方法を考案した。

本法で有機性廃棄物や堆肥に含まれる抗生物質多剤耐性菌を解析したところ、水分含量が高い有機性廃棄物や堆肥には多剤耐性菌が含まれる割合が高いことが判明した。一方で、これまでは最確数法の各培養試験管毎に最も遺伝子密度が高い微生物に由来するDNA切断片ﾃﾞｰﾀを選抜し、これを用い類縁性解析を行ってきた。しかしこの方法では個々のデータの読み違いにより検索精度の低下が大きくなることが判明した。最確数法で各構成微生物群を高精度に定量するためには、各陽性試験管から共通する切断片を抽出し、これらを優先的に解析してゆく方法で切断長データの読み間違いによる検索精度の低下を減らすことが必要と考えられた。

Keyword1, Multi drug resistance Keyword2, Bacterial number Keyword3

講演番号：4C22a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ C校舎22会場

光触媒担持アルギン酸ゲルビーズの殺菌効果と種子殺菌への利用

Antibacterial activity of alginate gel beads supported photocatalyst and application to seed sterilization.

○伊勢田弘太郎、石野靖浩[1]、大中真莉子[1]、田部井陽介[1]、惠良真理子[1]、二宮純子[1]、森田洋[1]
（北九大院・国際環境工、[1]北九大・国際環境工）
○Koutarou Iseda, Yasuhiro Ishino[1] , Mariko Onaka, Yosuke Tabei, Mariko Era, Zyunko Ninomiya, Hiroshi Morita
(Grad. Sch. Fac. Env. Eng. Kitakyushu, [1]Fac. Env. Eng. Kitakyushu. Univ)

【目的】光触媒は大気浄化・水質浄化・殺菌など様々な分野で応用がなされている。これまで本研究室ではアルギン酸ゲルの薄膜化を行い、これに光触媒を固定化することで膜への殺菌機能性の付与を行ってきた。本研究では、アルギン酸ゲルの光触媒包括固定担体としての有用性を広げるために、ビーズ状に成型した光触媒包括固定化アルギン酸ゲルを作製し、その殺菌効果について検討を行った。さらに、種子殺菌への応用を試み、従来の次亜塩素酸ナトリウムを用いた種子殺菌法では困難であった発芽・生長に影響を及ぼさない種子殺菌法の構築について検討した。
【方法】アルギン酸ナトリウム水溶液に可視光応答型光触媒粉末（S-TiO_2+Cu(7 wt%)、東邦チタニウム株式会社製）を加え、超音波処理を行うことで光触媒粉末を分散させた。この光触媒－アルギン酸ナトリウム混合液を塩化カルシウム水溶液中に滴下し、4 ℃で24 h放置することでアルギン酸のゲル化を行った。その後、蒸留水で洗浄し、光触媒－アルギン酸ゲルビーズを得た（粒径平均：3.47 mm)。殺菌機能性試験の検定菌には指標菌である*Escherichia coli* NBRC 3972株を用いた。約10^6 CFU/mLに調製した菌懸濁液中に上記方法で作製した光触媒－アルギン酸ゲルビーズを添加し（添加濃度：0-5000 mm^2/mL)、150 rpmで攪拌しながら、30 ℃で約20,000 lx の光を照射（明条件）し、経時的にサンプリングを行い、コロニーカウント法で生菌数を測定した。光を照射しない条件下（暗条件）でも同様に実験を行った。種子殺菌試験は、約10^2 CFU/mLに調製した大腸菌懸濁液に1 h浸した大腸菌汚染カイワレダイコン種子と本ビーズ、滅菌水をシャーレに添加し、60 rpmで振とうしながら25℃で約20000 lxの光を照射した。その後、暗所で3日間、明所で4日間栽培を行った。こうして栽培を行った種子の栽培2日後の大腸菌数、3日後の発芽率、7日後のカイワレダイコン全長を測定し、種子殺菌利用の有用性を検討した。
【結果】アルギン酸ゲルビーズにS-TiO_2+Cu(7 wt%)を包括固定化することで、殺菌性の付与が可能であった。その効果は光触媒－アルギン酸ゲルビーズの添加濃度に依存しており、添加濃度が5000 mm^2/mLのとき、20,000 lx, 30 minの接触で6オーダーであった。また、暗条件においても、殺菌効果が認められた。これはS-TiO_2に複合化した銅の影響と考えられたが、明条件に比べてその効果は低かったことから、本ゲルビーズは光触媒反応による殺菌効果が発揮されていることが示唆された。さらに本ビーズを種子殺菌に利用したところ、カイワレダイコンの発芽・生長にほとんど影響を与えずに種子の大腸菌を制御することが可能であった。

Keyword1, Keyword2, Keyword3　photocatalyst, alginate gel　beads, antibacterial activity

講演番号:4C23a01
講演日時、会場:3月25日09:00～ C校舎23会場

細胞性粘菌D411-2pタンパク質の部分断片によるFアクチンの束化

Bundling of actin filaments by the fragments of D411-2p protein of *Dictyostelium discoideum*

○稲葉　弘哲、馬渕　一誠[1]、依田　幸司、足立　博之（東大院農生科・応生工、[1]学習院大・理・生命科学）

○ Hironori Inaba, Issei Mabuchi[1], Koji Yoda, Hiroyuki Adachi (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Department of Biotechnology, The University of Tokyo, [1]School of Science, Department of Life Science, Gakushuin University)

【目的】細胞性粘菌*Dictyostelium*のD411-2pは、REMI法で分離した細胞質分裂変異株から同定したタンパク質である。D411-2pには配列中央に長い推定coiled-coil領域(CC)があり、既にCCよりN末端側(F9R7領域)およびC末端領域の2領域でそれぞれFアクチンと相互作用することを報告した。昨年我々は大腸菌から精製したGST融合型のF9R7断片およびF9R7よりN末端側を削ったNΔXba断片をFアクチンと混合すると低速遠心で共沈し、高次構造が形成されることを示した。今回は、GSTタグによるアーティファクトを排除し、D411-2p断片によるFアクチン高次構造形成能およびその高次構造の様式を調べることを目的とした。さらに、D411-2pが単量体でもFアクチンを架橋するかについても検討した。

【方法･結果】大腸菌で生産したGST融合型のF9R7およびNΔXba断片をアフィニティー精製し、GSTタグをTurbo3C protaseによって切除した。このGSTタグを取り除いた両断片をFアクチンと混合し、Fアクチンのみでは沈殿しない1万*g*による遠心を行ったところ、それぞれの断片とFアクチンは共沈した。さらに、この混合液をネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡でFアクチンの高次構造の様式を観察したところ、密で均一に束化されたFアクチンが観察された。また、F9R7断片はそのC末端側に僅かに推定coiled-coil領域を含んでいたため、その部分を切除したF9R13断片を調製し、Fアクチンと混合して低速遠心を行ったところ、共沈した。以上より、D411-2pは単量体でもFアクチンを束化することが示唆された。

F-actin, *Dictyostelium*, cytokinesis

講演番号：4C23a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ C校舎23会場

シアノバクテリア*Synechococcus elongatus* PCC7942における光依存的DNA複製制御機構の解析

Light-dependent regulation of DNA replication in cyanobacteria *Shynechococcus elongatus* PCC7942.

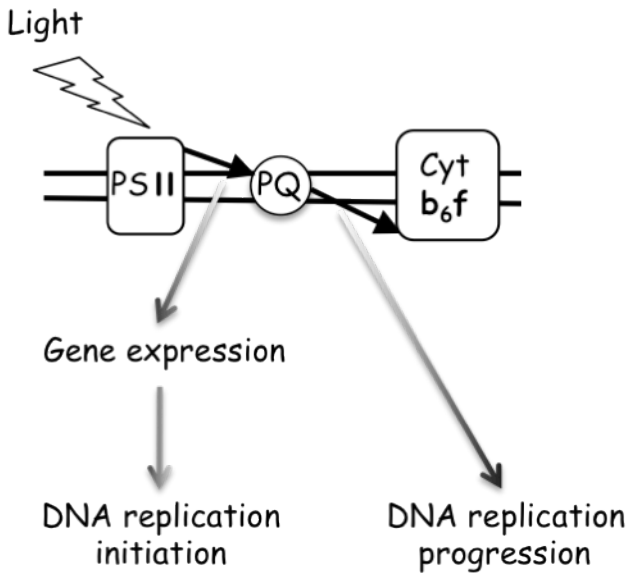
○大林　龍胆[1]、渡辺　智[1]、兼崎　友[2]、千葉櫻　拓[1]、吉川　博文[1,2]（[1]東京農大・応生科・バイオ、[2]東京農大・ゲノム解析セ）

○Ryudo Ohbayashi[1], Satoru Watanabe[1] Yu Kanesaki[2], Taku Chibazakura[1], Hirofumi Yoshikawa[1,2] ([1]Dept. of biosci, Tokyo Univ., of Agric.,, [2]NGRC, Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】*Synechococcus elongatus* PCC7942(以下*S.* 7942)を始めとする淡水性のシアノバクテリアは、一細胞当たり複数コピーのゲノムを持つ事が知られている。また葉緑体同様酸素発生型の光合成を行い、光依存的に生育することも知られている。しかしその詳細なメカニズムは不明な点が多く、光と増殖の直接的な関係はいまだ示されていない。そこで増殖の第一段階であるDNA複製に着目し、光とDNA複製との関係の解明を本研究の目的とした。

【方法】*S.*7942を明暗周期により同調培養し、新規合成されたDNAをチミジンのアナログであるBrdUで標識した。次に抗BrdU抗体を用いて標識されたDNAのみを免疫ブロット解析により検出した。さらに翻訳、転写、光化学系などの各種阻害剤を用いてDNA複製への影響を検証した。

【結果】同調系を用いた複製活性の検証により、*S.* 7942のDNA複製は光依存的であることが示された。さらに複製開始だけでなく進行までもが光依存的であることが示唆された。また各種阻害剤の複製開始と進行それぞれへの影響を検証した。その結果、複製開始は転写、翻訳阻害剤の添加により阻害された。大腸菌、枯草菌などの原核生物では転写、翻訳阻害剤により複製開始のみ阻害されることが知られており、*S.* 7942でも同様の効果があると考えられる。また光化学系電子伝達阻害剤DCMU（PSⅡからPQへの電子伝達を阻害)、DBMIB（PQから$Cytb_6f$への電子伝達を阻害)の添加においても複製開始阻害がみられたが、これは遺伝子発現を介した間接的な影響であることが示唆された。一方、複製進行においては転写、翻訳、DCMU添加では阻害は見られなかったが、DBMIB添加でのみ強い阻害を示した。これらの結果より複製開始にはPSⅡ以降のリニアーな電子伝達が必要であるが、複製進行にはPQ以降の電子伝達のみが重要であることが示唆された。



（図）光化学系による複製制御モデル

DNA 複製, シアノバクテリア

講演番号：4C23a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ C校舎23会場

ラッカセイ種皮ポリフェノールの抗菌作用の検証と関与する遺伝子発現のDNAマイクロアレイ解析

Verification of the antibacterial action of peanut skin polyphenol and DNA microarray analysis of involved gene expression

○小澤 恵実、田村 倫子、田中 尚人[1]、矢口 行雄[2]、村 清司、荒井 綜一[3]（東農大応生科・栄養、[1]東農大応生科・菌株、[2]東農大地環科・電顕、[3]東農大総研）

○Megumi Ozawa, Tomoko Tamura, Naoto Tanaka[1], Yukio Yaguchi[2], Kiyoshi Mura, and Soichi Arai[3]
(Nutri. Sci., Tounodai, [1]NRIC, Tounodai, [2]Electron Microsc. Cent., Tounodai, [3]NRI, Tounodai)

【目的】非食部として大量廃棄されるラッカセイ種皮は、ポリフェノールを多量に含有する。タンパク質との結合性をもつポリフェノールは抗菌作用を示し、これまでに緑茶ポリフェノールなどの抗菌作用が報告されている。そこで、今回はラッカセイ種皮ポリフェノールの各種細菌に対する抗菌作用を調べ、強い抗菌作用を示した*Bacillus cereus*に対するポリフェノールの抗菌メカニズムについてDNAマイクロアレイを用いて検討した。

【方法】ラッカセイ種皮のポリフェノール成分は熱水で抽出し、ポリフェノールの定量はFolin-Ciocalteu法で行った。ラッカセイ種皮抽出液(PSE)からのポリフェノールの分離は、限外濾過、ゲル濾過、MPLCおよびHPLCで行った。抗菌活性試験は円筒寒天平板法で行い、グラム陽性細菌７株およびグラム陰性細菌６株を供試した。DNAマイクロアレイ解析は、*Bacillus cereus* ATCC 14579にPSEから単離したポリフェノールを作用させて行った。*B. cereus* ATCC 14579をLB培地に接種し、OD_{600}が0.5の時点でポリフェノール溶液または水を添加し、10分後と30分後の培養液を採取した。QIAGEN RNeasy Mini Kitで菌体からRNAを抽出し、AgilentのFairPlay Ⅲ Microarray Labeling Kitを用いてCy3によって蛍光標識されたcDNAを作製した。DNAチップは、NCBIの*Bacillus cereus* ATCC14579, complete genomeデータを用いてAgilentのカスタムアレイで作製した。遺伝子発現の解析にはGeneSpring GXを使用した。

【結果】PSE はグラム陽性細菌５株に対して抗菌作用を示したが、グラム陰性細菌に対しては抗菌作用は見られなかった。特にグラム陽性細菌の *B. cereus* に対して強い抗菌作用を示した。さらに、PSE より単離した主要ポリフェノールの二量体および三量体プロシアニジンについて、*B. cereus* に対する抗菌活性試験を行ったところ、両者に抗菌作用が認められたが、IC_{50} は二量体プロシアニジンが 0.2 mg/ml、三量体プロシアニジンが 0.02 mg/ml であり、三量体プロシアニジンの方が強い抗菌作用を示した。*B. cereus* での抗菌作用発現時の DNA マイクロアレイ解析では、三量体プロシアニジン添加後 10 分でトリプトファン、ヒスチジンなどのアミノ酸代謝に関与する遺伝子の発現が大きく上昇し、添加後 30 分ではさらにグリコーゲン代謝、脂肪酸代謝に関与する遺伝子の発現が上昇した。一方、添加後 10 分では糖代謝に関与する遺伝子の発現が減少し、30 分ではさらに ATP 合成、プリン、ピリミジン代謝に関与する遺伝子の発現が減少し、菌の生命過程への致死的影響の実態が示唆された。

peanut skin polyphenol, antibacterial, DNA microarray analysis

講演番号：4C23a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎23会場

タイトル：チュニジア環境試料からの好塩性細菌分離と454GSJrによるドラフトゲノム解析

Title: Isolation of halophilic bacteria from Tunisian environmental samples and draft genomic analysis using next generation DNA sequencer.

○松井徹[1]、青山洋昭[1]、斎藤星耕[1]、新里尚也[1]、松崎吾朗[1]、磯田博子[2]、Hassen Abd-Ennasser[3]、Nilushi Nugara[1]（琉大熱生研[1]、筑波大ARENA[2]，チュニジアCBBC[3]）、

○Toru Matsui[1], Hiroaki Aoyama[1], Seikoh Saitoh[1], Naoya Shinzato[1], Goro Matsuzaki[1], Hiroko Isoda[2], Hassen Abd-Ennasser[3]、Nilushi Nugara[1] (TBRC-Univ.Ryukyus[1], ARENA-Tsukuba Univ[2], CBBC-Tunisia [3])

【目的】

チュニジアは、日本とほぼ同じ緯度に位置し、サハラ砂漠、ソルトレークなど多様な環境を有しているため、多様な機能微生物の分離が期待できる。演者は昨年度チュニジア各地より収集した環境試料より好塩性細菌分離を試みたが、栄養度の低い砂漠等からは分離することができず、培養条件検討の必要性が示唆された。一方、コンパクト型の次世代シーケンサが発売されるなどにより、微生物ゲノムのde novo解析が容易になってきている。本研究では、チュニジア環境試料からの中度好塩性細菌の分離を行うと共に、分離菌の一つ21a株についてパイロシーケンス型次世代シーケンサ454GSJrを用いたドラフトゲノム解析を実施した。

【方法および結果】

試料には、チュニジア国内の緑地帯、砂漠、塩湖など７カ所から採取したものを用いた。NaCl 10または15%を含む0.1×LB培地により分離した結果、生育が認められた試料は緑地帯(Chebika)由来のものだけであったが、硫酸マグネシウム濃度を高くした場合に砂漠(Sahara)、塩湖（Chott El Jerid）から分離菌が得られた。16SrRNA塩基配列による分類の結果、*Halobacillus, Kushneria, Marinococcus*, *Virgibacillus* 等の Firmicutes および *Chromohalobacter, Halomonas* 等のγ-proteobacteriaに属していた。

分離菌から選択した21a株は16SrRNA配列から*Halomonas* sp.に属していた。本菌は、最適生育NaCl濃度が0.5M、生育上限3Mであり中等度好塩性細菌に分類されていた。ロシュ社454GS Jr型次世代DNAシーケンサを用いて21a株のゲノム解析を行ったところ、推定ゲノム長は約3.6Mbであり、one runで34Mb，平均鎖長390base程度のデータが得られた。現在、ドラフトゲノムデータの解析を進めている。

Halophilic bacteria, Next Generation Sequencer, *Halomonas* sp.

講演番号：4C23a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎23会場

緑膿菌の細胞外多糖がもたらす静置環境特異的な適応優位性

Fitness advantages conferred by exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* in static environment

○山本京祐、新井博之、石井正治、五十嵐泰夫（東大院農生科・応生工）
○Kyosuke Yamamoto, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi (Univ. of Tokyo)

【目的】多くの好気性微生物は静置環境において pellicle（菌膜）を形成する。Pellicle は気液界面に形成される biofilm 様の多細胞構造体であり、pellicle 形成によって細胞は酸素獲得に有利な気液界面に局在することが可能となる。このことから、pellicle 形成は好気性微生物の静置環境における適応的挙動であると考えられているが、その生理学的特徴や生態学的意義は未だ不明な点が多い。我々は緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* を用いて pellicle の生理・生態学的解析をおこなっており、これまでに pellicle 形成には細胞外多糖（exopolysaccharides, EPS）が重要な役割を果たすことを示し、EPS 非産生株は静置環境での生育が遅くなることを明らかにしている。しかし、EPS はそれを産生する個体自身だけでなく個体群全体に利益をもたらす“public goods”として機能することから、EPS 産生株と共存する場合には EPS 産生コストなしに気液界面に局在することで EPS 非産生株が利益を得る可能性が考えられた（social cheater）。そこで本研究では、EPS 産生株 - 非産生株間の相互作用に注目し、EPS 産生能の適応効果を解析した。

【方法・結果】野生株（PAO1 株）と EPS 合成系二重変異株（Δ*pelA*Δ*pslAB*）とを共培養することで競合実験をおこない（LB 培地、37 °C）、系全体の生菌数（CFU）変化に基づいてそれぞれの適応度を評価した。両株を等量接種し培養したところ、振盪条件（10 h）においては両者の相対適応度に差はみられなかったが、静置条件（24 h）では変異株の適応度が有意に低下した。したがって、EPS 産生能は静置環境特異的に適応優位性をもたらすことが示され、pellicle 形成において EPS 非産生株に social cheater としての挙動はみられなかった。一方、pellicle 形成は好気生育の促進によって適応優位性をもたらすと考えられるため、培養液内部の嫌気ニッチの存在は pellicle 形成の適応効果に影響を与えることが考えられた。そこで、培地に硝酸を添加し嫌気ニッチサイズを増大させて同様の競合実験をおこなったが、EPS 非産生株の相対適応度は改善されなかった。このことは、pellicle 形成がもたらす強い適応優位性を示唆している。また、*eyfp* 標識した EPS 非産生株を用いて共培養をおこない、共焦点レーザー顕微鏡によって pellicle 構造を観察したところ、pellicle 内に一定数の EPS 非産生株細胞が認められ、pellicle 全体に一様に分布していた。共培養 pellicle 内の EPS 非産生株存在量を定量 PCR により解析した結果、pellicle 個体群全体の 10%以下であり、系全体における優占度と同様であった。このように、EPS 産生に寄与しない細胞は pellicle 形成個体群内で優占化することができず、静置環境における EPS 産生能は pellicle 形成を通じて強い適応優位性をもたらすことが示された。

pellicle, biofilm, exopolysaccharides

講演番号：4C23a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎23会場

緑膿菌における*cbb*$_3$-type cytochrome *c* oxidaseのサブユニットシャッフリング

Subunit shuffling of the *cbb*$_3$-type cytochrome *c* oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*

○長村 達也、川上 卓郎、石井 正治、五十嵐 泰夫、新井 博之（東大院・農生科・応生工）
○Tatsuya Osamura, Takuro Kawakami, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi, Hiroyuki Arai (Univ. of Tokyo)

緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は好気呼吸や嫌気呼吸、発酵といった多様なエネルギー獲得様式を持つことで、土壌や海洋、動植物体内など地球上の至るところに生息できると考えられている。緑膿菌における好気呼吸の呼吸鎖には、2種のユビキノール酸化酵素および3種のチトクローム*c*酸化酵素、合わせて5種の末端酸化酵素が存在する。本研究室では、末端酸化酵素5種類の五重破壊株（Δ5）が好気的に生育できないことを確認した。

緑膿菌の持つ*cbb*$_3$タイプのチトクローム*c*酸化酵素（Cbb3）は2種類（Cbb3-1, Cbb3-2）存在し、これらはそれぞれ*ccoN1O1Q1P1*, *ccoN2O2Q2P2*にコードされている。Cbb3はCcoNOPの3サブユニット構造を取り、CcoQは活性型酵素のアセンブリに必要とされる。互いに高い相同性を示す*ccoN1O1Q1P1*, *ccoN2O2Q2P2*だが、緑膿菌のゲノム中には*ccoNQ*に高い相同性を持つ遺伝子が更に2種類ずつ存在することを見出した。この遺伝子を*ccoN3Q3*, *ccoN4Q4*と呼ぶ。Δ5にはCbb3を構成するCcoOPが存在しないため好気生育ができないと予想されたため、Δ5に*ccoO1Q1P1*または*ccoO2Q2P2*を相補したところ、好気生育が可能となった。これにより、CcoN3およびCcoN4はCbb3のサブユニットとして機能し、好気生育を担い得ることが示された。

緑膿菌において、Cbb3は各サブユニット間でシャッフルされたキメラ酵素として機能している可能性が示唆された。個々のキメラ酵素の性質を調べるため、Δ5に更に*ccoN3Q3, ccoN4Q4*を破壊した七重破壊株（Δ7）に、2種類の*ccoOQP*に対して4種類の*ccoN*を組み合わせた遺伝子群を発現するプラスミドで形質転換したCbb3相補株を8株作製した。Cbb3相補株を用いてそれぞれのキメラ酵素のプロトン排出効率を調べたところ、サブユニットの組み合わせに関わりなく、全てのキメラ酵素にプロトン排出能があることが明らかとなった。また、これらの株を用いて酵素の酸素親和性を測定したところ、CcoNの種類によって酸素親和性が異なることが分かった。

次に、*ccoN3, ccoN4*が野生株でも発現し機能しているかを調べるため、トランスクリプトーム解析の結果から*ccoN3, ccoN4*の発現条件を調べた。*ccoN3*は一酸化窒素（NO）存在下、*ccoN4*はシアン存在下において発現量が上昇することが分かった。変異株を用いた実験により、*ccoN4*への変異によりシアン耐性能が下がることが確かめられ、シアン存在下でCbb3の構成要素として機能していることが示唆された。*ccoN3*に関しては変異による表現型の変化はまだ確認されていない。

*ccoN1*は恒常的に、*ccoN2*は低酸素条件下で発現しており、*ccoN*はそれぞれ異なる条件下で発現、機能することで環境に適した能力を持つCbb3を構成していることが示唆された。このようにサブユニットの一部をシャッフルすることで特性の異なるキメラ酵素を作り、緑膿菌は速やかに環境適応を行うことができると考えられる。

Pseudomonas aeruginosa, Respiration, Terminal oxidase

講演番号：4C23a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ C校舎23会場

ラン藻と大腸菌の鉄還元酵素（第4報）

Ferric reductases in *Synechocystis* and *E. coli*.

○佐藤純一、森鉄也、田中英資、諸星拓己、湯川諒、武田晃治、渡部俊弘[1]、安保充[2]、吉村悦郎[2]、中川純一[1]、阿部晃[3]、川崎信治、新村洋一（東農大応生科・バイオ、[1]東農大生物産業・食香、[2]東大院農生科・応生化、[3]札幌医大医・眼科）

○Junichi Sato, Tetsuya Mori, Eisuke Tanaka, Takumi Morohoshi, Akira Yukawa, Kouji Takeda, Toshihiro Watanabe[1], Mitsuru Abo[2], Etsuro Yoshimura[2], Junichi Nakagawa[1], Akira Abe[3], Shinji Kawasaki, Youichi Niimura（Dept. of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, [1]Dept. of Food science and Technology, Tokyo University of Agriculture, [2]Dept. of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo, [3]Dept. of Ophthalmology, Sapporo Medical University）

【目的】　生物は鉄を鉄硫黄タンパク質、ヘムタンパク質などの補因子として利用しており、通常は三価鉄の状態で存在する。この三価鉄が生体内で補因子としてタンパク質に取り込まれ、機能するためには、鉄は二価鉄に還元される必要がある。このように、鉄還元反応は生物にとって必須の反応であるが、鉄還元反応によって生じた二価鉄は過酸化水素を還元し、強毒性のヒドロキシルラジカルの生成にも関与する（フェントン反応）。2002年にWoodmanseeらは、大腸菌のflavin reductaseが遊離flavin存在下で三価の鉄化合物を二価鉄に還元し、この二価鉄が過酸化水素を還元し、フェントン反応を引き起こすことを提唱した。鉄還元酵素反応は生体にとって二面性を有する反応であり、この反応を触媒する鉄還元酵素には遊離flavin関与のものと、遊離flavin非関与のものが知られている。我々は遊離flavin存在下、非存在下で鉄化合物を還元し、フェント反応を引き起こす酵素として、ラン藻からDrgAタンパク質[1)]とferredoxin-NADP$^+$ oxidoreductase (FNR)[2)]、遊離flavin非存在下で鉄化合物を還元する酵素として、大腸菌からoxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase (NfnB)[3)]、ferredoxin-NADP$^+$ reductase (Fpr)[3)]を精製した。精製酵素は、生体内鉄貯蔵タンパク質であるferritin（馬由来）を含む各種鉄キレート化合物と広い反応性を示した。そこで、精製された鉄還元酵素とラン藻及び大腸菌由来の鉄貯蔵タンパク質との反応性の検討を試みている。

【方法・結果】　鉄貯蔵タンパク質は、ラン藻にはbacterioferritinA (BfrA)、bacterioferritinB (BfrB)、MrgA、大腸菌にはferritinA (FtnA)、ferritinB (FtnB)、bacterioferritin (Bfr)、DNA binding protein from starved cell (Dps protein)が存在する。これらタンパク質をコードする遺伝子を大腸菌発現ベクター（TOPOベクター）に組み込み、大量発現系を構築した。全ての形質転換株においてIPTGによる目的タンパク質の発現誘導が観察された。そこで、各大腸菌を大量培養し、発現した各鉄貯蔵タンパク質の精製を行った。現在、精製タンパク質を用い、遊離flavin存在下、非存在下における鉄還元酵素との反応性の検討を試みている。また、各種鉄キレート化合物を基質としたとき、各精製酵素の鉄還元活性とフェントン反応活性との関連性についても発表する予定である。

1) Takeda, K. *et al.* (2007) FEBS J. 274, 1318-1327.　2) Sato, J. *et al.* (2011) Biometals 24, 311-321. 3) Takeda, K. *et al.* (2010) Biometals 23, 727-737.

Iron, Ferric reductase, Iron storage protein

講演番号：4C23a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ C校舎23会場

大腸菌におけるチオ硫酸の選択的利用によるシステイン合成機構（チオ硫酸リプレッション）

Mechanism of cysteine synthesis based on the thiosulfate-selective utilization (thiosulfate repression) in *Escherichia coli*.

○仲谷 豪、大津 厳生、山中 幸[1]、山本 兼由[1]、高木 博史（奈良先端大・バイオ、[1]法政大院・工）
○Takeshi Nakatani, Iwao Ohtsu, Yuki Yamanaka[1], Kaneyoshi Yamamoto[1], Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, [1]Grad. Sch. Eng., Housei Univ.)

【目的】多くの微生物には、同種の栄養源が培地中に複数存在する場合、カタボライトリプレッションや窒素メタボライトリプレッションなど、より好ましい栄養源を優先的に利用する機構が備わっている。炭素、窒素、硫黄は、生育に必要な三大元素であるが、硫黄源に関する選択的な利用機構はほとんど知られていない。

大腸菌は、硫酸イオンとチオ硫酸イオンの2種類の無機硫黄源からシステインを合成できる。*cysK*遺伝子がコードする*O*-アセチルセリンスルフヒドラーゼAにより*O*-アセチルセリン（OAS）と硫酸から合成する硫酸経路と、*cysM* 遺伝子がコードする*O*-アセチルセリンスルヒドラーゼBによりOASとチオ硫酸から*S*-スルホシステインを経由して合成するチオ硫酸経路が存在する。硫酸経路から1 分子のシステインを合成する場合、2 分子のATP を必要とするのに対して、チオ硫酸経路では、ATP 消費を伴わず2 分子のシステインを合成できる。本研究では、システイン合成系の解明を目的に、エネルギー効率の良いチオ硫酸経路に着目し、その分子機構を解析した。

【方法と結果】チオ硫酸経路を遮断した*cysM* 遺伝子欠損株は、硫酸を唯一の硫黄源とした培地では良好に生育できるが、チオ硫酸を同時に添加するとほとんど生育できないことを見出した。このことは、硫酸とチオ硫酸が培地中に共存する場合、大腸菌は硫酸経路を抑制し、チオ硫酸経路を優先的に利用してシステインを合成する可能性を示している。そこで我々は、この現象を新規に「チオ硫酸リプレッション」と名付けた。

まず、最初にチオ硫酸リプレッションが観察されるチオ硫酸の濃度を検討したところ、1 mMの硫酸に対し、1/1,000の濃度のチオ硫酸（1 μM）を添加すると、*cysM*欠損株は生育できなかった。また、10 nM以上のチオ硫酸を添加すると生育が有意に抑制されたため、チオ硫酸リプレッションは極めて厳密に制御されていることが示唆された。

次にアイソトープラベルされた[^{35}S]-硫酸を用いて、チオ硫酸の添加が硫酸の取り込みレベルに及ぼす影響について解析した。その結果、チオ硫酸により硫酸の細胞内への取り込みが強く抑制されることが判明した。以上のことから、チオ硫酸による硫酸の利用抑制は、チオ硫酸に応答した硫酸の細胞内取り込み量の低下に起因することが明らかとなった。

現在、チオ硫酸による硫酸取り込み抑制の分子機構を解明する目的で、マイクロアレイ解析、及び*cysM* 遺伝子欠損株とKeio collectionを用いて作製した二重欠損株ライブラリーにより、チオ硫酸リプレッションに関わる遺伝子の同定を進めている。

cysteine, thiosulfate, Catabolite repression

講演番号：4C23a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ C校舎23会場

ペニシリン結合タンパク質PBP1B欠損株において溶菌を引き起こす新規抗生物質の探索とその作用機構の解析

Screening for antibiotics, which induce lysis in *E. coli* PBP1B mutant

○相良　素行、和地　正明（東工大、院生命理工、生物プロセス）
○Motoyuki Sagara, Masaaki Wachi (Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology)

【目的】細菌のアクチン様細胞骨格タンパク質MreBは、細胞膜の内側に長軸に沿ってらせん状に局在し細胞の桿菌形態の維持に機能している。A22［*S*-(3,4-dichlorobenzyl) isothiourea］はMreBに特異的な阻害剤で、MreBらせん構造を破壊することにより大腸菌を球菌化させる。A22処理によって増殖は次第に低下するが、細胞は溶菌しない。我々は大腸菌の主要な細胞壁合成酵素の一つであるペニシリン結合タンパク質PBP1Bを欠損した*mrcB*変異株にA22を処理すると細胞が溶菌することを見出した。しかし、PBP1Bのホモログである PBP1Aを欠損させた*mrcA*変異株をA22処理しても溶菌しなかった。これらのことよりMreBとPBP1Bの同時欠損は溶菌を引き起こすことが明らかとなった。そこで本研究では、PBP1B欠損株特異的に溶菌を引き起こす抗菌剤のスクリーニングを行い、細胞表層形成機構について調べた。
【方法】PBP1B欠損株の対数増殖初期に薬剤を加え、濁度の変化と細胞の形態を観察し、溶菌を引き起こす薬剤を探索した。ヒットした薬剤について、形態観察、FtsZ免疫抗体染色を行なった。また、作用が似ている既知の薬剤との比較を行なった。
【結果】スクリーニングの結果から、PBP1B欠損株において溶菌を引き起こす薬剤としてA168が見つかった。A168は野生株では細胞伸長を誘導するが、PBP1B欠損株では細胞伸長後、静止期後期で濁度の低下を引き起こした。顕微鏡観察によると伸長した細胞の中身が抜けたゴーストが観察された。そこで、同様に細胞伸長を引き起こすCephalexinやSparfloxacinのPBP1B欠損株に対する効果を調べた。Cephalexinは隔壁合成酵素PBP3を特異的に阻害し細胞伸長を引き起こす。SparfloxacinはDNAジャイレースを阻害し、SOS反応を誘導してZリングの形成を阻害して細胞伸長を引き起こす。CephalexinはPBP1B欠損株に速やかに溶菌を引き起こしたが、Sparfloxacinは細胞伸長を引き起こしたのち、静止期後期に濁度の減少を引き起こした。これらの作用を遺伝子レベルで証明するために、*ftsI*と*ftsZ*の温度感受性変異株にそれぞれ*mrcB*変異を形質導入して二重変異株を構築した。培養温度のシフトアップにより、*ftsI mrcB*二重変異株は速やかに溶菌し、*ftsZ mrcB*変異株も静止期後期に溶菌が確認できた。これらの結果より、細胞分裂の阻害がPBP1B欠損株において溶菌を引き起こすことが示された。A168の効果は、Sparfloxacinの効果に類似していたため、Zリングの形成に対する効果を調べたところ、A168処理によりZリングの形成が阻害された。これより、A168は直接または間接的にFtsZリングの形成を阻害して細胞伸長を引き起こすことが明らかになった。

PBP1B, antibiotics, lysis

講演番号：4C23a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ C校舎23会場

輸液カテーテルは内腔に結晶を生じ、抗菌カテーテルであっても細菌増殖を助長する因子となる

Crystal deposits on the surface of catheters derived from administration of solution facilitated bacterial propagation even in the antimicrobial catheters.

○西川可穂子、阪本敏久（防衛医科大　救急）
○Kahoko Nishikawa, Toshihisa Sakamoto (NDMC, CCM)

【目的】中心静脈ラインは重症患者に使用する臨床上重要な血管ルートで、血管内に留置されたカテーテルは患者の転帰に影響を及ぼす。したがって、その管理は重要であるが、臨床現場では、常にカテーテル感染リスクを伴う。我々は、臨床で使用したカテーテルの内腔には多くの結晶が付着しており、その周辺に細菌を観察した。その結晶が薬剤耐性細菌のコロニーやバイオフィルム形成を促進していることも実験的に確認している。一方、日本ではまだ臨床利用されていない抗菌性カテーテルが、海外の臨床現場ではカテーテル感染リスクを大幅に軽減しているという報告がある。本研究では、中心静脈抗菌性カテーテルを用いて、輸液により生じる結晶が、その抗菌性を減じる働きがあるのかを検討した。
【方法】２つの抗菌性カテーテル；抗菌性カテーテル１（クロルヘキシジン・スルファジアジン銀使用)、抗菌性カテーテル２（銀使用）と、一般的なポリウレタンカテーテル（コントロール）を使用した。すべてのカテーテルに３Lの高カロリー輸液を流し（flow rate; 63mL/h)、カテーテル内腔の状態を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。また、輸液済みカテーテルを1cm毎に切断し、抗菌活性測定(a modified Kirby-Bauer method)、細菌付着試験(Adhereing test)を行った。これらの試験には、臨床分離株であるMRSAと*Acinetobacter baumannii*を用いた。細菌付着試験は細菌懸濁液に切断したカテーテルを浸漬、37℃で培養し、1, 3, 5, 7日目にサンプル採取を行った。各サンプル採取日ごとにカテーテルに付着した細菌を測定した。また、この時のカテーテル内腔の状態をSEMにより観察した。
【結果】完全栄養液を輸液した後、カテーテル内腔に結晶が出現した。その形や大きさはさまざまであったが、細菌付着試験を行った後のカテーテル内腔には、これらの結晶の周辺に細菌が多くのコロニーを形成していることが観察された。細菌付着試験では、内腔に結晶がない場合は、長期間カテーテル内に細菌が付着しないが、結晶が存在すると5日目から急激に細菌増殖した。一方、カテーテル内腔に結晶がある状態においても、抗菌活性試験による効果は、5日経過しても保たれていた。抗菌活性が保持されていても、カテーテル内に細菌がコロニーを形成することが可能であることが確認された。
【結論】輸液により生じるカテーテル内腔の結晶は、カテーテルの抗菌性の有無とは無関係である。その結晶はカテーテル内部で細菌増殖を助長する働きもあるため、カテーテル感染のリスク要因となると考えられる。しかしながら、抗菌カテーテルは、細菌増殖するまでに一定の期間細菌増殖を抑制する働きも示唆された。

Antimicrobial catheter, MRSA, *Acinetobacter baumanii*

講演番号：4C23a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ C校舎23会場

Paenibacillus 属細菌の殺菌剤耐性とバイオフィルム形成

Chemical resistance and biofilm formation of *Paenibacillus* strains

○平井 知子、坂元 仁[1]、土戸 哲明[1]（関西大院・理工、[1]関西大・化学生命工）

○Tomoko Hirai, Jin Sakamoto[1], Tetsuaki Tsuchido[1] (Kansai Univ. Grad. Sch., [1]Kansai Univ.)

【目的】近年、食品工場から殺菌剤に対して抵抗性をもつ胞子形成細菌が分離されており、それらが形成する胞子が混入、生残して製品の汚染を引き起こす可能性が指摘されている。そこで、本研究では、その分離された胞子形成細菌について、発育特性や胞子の薬剤抵抗性について調査し、その殺菌剤耐性の特性を明らかにするとともに、その耐性機構を調べ、有効な対策を確立することを目的として検討した。

【方法】LB培地で一晩培養した培養液を、Schaeffer培地の中の成分である無機塩類を添加したLA培地に植菌し、37 ℃で3日間培養し、胞子を形成させた。胞子を滅菌水で回収後、栄養細胞殺滅処理として80 ℃で10分間加熱した。滅菌水で洗浄後、1 % Tween 80を含むMcIlvaine緩衝液（pH 3.0）に懸濁し、-80 ℃で保存した。胞子の薬剤処理は、0.1 % Tween 80を含むMcIlvaine緩衝液（pH 3.0）中、37 ℃、120 rpmで行い、サンプリングして1 %チオ硫酸ナトリウム溶液中へ注入し、薬剤を不活化した。生存胞子数の測定は、コロニーカウント（LA培地にプレーティングして37 ℃で2日間培養）またはバイオスキャナーを用いた生育遅延解析法によって行った。

【結果】分離された胞子形成細菌は、16SrDNAの相同性から、*Paenibacillus* sp.であると同定された。NBRC標準株と比較すると、分離株は、胞子形成率が極めて低く、栄養細胞・胞子共に凝集しやすい傾向があった。また、分離株の栄養細胞はバイオフィルム形成量が多かった。バイオスキャナーを用いた生育遅延解析法による測定の結果、分離株の胞子は、過酢酸製剤（オキシペール60）に対して、標準株よりも低感受性であった。これらのことから、我々は、分離株が、栄養細胞と胞子の混合凝集状態やバイオフィルム形成によって過酢酸製剤に対して低感受性化しているものと推測した。この分離株の特性から考えると、過酢酸だけでなくその他の薬剤に対しても耐性化している可能性がある。

Paenibacillus, spore, biofilm

講演番号:4C23a12
講演日時、会場:3月25日11:21～ C校舎23会場

大豆油-水混合系におけるGFP変異体発現枯草菌胞子の熱死滅・損傷過程の解析

Analysis of thermal death and injury processes in soybean oil-water mixture of *Bacillus subtilis* spores expressing a GFP variant

○濱名勝大、髙田恵輔[1]、坂元仁[1]、土戸哲明[1]（関西大院・理工、[1]関西大・化生工）
Katsuhiro Hamana[1], Keisuke Takada[2], Jin Sakamoto[2], and Tetsuaki Tsuchido[2]([1]Kansai Univ. Grad. Sch., [2]Kansai Univ.)

【目的】食品などの殺菌では加熱処理が汎用されるが、油を含む場合、混入した細菌胞子の耐熱性が上昇して処理後も生残する可能性があり、殺菌の成否が問題となる。胞子の熱耐性には胞子コア内の脱水が関係しているとされるが、その機構の詳細については明らかでない。また油を含む食品では熱耐性が上昇して殺菌不十分となる可能性がある。本研究では、予め胞子コア内に緑色蛍光タンパク質の変異体であるYFP3.2（耐熱型pHセンサー）を発現させた枯草菌胞子を用い、大豆油と水の混合系における損傷関連反応として生存数(CFU)低下、胞子内部に発現させた緑色蛍光タンパク質の蛍光強度変化、胞子内からのジピコリン酸(DPA)漏洩、濁度低下の各反応の経時変化を調査し、その時系列的因果関係について解析するとともに、胞子の熱死滅における水の関与を明らかにすることを目的として検討を行った。
【方法】*B. subtilis* 168 *trp* C2 (P*sspB*-YFP3.2-His-Tc)を用い、胞子コア内にYFP3.2を発現させた。胞子形成にはScheaffer寒天培地を使用し、3～4日間、37℃で培養した。YFP3.2発現胞子は、100mMクエン酸、またはクエン酸-リン酸緩衝液(pH3.0～8.0)、あるいはこれに各濃度(5,10,15,20%)の大豆油を含む混合液中で95,99℃で加熱処理した。生存数の測定では、L寒天培地を用い、生成コロニーを計数した。YFP3.2の変化は、励起光480nm、蛍光波長530nmで測定した。ジピコリン酸（DPA）の測定は$TbCl_3$による高感度蛍光測定法を用いて測定した。濁度変化はOD_{600}の変化を測定した。
【結果】油を含まない各緩衝液の場合の時系列変化は上記測定の損傷反応は全てpHに依存していた[1)]。大豆油存在下では、pH別に経時変化を見たとき、各反応の特性は全て含油量に依存していた。生存数とYFP3.2の蛍光変化の時系列変化は対応しており、生存数は含油量が増えるにつれてShoulder時間が長く、耐熱性が上昇し、このことは胞子コアへ浸入する水の量が低下するためと考察された。YFP3.2の蛍光変化は生存数の低下に対応して2相性が確認され、これはそれぞれ加熱外液の浸入によるコアの湿潤化とその後の蛍光タンパク自身の熱変性を示唆するものと推察した。蛍光強度の最高値はpHに依存していたが、この値は含油量が増えるにつれて低下し、最高値までの時間も長くなったことから、油が胞子を保護したことを示唆するものと考えられた。
1)濱名ら,日本食品工学会第12回年次大会要旨集,P.51（2011）

Spore, Oil ,Damage

講演番号:4C23a13
講演日時、会場:3月25日11:32～ C校舎23会場

脂肪酸とそのグリセリンエステルによる酵母の死滅と液胞破壊

Cell death and vacuole destruction in *Saccharomyces cerevisiae* treated with fatty acid and diglycerol ester

小川 陽子、阿武 あゆみ、○坂元 仁、土戸 哲明（関西大・化生工）
Yoko Ogawa, Ayumi Anno, Jin Sakamoto, Tetsuaki Tsuchido (Kansai Univ. Dept. Life Sci. Biotech.)

【目的】　近年、清涼飲料ではペットボトルタイプが主流であるが、開栓後の保存中に酵母による二次汚染が起こる場合がある。この汚染防止には食品乳化剤のジグリセリンモノラウレート（DG）が有効であることが知られており、当研究室では、この乳化剤とともに構成脂肪酸のラウリン酸も比較的低濃度で殺酵母作用があることを報告している。今回、この作用が酵母細胞内の液胞の破壊による可能性を示唆する結果を得たので報告する。
【方法】　*Saccharomyces cerevisiae* NBRC0234 株を用い、薬剤としてラウリン酸（東京化成）およびジグリセリンモノラウレート（理研ビタミン（株）より供与）を用いた。 酵母細胞を YM 培地（pH5.0）中、30℃で対数期まで培養後、集菌・洗浄後、クエン酸緩衝液（pH5.0）に懸濁し、薬剤処理を行った。処理後、BSA 溶液で薬剤を不活化後、YM 寒天培地（pH5.0）上で生存コロニー数を計数した。処理時の細胞濃度として、OD_{650} を.0.3、0.3、3.0 に調整した懸濁液で行った。一方では、薬剤処理後の細胞を光学顕微鏡で形態観察するとともに、キナクリンおよびヨウ化プロピジウム（PI）を用いる蛍光色素による染色像を分析した。キナクリンについては、薬剤処理後の酵母細胞を 50mM リン酸緩衝液（pH7.5）を含む YM 培地中で染色し、液胞の状態を観察した。PI 染色は、150mM 生理食塩水中で染色した。各染色後、蛍光顕微鏡にて観察した。
【結果】　ラウリン酸と DG の殺酵母作用を各濃度の酵母懸濁液で調べた結果、ラウリン酸の場合 OD_{650} が 0.03 と 0.3 では 40μM、OD_{650} 3.0 では 100μM 以上であった。DG では、OD_{650} が 0.03 と 0.3 で 70μM 以上、3.0 では 150μM 以上で殺酵母作用が見られた。これらの薬剤処理した酵母細胞では液胞が肥大し、DG 処理では液胞内で顆粒のブラウン運動が顕著であった。キナクリン染色により、処理細胞では液胞が損傷を受け、破壊されることが観察された。この液胞破壊率とコロニーカウントによる生存数低下率との間には相関性が認められた。また PI 染色の結果では、細胞染色率と生存数低下率との間に相関性が見られなかった。これらの結果から、ラウリン酸と DG による酵母細胞の死滅には細胞膜破壊は関与せず、液胞膜の破壊が関与しており、液胞の中の分解酵素による細胞質タンパク質の分解が細胞死の要因である可能性が示唆された。

yeast, killing action, vacuole

講演番号：4C23a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ C校舎23会場

さまざまなプラスチック表面における細菌バイオフィルム形成量の比較

Comparison of the biofilm formation on various plastic surfaces.

○倉科 光紀、三輪 京子、森川 正章（北大院環境・分子生物）
○Koki Kurashina, Kyoko Miwa, Masaaki Morikawa (Hokudai)

【目的】多くの細菌は固体表面に付着して高次構造体すなわち、バイオフィルムを形成する。固体表面や材質の違いによるバイオフィルム形成量との相関関係は、いまだ不明な点が多い。すなわち、ガラスや複数の金属表面におけるバイオフィルム形成量の比較例はあるが、複数のプラスチックに対するバイオフィルム形成量を系統的に調査した報告例は少ない。そこで本研究では、ガラスと10種類のプラスチックに対して標準的な4属4種の細菌バイオフィルムを形成し、その量を比較した。

【方法】12 穴マイクロタイタープレートにあらかじめ *Escherichia coli* MG1655 株、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株、*Bacillus subtilis* 168 株、*Acinetobacter calcoaceticus* P23 株を 1%植菌した 4 ml LB 液体培地を分注した。そこへガラス、塩化ビニル、ポリエチレン、アクリル樹脂、シリコン、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリカーボネイト、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタラート、フッ素樹脂の各シート小片 22 mm × 22 mm × 0.2-1 mm をほぼ垂直になるように立て掛けて 27℃と 37℃で 12 時間あるいは 24 時間静置培養した。回収したガラスとプラスチックシート小片は、水洗浄後、バイオフィルムを 0.1%クリスタルバイオレットで染色し写真撮影した。その後、33%酢酸で抽出した青紫色溶液の吸光度（A_{595}）を測定し、バイオフィルム形成量を比較した。

【結果】試験に供した4種全ての細菌に共通して、ポリウレタンとシリコンシート小片に高いバイオフィルム形成能があった。*B. subtilis* 168 株は、37℃で24時間後にバイオフィルム形成量が急激に増加した。各プラスチックシートの水接触各を測定したところ、各表面の疎水度とバイオフィルム形成量に相関性は見られなかった。また、染色写真からは各小片の界面付近に多くのバイオフィルムを形成していることがわかった。

Biofilm, Plastic, Silicone

講演番号：4C24a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ C校舎24会場

フォスフォイノシチドと TORC2 結合タンパク質 Slm1 と Slm2 の下流因子の探索

Identification of the downstream factors for the phosphoinositide and TORC2-binding proteins Slm1 and Slm2

津田遼平, 田中直孝, ○田淵光昭 （香川大学 農学部）
Ryohei Tsuda , Naotaka Tanaka , ○Mitsuaki Tabuchi (App. Biosci., Kagawa Univ.)

Slm1 と Slm2 (Slm1/2)は、自身の PH ドメインを介してフォスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 ($PI4,5P_2$) に結合することにより形質膜に局在化され、Tor 複合体 2(TORC2)に結合し、リン酸化されるタンパク質であり、$PI4,5P_2$ と TORC2 の下流因子として見出されたパラログタンパク質である（Audhya et al., *EMBO J*, 2004)。*SLM1* と *SLM2* の二重破壊株は致死であり、$slm1^{ts}$ *slm2*Δ 温度感受性株は高温条件下において、アクチン細胞骨格の異常、スフィンゴ脂質代謝の異常が見られる。遺伝的な解析により Slm1/2 は、酵母スフィンゴ脂質の 1 つイノシトールリン酸セラミド（IPC）を分解し、セラミドに変換する酵素である Isc1 の活性を負に制御することにより高温ストレスに依存したスフィンゴ脂質代謝制御において必須の役割を演じることが示唆されている（Tabuchi et al., *MCB*, 2006)。しかし、Slm1/2 がいかにして Isc1 の活性を負に制御しているかについては全く明らかにされていない。そこで、本研究では、Slm1/2 の下流因子を同定することでスフィンゴ脂質代謝制御における Slm1/2 の機能を明らかにすることを目的として、トランスポゾンを用いたランダム変異導入により遺伝的に下流因子の探索を行っている。また、これに加えて、Slm1 の過剰発現は高温感受性を示すことが観察された。そこで、Slm1 の過剰発現を抑圧する遺伝子を同定することによって、Slm1/2 の分子機能を違う視点から解明することを目的として、現在酵母ゲノム多コピーライブラリーを用いた抑圧因子のスクリーニングを行っている。また、Slm1/2 とスフィンゴ脂質の接点を細胞内局在の面から明らかにすることを目的として、スフィンゴ脂質が豊富に存在することが知られる膜ドメインであるラフトを観察するために、同じくラフトに豊富に存在することが知られるエルゴステロールを特異的に染色する試薬である Filipin を用いて酵母細胞を染色したところ、Filipin は形質膜にドット状に染色され、このドット状の染色は Slm1-GFP と完全に一致した。このことから、Slm1 はラフト直下の細胞膜に特異的に局在し、そこでスフィンゴ脂質代謝を制御していることが予想された。

TORC2, Sphingolipid, yeast

講演番号:4C24a02
講演日時、会場:3月25日09:11～ C校舎24会場

分裂酵母におけるDNA複製と細胞極性をつなぐ経路：癌細胞の異常な形を理解するヒント！

The signaling pathway linking DNA replication and cell polarization in fission yeast: A clue to abnormal cancer cell morphology

○古家野孝行、久米一規、水沼正樹、平田　大（広島大・先端研）
○Takayuki Koyano, Kazunori Kume, Masaki Mizunuma, Dai Hirata (Hiroshima Univ., AdSM)

【目的】癌細胞では異常な増殖とともに細胞極性（細胞形態）も異常になることが知られているが、形態異常の原因は不明である。癌細胞の増殖異常の一要因として、チェックポイント機構の破綻が挙げられる。チェックポイント機構は、生命維持にとって重大な異常が生じた際、その異常を解消するまで自身の細胞周期を停止させる生命維持にとって必須な機構である。一方、細胞極性は、増殖や分化と連動して適切に制御されることから、細胞周期との連携制御機構の存在が示唆されるが、その詳細は不明な点が多い。

我々は、細胞癌化の理解を最終目的として、分裂酵母を用いて、細胞周期と細胞極性との連携制御機構の解明を目指している。分裂酵母は、直径が一定で細胞端でのみ極性成長する。特に、G2期初期では、単極成長から両極成長へと成長極性をダイナミックに変化させる、NETO（New End Take Off; NETO）が起こる。NETOが起こるには、2つの条件（一定の細胞サイズへの到達、DNA複製の完了）が必要なことから、この時期に、これらをモニターし成長極性を制御する経路の存在が示唆されてきたが、その実体は不明であった。今回、我々は、高温でNETOの起こらない単極成長変異体*mon7*の原因遺伝子が、DNA複製に必須なDNA polymerase α（*pol1*）の変異であることをつきとめ、これを契機に、DNA複製と細胞極性とをつなぐ経路を発見した(1)。

【方法・結果】まず、*pol1* 変異体（DNA 複製異常時）の NETO 遅延に、DNA 複製チェックポイント経路が重要かどうか調べた結果、Rad3（ヒト ATR ホモログ）と Cds1（ヒト Chk2 ホモログ）が重要であることがわかった。次に、*pol1* 変異体での NETO 遅延の原因を調べるため、既知の NETO 関連因子の局在を調べた結果、微小管により細胞端に運ばれる Tea1 が、*pol1* 変異体の非成長細胞端（NGE）で、異常に蓄積していることがわかった。さらに、微小管ダイナミクスを測定したところ、*pol1* 変異体の NGE 側で、微小管末端の細胞膜での滞留時間が増加し、微小管が安定化していることが示唆された。そこで、*pol1* 変異体の NETO 遅延に、微小管の安定化が重要かどうか調べるため、微小管重合阻害剤の添加や、微小管の安定化に重要な微小管プラス端結合分子 Tip1 の破壊の効果を調べた結果、両者によって、*pol1* 変異体の NETO 遅延が抑圧された。以上より、*pol1* 変異体では、微小管の安定化により NETO 遅延が誘導されることがわかった。さらに、Ca^{2+}/カルモジュリン依存性ホスファターゼ・カルシニューリン（CN）が、Cds1 の下流、Tip1 の上流で機能することがわかった。具体的には、DNA 複製異常時に、Cds1 が CN をリン酸化により活性化し、活性化された CN が Tip1 を脱リン酸化することで、 微小管の安定化を伴う NETO 遅延を誘導することがわかった。さらに、本 CCT（Cds1-CN-+TIPs）経路は、DNA 複製異常時の NETO 遅延のみならず細胞周期遅延（生存率の維持）にも重要であることがわかった。

1, K. Kume et al., *Nature Cell Biology*, 13:234-242 (2011)

DNA replication checkpoint, Cell polarity, Calcineurin

講演番号：4C24a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ C校舎24会場

DNA 複製チェックポイント経路による成長極性制御に関与する遺伝子の探索

Search for genes that are related to the regulation of growth polarity by the DNA replication checkpoint pathway

◯橋本智代[1]、久米一規[2]、水沼正樹[2]、平田大[2]（1 広島大・工、2 広島大・院先端研・分子生命）

◯Tomoyo Hashimoto[1], Kazunori Kume[2], Masaki Mizunuma[2], Dai Hirata[2], (1 Eng. Hirosima Univ. 2 AdSM. Hirosima Univ.)

【目的】癌細胞では、増殖異常とともに細胞極性異常を示すことが知られているが、後者の原因は不明である。細胞極性と細胞周期とは連携制御されることから、癌細胞での細胞極性異常は、本連携制御機構の破綻が原因であると考えられるが、核内の染色体サイクルと細胞端での細胞極性制御とをつなぐシグナル経路は不明な点が多い。我々は、細胞癌化の理解を最終目的として、モデル細胞である分裂酵母を用いて、本連携制御機構の解明を目指している。具体的には、分裂酵母の G2 期初期に、単極成長から両極成長へと成長極性が変換する NETO (New End Take Off)に注目している。NETO が起こるには、DNA 複製の完了と一定の細胞サイズへの到達が必要であるが、それらをモニターし NETO を制御する経路の実体は不明であった。しかし、当研究室の最近の解析から、高温で増殖停止し NETO の起こらない単極成長変異体の原因遺伝子として、*pol1* (DNA polymerase-alpha)が同定され、さらに、*pol1* 変異体（DNA 複製異常時）では、高温で Rad3-Cds1（DNA 複製チェックポイントキナーゼ）依存的に、細胞周期遅延のみならず NETO 遅延が誘導されることがわかった。さらに、その NETO 遅延には、Cds1-Calcineurin(CN：Ca^{2+}/calmodurin-dependent phosphatase)-+TIPs（microtubule plus-end tracking proteins）経路が重要で、具体的には、DNA 複製異常時に Cds1 が CN をリン酸化することにより活性化し、活性化した CN が Tip1 を脱リン酸化することにより、微小管の安定化を伴う、NETO 遅延を誘導することが明らかになった(1)。しかし、CN は、通常、細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇により活性化されるが、*pol1* 変異体での CN 活性化に、細胞内 Ca^{2+}濃度の調節機構が必要かどうかは不明である。そこで、本研究では、DNA 複製異常時の Cds1 による CN 活性化機構を明らかにするため、細胞内 Ca^{2+} 濃度制御因子に注目し、*pol1* 変異体が示す NETO 遅延に関与する遺伝子を探索した。

【方法・結果】Pombe Gene Data Base をもとに、細胞内 Ca^{2+}濃度制御因子の中の非必須遺伝子に着目し、*pol1* 変異体との二重変異体を構築し、高温での成長極性を調べた。その結果、複数の遺伝子破壊により、*pol1* 変異体が示す NETO 遅延が部分的に抑圧された。現在、それらの遺伝子について、Cds1 や CN との機能的上下関係、CN 活性化への関与について解析中である。

1, K. Kume *et al*., **Nature Cell Biology**, 13: 234-242 (2011)

checkpoint, cell polarity, calcineurin

講演番号：4C24a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎24会場

分裂酵母のCoQおよびシステイン合成欠損による酸化ストレス応答

Oxidative stress response by deficiency of CoQ and cysteine biosynthesis in fission yeast

○竹内佳奈、古田奈々、中川　強[1]、戒能智宏、川向　誠
（島根大・生物資源・生命工、島根大・総科技センター[1]）
○Kana Takeuchi, Nana Furuta, Tsuyoshi Nakagawa, Tomohiro Kaino, Makoto Kawamukai
(Dept. of Life Sci. & Biotech., Fac. of Life & Env. Sci., Shimane Univ., Cent. for Int. Res. in Sci.[1])

【目的】コエンザイムQ（CoQ）は脂溶性抗酸化物質であり、ミトコンドリアの呼吸鎖における必須因子である。分裂酵母のCoQ欠損株は、酸化ストレス感受性、最少培地での生育遅延、呼吸欠損、高濃度の硫化水素発生といった表現型を示す。これまでの研究からCoQ欠損株においてカタラーゼをコードする*ctt1*の発現量が上昇していることから、CoQの欠損によって細胞内で酸化ストレスが蓄積していることが示唆されている。一方、CoQ欠損株に抗酸化能を持つシステインを添加すると、最少培地での生育遅延の回復や、硫化水素発生量の減少といった表現型の抑制が見られることから、CoQ欠損株における表現型の抑制にシステインが大きく貢献している。しかしながら、システインの抗酸化能が貢献しているのか、アミノ酸代謝物として貢献しているのかは定かではない。そこで本研究では、酸化ストレス時のシステインの抗酸化物質としての効果を調べるために、CoQ欠損株(*Δdps1*、*Δppt1*)とシステインシンターゼ(Cys1a)破壊株を用いて酸化ストレス感受性試験を行い、さらにFluorescence activated cell sorter (FACS)を用いて細胞内のROSの測定を行った。

【方法・結果】まず始めに、過酸化水素(H_2O_2)とパラコート(PQ)を用いて酸化ストレス感受性試験を行ったところ、CoQ欠損株において、H_2O_2では1mM、PQでは0.5mMで感受性を示し、同じ濃度の場合、PQでより強い感受性を示した。さらに、システインシンターゼをコードする*cys1a*の破壊株では、CoQ欠損株よりも強い酸化ストレス感受性を示した。また、この感受性は培地へのシステインの添加によって抑圧され、分裂酵母におけるシステインの代謝物であるグルタチオンの添加ではより顕著な抑圧がみられた。Dps1、Ppt1、Cys1aはミトコンドリアに局在することから、細胞質に拡散しているH_2O_2に比べて、PQによりミトコンドリアで発生したスーパーオキシド(・O_2^-)による酸化ストレスに強い感受性を示したと考えられる。以上のことから、分裂酵母ではミトコンドリアにおけるCys1aが関与するシステイン合成やCoQ合成が細胞の酸化ストレス耐性に重要であることが示唆された。次に、CoQ欠損株と*Δcys1a*株を用いてH_2O_2を添加したときの細胞内のROS量の測定を行った。CoQ欠損株より強い酸化ストレス感受性を示した*Δcys1a*株では、H_2O_2およびPQ添加後の時間、濃度依存的に細胞内のROSが増加する傾向が見られ、特にPQ添加においては顕著なROS発生が検出された。現在、CoQ欠損株においても細胞内ROSの検出を行っている。

1) Kawamukai M., *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2009) **53**, 217-226
2) Miki R. *et al.*, *FEBS J.* (2008) **275**, 5309-5324

Coenzyme Q , oxidative stress , reactive oxygen species

講演番号：4C24a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎24会場

出芽酵母におけるカルシニューリン機能関連遺伝子の探索

Search for genes functionally related to calcineurin in budding yeast

○畠山千央[1]、久米一規[2]、高田純平[2]、福留美穂[1]、水沼正樹[2]、平田　大[2]（1 広島大・工、2 広島大・院先端研・分子生命）

○Chihiro Hatakeyama[1], Kazunori Kume[2], Junpei Takata[2], Miho Fukutome[1], Masaki Mizunuma[2], Dai Hirata[2]（1 Eng., Hiroshima Univ. 2 AdSM, Hiroshima Univ.）

【目的】カルシニューリン（以下CN）は、Ca^{2+}/CaM依存性 protein phosphataseで、酵母からヒトまで保存されている。CNは、哺乳類では、免疫応答、記憶、アポトーシスなどに関与し、一方、酵母では、ストレス応答、細胞壁合成、イオンホメオスタシス、細胞周期、細胞形態形成など、多様な生命現象に重要な機能を有している。本研究では、CNが関与する生理機能をさらに解明するため、出芽酵母の非必須遺伝子破壊株ライブラリー（BY4741株）の中の温度感受性株に注目し、CN阻害剤である免疫抑制剤FK506を使用し、CNと機能的に関係する遺伝子を探索した。

【方法・結果】4847 株の出芽酵母非必須遺伝子破壊株ライブラリー（BY4741 株）の中で、温度感受性を示す 345 株（低温感受性 CS：123 株、高温感受性 TS：142 株、CS かつ TS：80 株）について、CN 阻害剤である免疫抑制剤 FK506 により、生育に影響を受けるものを選抜した。その結果、FK506 感受性を示した新規な機能関連遺伝子を 60 株、一方、FK506 により制限温度の生育が回復するものを 7 株、選抜した。次に、FK506 の効果が CN の阻害によることを確認するため、選抜した遺伝子破壊株と CN 破壊株（CN の調節サブユニットである CNB1 破壊）との二重破壊株を構築し生育を調べたところ、CN 破壊により生育が悪化したものを 16 株（60 株中）、生育が回復したものを 4 株（二重変異株が構築できた 6 株中）、それぞれ選抜した。さらに、生育が回復した 4 株について、FK506 の効果が、FK506 結合タンパク質である Fkb1 に依存するかどうか調べるため、FKB1 破壊との二重変異株を構築し、FK506 の効果を調べたところ、3 株が、Fkb1 依存的な生育の回復を示した。現在、FK506 の効果が、株のバックグランドに依存するかどうかを検討するため、選抜した遺伝子破壊株について、W303 株でも破壊株を構築中である。今後、W303 株での表現型を解析した後、CN との機能的関連性について、さらに詳細に解析を進める予定である。

calcineurin, cell growth, FK506

講演番号：4C24a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎24会場

緑膿菌が生産する細胞間情報伝達物質への鉄の影響

Effect of iron on *Pseudomonas* quinolone signal (PQS)

○豊福　雅典、大浦　啓、内山　裕夫、野村　暢彦（筑波大院生命環境）
○Masanori Toyofuku, Hiromu Oura, Hiroo Uchiyama, Nobuhiko Nomura (Univ. Tsukuba)

【目的】

近年の研究により細菌は低分子化合物を介して周囲の細菌と情報伝達を行っていることが明らかとなってきている。このような細胞間情報伝達は細菌の生態から感染症まで幅広く関与している。細胞間情報伝達物質により制御を受ける遺伝子は、緑膿菌を例にとると数百にのぼると言われており、細胞の代謝に与える影響は大きい。これまでに多くの研究が細胞間情報伝達物質によって制御される遺伝子群の詳細な解析を行ってきたが（Toyofuku et al. *J. bacteriol.* 2007, 2008)、細胞間情報伝達物質が周囲の環境によってどのような影響を受けるかについての詳細な解析は極めて少ない。細胞間情報伝達は情報伝達物質の存在によって初めて成り立つものであるため、情報伝達物質の挙動を解析することは大変意義深いと言える。そこで、緑膿菌において細胞間情報伝達は鉄獲因子の制御に関与していることから、本研究では鉄が緑膿菌の細胞情報伝達物質に与える影響を解析した。

【方法】

培地中に鉄を添加して、緑膿菌の情報伝達物質への影響をレポータープラスミドを用いて測定した。また、緑膿菌の生産する情報伝達物質の一種である*Pseudomonas* quinolone signal (PQS)についてはTLCにて検出を行った。

【結果】

鉄によりPQSの生産が抑制されることが明らかとなった。詳しく解析した結果、鉄は細胞の存在下のみにおいて物理的にPQSを消失させる効果があることが示された。このような情報伝達物質への環境因子の影響はこれまでに全く例がなく、新規な細胞情報伝達制御機構である。興味深いことに、このPQSに対する鉄の影響は緑膿菌以外のグラム陰性細菌の介在によっても観察され、今後複合微生物系における細胞間情報伝達の解明にも繋がると期待している。

本研究の一部はCREST、ALCAの助成により行われた。

cell-cell communication, *Pseudomonas* quinolone signal, quorum sensing

講演番号：4C24a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ C校舎24会場

緑膿菌の鉄代謝関連シグナル伝達系を標的とするスクリーニング系の構築

A novel screening system toward iron metabolism-related signal transduction pathway in *Pseudomonas aeruginosa*.

○佐藤一樹、秋葉敬斉、安藤太助、磯貝恵美子、米山裕（東北大・農）
○Kazuki Sato, Keiji Akiba, Tasuke Ando, Emiko Isogai, Hiroshi Yoneyama（Tohoku Univ）

【目的】緑膿菌は宿主の免疫力低下に伴い感染する日和見感染症の主要起因菌であり、各種抗菌剤に対し、自然耐性ならびに獲得多剤耐性を示す。そのため、緑膿菌感染症は難治化傾向にあり、本菌を含めた多剤耐性菌の出現は大きな社会問題となっている。これらの細菌感染症に対抗するため、新規標的に対する抗菌剤の開発が望まれる。病原細菌が感染を成立させるためには、必須元素である鉄を外界より取り込む必要があり、緑膿菌もその例外ではない。鉄欠乏下で、本菌は鉄キレート活性を有する主要なシデロフォアであるピオベルジンを産生・分泌し効率的に鉄を取り込むが、このとき鉄獲得も含めた鉄代謝に関連するシグナル伝達系が活性化することが知られている。そこで、本研究では、このシグナル伝達系を標的とするスクリーニング系の構築を試みた。
【方法】鉄–ピオベルジン複合体の特異的な外膜受容体であるFpvAは鉄欠乏下で発現レベルが上昇する。また、緑膿菌野生株は主要な多剤排出ポンプであるMexAB-OprMを発現することで各種抗菌剤に多剤耐性を示すが、本排出ポンプの外膜チャネルであるOprMを欠損した変異株（ΔOprM）はポンプが機能せず薬剤に高感受性を示す。そこで、ΔOprM株の*fpvA*遺伝子直下に野生型の*oprM*遺伝子を導入した株（PAM01）を作製し、鉄代謝関連シグナル伝達系の活性化をOprMの発現、すなわち薬剤に対する耐性化として簡便に評価できる系を構築した。そして、鉄欠乏（0.5 mMジピリジル共存下）および鉄過剰条件下でのクロラムフェニコール（CP）とアズトレオナム（AZT）に対する最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。また、ウエスタンブロット法によりOprMの発現を調べた。
【結果】野生株のCPおよびAZTに対するMICは各々64 μg/ml、4 μg/mlであり、ΔOprM株は排出ポンプが機能しないために各薬剤に高感受性を示す（CP 4 μg/ml、AZT 0.25 μg/ml）。PAM01株のCPおよびAZTに対する感受性は、鉄過剰条件下で各々4 μg/mlおよび0.25 μg/mlであり、ΔOprM株の感受性と同レベルであった。一方、鉄欠乏下でのPAM01株のMICは32 μg/ml（CP）および2 μg/ml（AZT）であり、野生株と同等レベルであったことから、*fpvA*遺伝子直下に挿入した*oprM*遺伝子の発現が誘導されたものと思われた。この点を明らかにするために、ウエスタンブロット解析を行った結果、鉄過剰条件におけるPAM01株のOprMの発現はほとんど認められなかったが、鉄欠乏条件下では野生株と同等のOprMの発現が認められた。以上より、本評価システムは鉄欠乏環境に応答する鉄代謝シグナル伝達系の活性化を、指標薬剤に対する感受性の変化として捉えることができる簡便なスクリーニング系であることが明らかとなった。

Keyword *Pseudomonas aeruginosa*, Iron, Signal transduction

講演番号：4C24a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ C校舎24会場

Assessment of structural and physiological profiles of microbial biofilms using a multichannel device

Zoe SANCHEZ, Akio TANI[1], Nobuhiro SUZUKI[1], and ○Kazuhide KIMBARA (Fac. Eng. Shizuoka Univ., [1]IPSR, Okayama Univ.)
サンチェス　ゾイ、谷明生[1]、鈴木信弘[1]、金原和秀（静岡大・工、[1]岡山大・植物研）

Biofilms are surface-attached microbial communities encased in a self-produced extracellular polysaccharide matrix. They are reported to exhibit a high degree of resistance to antimicrobial agents, host immune system, and environmental stresses, causing chronic, nosocomial, and medical device-related human infections, biofouling, biocorrosion, and product contamination in industrial settings. Here we describe a new multichannel device designed with a nine-channel flow chamber with stainless steel substratum (Fig. 1). The protocol and design allow sampling frequency, ease in device assembly and manipulation, overcome space and cost constraints with its portable size and autoclavable parts (Fig. 2). Moreover, it permits compatibility with confocal laser scanning microscopy for direct in situ, non-destructive investigation of live biofilm structures, and qualitative and quantitative analyses with COMSTAT. Flow experiments with *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (GFP) showed structural pattern differences as a result of growth medium concentration gradient, forming mushroom-shaped structures in high nutrient concentration and flat, compact biofilms in low nutrient concentration. Time series analysis based on quantification of structural parameters suggested that biofilm development in the multichannel device was faster and formed thicker biofilms compared with other flow cell systems with glass substrata. To date, there are no reports on susceptibility of flow–chamber grown biofilms to D-amino acids. In the present study, we investigated the effect of D-amino acid mixture on *P. aeruginosa* biofilm grown under flow conditions using the device. After 16 h treatment with D-amino acid mixture, thickness of *P. aeruginosa* biofilms was reduced by 51%. Biomass consisted only of 15 to 30% viable biofilm, in contrast to untreated biofilms with 91 to 99%. Although no biofilm disassembly was observed, as previously reported in standing cultures, the D-amino acid mixture was shown to significantly reduce biofilm viability, maximum thickness and roughness coefficient, resulting in structural and biofilm physiology transformations. Considering that the device substratum simulate many biofilm environments in the food sector, hospital, medical devices, and engineered systems, we propose here its suitability for biomedical and industrial biofilm experiments targeted for growing or monitoring biofilms, characterizing biofilm architecture and physiology, and testing anti-biofilm compounds and antibiotics for biofilm eradication.

multichannel device, microbial biofilms, physiological profiles

講演番号：4C24a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ C校舎24会場

脱窒が緑膿菌ムコイド株と非ムコイド株の複合バイオフィルム形成に与える影響

Influence of denitrification on *Pseudomonas aeruginosa* mucoid-nonmucoid mixed biofilm

○濱田 将風、酒井 亮祐、楊 佳約、豊福 雅典、清川 達則、中島 敏明、内山 裕夫、野村 暢彦（筑波大院生命環境）

○Masakaze Hamada, Ryosuke Sakai, Jiayue Yang, Masanori Toyofuku, Tatsunori Kiyokawa, Toshiaki Nakajima-Kambe, Hiroo Uchiyama, Nobuhiko Nomura (Grad. Sch. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は環境常在菌また日和見感染菌として水や土壌、人体などの環境に幅広く存在し、適応している。緑膿菌の高い適応力の一つに、生育の過程で多くの変異株が出現し、共存・優占化することが挙げられる。変異株でよく知られるものとして、細胞外多糖であるアルギン酸を過剰生産しスライム状のコロニーを形成するムコイド変異株がある。

ムコイド変異株は、特に肺気道感染症において良性の非ムコイド野生株から発生・優占化し、難治化や致死率の向上に関わる変異株である。しかしながら、ムコイド変異株が発生・優占化していくメカニズムは未だ詳細に分かっておらず、その解明は緑膿菌感染症の制御で新しい知見を得るだけでなく、緑膿菌が持つ高い環境適応能力の一端を解き明かす上でも大きな意義があるといえる。

近年の報告より、ムコイド変異株が優占化する肺気道感染症中の環境は脱窒条件下にあるとされている。そこで、脱窒がムコイド変異株の優占化を引き起こす要因であると仮定し、脱窒がムコイド変異株と非ムコイド株の複合バイオフィルム形成に与える影響を解析する事とした。

【方法・結果】非ムコイド野生株 PAO1、ムコイド変異株 Δ*mucA* をそれぞれ異なる蛍光レポーターで識別した。次に、両菌株共存下における複合バイオフィルムを定量し、その構造および菌相を解析した。LB 培地条件下では、非ムコイド野生株が優占的に生育した。一方、脱窒の電子受容体として硝酸を添加した LB 培地条件下では、ムコイド変異株が優占的に生育した。

また、各々の菌株の脱窒フラックスを解析したところ、中間代謝産物である一酸化窒素 NO の蓄積量は非ムコイド野生株に比べてムコイド変異株において少ない可能性が示唆された。

これらの結果より、脱窒における中間代謝産物 NO がムコイド変異株の複合バイオフィルム中における優占化に関与すると考えられる。

Pseudomonas aeruginosa, mucoid, denitrification

講演番号：4C24a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ C校舎24会場

Aspergillus nidulans における酸化ストレス応答機構の解析

Analysis of oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*

○ 佐古知美，山崎ゆかり，金丸京子，加藤雅士[1]，小林哲夫（名大院・生命農，名城大・農[1]）

○ Tomomi Sako, Yukari Yamazaki, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato[1], Tetsuo Kobayashi (Graduate Sch. of Bioagric., Nagoya Univ.[1] Fac. of Bioagric. Sci., Meijo Univ)

【目的】*A. nidulans* には 15 種のヒスチジンキナーゼ（HK），1 種のリン酸基転移中間因子 YpdA，4 種のレスポンスレギュレーター（RR）が存在する。15 種の HK のうち *phkA*, *phkB* は，分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* において有性生殖，酸化ストレス応答，有糸分裂の制御に関わる *phk1/mak2*, *phk2/mak3* 及び *phk3/mak1* と高い相同性を示す[1)]。本研究では，PhkA, PhkB の機能を明らかにするため，遺伝子破壊株（*ΔphkA, ΔphkB*）と誘導発現株のストレスに対する応答や生育の変化を観察した。

【方法と結果】*ΔphkA, ΔphkB* を 2 日間培養後分生子を回収し，過酸化水素を含む培地にスポットしたところ，これらの株は野生株に比べ，2mM の過酸化水素に対する感受性を示した。*ΔphkA* は *ΔphkB* より低い濃度の過酸化水素で生育阻害を示した。*ΔphkB* 株に *alcA* プロモーター制御下の *phkB* 遺伝子を導入した株は酸化ストレスに対する感受性が減少した。これらの結果から，PhkA, PhkB は *A. nidulans* において過酸化水素耐性に機能すると考えられた。また，*phkB* 誘導発現株の菌糸の伸長を寒天最少培地上で観察したところ，気中菌糸の減少が確認された。一方，酸素を制限すると野生株と同じ菌糸伸長を示した。カタラーゼ遺伝子（*catA, catB, catC, catD*）や NADPH オキシダーゼ遺伝子（*noxA*）など酸化ストレス関連する遺伝子の発現レベルの結果をもとに PhkA, PhkB の機能と情報伝達機構を考察する。

1) Nakamichi, N. *et al.* (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2663-2672

fungi, oxidative stress, signal transduction pathway

講演番号：4C24a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ C校舎24会場

*Aspergillus nidulans*におけるパキシリン様タンパク質PxlAの機能解析

Functional analysis of paxillin-like protein PxlA in *Aspergillus nidulans*

○二神 泰基、梶原 康博[1]、高下 秀春[1]、大森 俊郎[1]、Michelle Momany[2]、後藤 正利（九大院・農、[1]三和酒類、[2]ジョージア大）

○Taiki Futagami, Yasuhiro Kajiwara[1], Hideharu Takashita[1], Toshiro Omori[1], Michelle Momany[2], Masatoshi Goto (Kyushu Univ., [1]Sanwa Shurui Co. Ltd., [2]Univ. of Georgia)

【目的】パキシリンは細胞間接着因子やシグナル伝達経路構成因子の足場として機能するタンパク質の一種で、真核生物において広く保存されている。出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*には、1つのパキシリン様タンパク質（Pxl1）が存在し、極性成長部位の決定・維持に関与することが明らかにされている。一方、糸状菌*Aspergillus nidulans*のゲノムには2つのパキシリン様タンパク質が存在し、そのうちPxlAは、出芽酵母のPxl1とは異なるクレードに分類される。そこで、PxlAは糸状菌特有の形態形成やストレス応答に重要な役割をもつと推定し、その機能を解明することを目的とした。

【方法】*A. nidulans* AKU89株を野生株として、*argB*遺伝子マーカーの挿入により、*pxlA*遺伝子破壊株（Δ*pxlA*）を構築した。様々な培養条件下におけるΔ*pxlA*のコロニー形成、および表現型を観察した。また、細胞壁多糖組成として、アルカリ可溶性画分、アルカリ不溶性画分、およびGlcNac含量を測定した。

【結果】Δ*pxlA*は、MM培地およびYG+0.6 M KCl培地において野生株と同様の菌糸伸長能を示したが、フィアライドおよびメトレの形態に異常が観察され、分生子形成能は顕著に低下（＜10%）した。また、Δ*pxlA*はタンパク質合成阻害剤であるハイグロマイシンBに対して野生株と同等の感受性を示したが、細胞壁生合成系を阻害するCalcofluor、Congo red、およびミカファンギンに対していずれも高感受性を示した。さらに、Δ*pxlA*は、細胞壁構成多糖成分のうちキチン（GlcNAc）含量が低下（ca. 60%）した。以上の結果より、*A. nidulans*において、PxlAは分生子形成および正常な細胞壁合成に関与すると考察した。

Aspergillus, paxillin, cell wall

講演番号：4C24a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ C校舎24会場

*Aspergillus nidulans*における新規なニトロソ化ストレス耐性酵素metallothioneinの耐性機構の解析
Analysis of the novel nitrosative stress resistant protein metallothionein in *Aspergillus nidulans*

○周しょう敏、鳴神寿昭、上村曜介、星野貴行、高谷直樹（筑波大院・生命環境）
○Shengmin Zhou, Toshiaki Narukami, Yosuke Kamimura, Takayuki Hoshino , Naoki Takaya (Grad. Sch. Life Env. Sci, Univ. of Tsukuba)

【目的】微生物の活性化窒素物質(RNS)に対する耐性化とその機構は医学・農学分野で高い関心を持たれている。細菌と酵母のRNS耐性化機構に関する研究は盛んに進められているが、カビのそれに関する研究は極めて少ない。本研究はカビの新規なRNS耐性化遺伝子を発見し、その耐性化機構を解明することを目指している。

【方法及び結果】*A. nidulans*の遺伝子ライブラリーの導入によって、多コピーで野生型株のRNS耐性を増強する遺伝子*mthA*が単離された。*mthA*は生物に広く存在している重金属耐性化ペプチドであるmetallothionein（MT）をコードしていた。*mthA*にコードされたMT（MT1）は報告されたMTの分子種の中で最も短いもの(23 aa)であった。これまでにMTによるRNS耐性化に関する研究は少なく、MTによるRNSの解毒機構も未解明である。そこで、本研究では、これを解明することを試みた。*mthA*の発現はRNSによって誘導された。*mthA*の高発現株（HmthA）の生育は野生株（WT）と比べて高いRNS耐性を示し、*mthA*遺伝子の遺伝子破壊株（ΔmthA）の生育はWTのそれよりRNSに超感受性を示した。S-Nitroso-Cysteine抗体を用いたWestern blot解析により、RNS存在下で培養した菌体内のS-ニトロソ化タンパク質の総量を比べた結果、その量は、ΔmthA > WT > HmthAであった。また、in vitroの実験で、MT1は一酸化窒素(NO)によってニトロソ化されニトロソMT(MT-SNO)を生成したことから、MT1は、細胞内のNOを捕捉することによりRNS耐性に寄与すると考えられた。

一方、他の生物のmetallothioneinとは異なり、ΔmthAの生育は各種の重金属に対する超感受性を示さず、MT1と重金属の結合も確認できなかった。この結果から、MT1は重金属解毒機能を担っていないことが示唆された。*A. nidulans*のgenome DNA databaseを探索した結果、MT1のホモログであるMT2（109 aa）、MT3(51 aa)が見出された。MT2とMT3のそれぞれの単独遺伝子破壊株、二重遺伝子破壊株の表現型を調べた結果、全ての株の生育はRNS感受性になっていないことが確認された。以上のことから、*A. nidulans*には3種のMTが存在しているが、MT1のみが生育のRNS耐性化に関与していることがわかった。現在、MT1が有する6つのcysteine残基中のどのcysteineがニトロソ化されたかの詳細な解析を行っている。また、菌体内でMT-SNOの代謝経路もあわせて検討している。

Aspergillus nidulans, nitric oxide, metallothionein

講演番号:4C24a13
講演日時、会場:3月25日11:32～ C校舎24会場

ダイズ茎疫病菌 *Phytophthora sojae* 遊走子の感染時形態変化に関わる遺伝子の探索

A study of genes involved in morphological changes of *Phytophthora sojae* zoospore at the infection to host plants

木谷祐也、○崎浜靖子[1]、橋床泰之[1]（北大・農、[1]北大院・農）
Yuya Kitani, ○Yasuko Sakihama[1], Yasuyuki Hashidoko[1] (Dep. Agr., Hokkaido Univ., [1]Res. Fac. Agr., Hokkaido Univ.)

【目的】植物病原性卵菌であるダイズ茎疫病菌 *Phytophthora sojae* は、その生活環において遊泳能力をもつ遊走子細胞を形成する。この遊走子は、宿主植物の二次代謝産物の一種であるフラボノイドに対し強い走化性を示す[1]。宿主特異的誘引物質が存在する場合、*P. sojae* 遊走子は誘引後被嚢化し、成熟した被嚢胞子は発芽といった形態変化を引き起こす。また、遊走子の被嚢化は、振動など宿主非特異的刺激によっても引き起こされるが、宿主成分を感知することなく被嚢化（宿主認識失敗）した場合には、被嚢胞子は成熟せずに遊走子を再生する。そこで、本研究では、*P. sojae*遊走子の感染時細胞形態分化に関与する遺伝子群を明らかにするため、被嚢胞子が発芽する際に特異的に発現する遺伝子を調べた。
【方法】V8ジュース寒天培地上で暗所５日間生育させた *P. sojae* P6497 菌糸を滅菌水で30分ごとに水を換えながら３時間洗浄した後、一晩滅菌水に浸漬し遊走子懸濁液を調製した。発芽に至る宿主特異的刺激処理として、遊走子懸濁液に終濃度6%になるようにclarified-V8 溶液を加え、遊走子を被嚢化させた。V8添加直後の被嚢胞子と処理１時間後の発芽胞子を遠心して回収し、液体窒素で凍結した後、mRNAを抽出した。アダプター配列を負荷したオリゴdTプライマーを用いてcDNAを合成し、ディファレンシャルディスプレイ法でそれぞれの細胞に特異的に発現する遺伝子を探索した。
【結果】clarified-V8 溶液添加による遊走子の被嚢化率（添加 1 分後）および発芽率（添加 1 時間後）は、どちらも 90%以上であった。被嚢胞子と発芽胞子における DNA バンドパターンを比較したところ、それぞれに特徴的なバンドとして、被嚢胞子では 1,200 および 1,300 bp、発芽胞子では、600, 2,000および 3,000 bp 付近にバンドが確認された。この内、最もシグナルの強かった発芽胞子の 600 bp のバンドを精製し、キャピラリーシーケンサーで DNA 配列を解析した。得られた塩基配列（453 bp）と相同性のある配列を、*P. sojae*の遺伝子データベース（Oomycetes Transcriptomics Database, Virginia Bioinfomatics Institute ）で検索した結果、*S*-adenosylmethionine synthetase をコードする遺伝子（Transcription ID:108486）と 98%の相同性を示した。*S*-adenosylmethionine は DNA のメチル化反応のメチル基供与体となることが知られていることから、*P. sojae* 被嚢胞子の発芽にも、DNA のメチル化によるエピジェネティックな遺伝子発現制御が関与していることが示唆された。

(1) Morris P. F. and Ward E. W. B. (1992) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **40** 17-22.

oomycetes, cell differentiation, host recognition

講演番号：4C24a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ C校舎24会場

Aspergillus nidulans リン酸基中間因子 *ypdA* 遺伝子発現制御株の解析および YpdA とレスポンスレギュレーターの相互作用解析

Conditional expression of the phospho-transmitter gene *ypdA* and the interaction of YpdA with response regulators in *Aspergillus nidulans*.

○緑川 裕良[1]、萩原 大祐[2、3]、吉見 啓[2]、阿部 敬悦[1、2]（[1]東北大院・生物産業創成、[2]東北大・未来研、[3](現)千葉大・真菌センター）

○Yura Midorikawa[1], Daisuke Hagiwara[2、3], Akira Yoshimi[2], Keietsu Abe[1、2] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NICHe., Tohoku Univ., [3]Present address: MMRC, Univ. of Chiba)

【目的】His-Asp リン酸リレー情報伝達系はバクテリアから高等植物にまで保存された普遍的な環境応答機構であり、糸状菌でも広く保存されている。我々は，これまでに *Aspergillus nidulans* の高浸透圧応答経路について解析し、ヒスチジンキナーゼ NikA 、リン酸転移中間因子 YpdA 、レスポンスレギュレーター SskA および SrrA が浸透圧応答や酸化ストレス応答などに関与していることを明らかにしてきた。また、遺伝学的に欠損が致死であることが証明されている YpdA について、 *alcA* プロモーターにより *ypdA* 遺伝子の発現を制御可能な Conditional-*ypdA* 株（ C*ypdA* 株）を造成し、YpdA の機能について解析を進めてきた。しかしながら、YpdA 欠損が致死となる原因の特定には至っていない。本研究は、YpdA とレスポンスレギュレーターの相互作用を解析するため交配により多重変異の作出が可能であり，複数の選択マーカーを利用できる *A. nidulans* ABPU1 株を親株とした C*ypdA* 株を造成することを目的とした。また、C*ypdA* 株を親株とした *srrA* 破壊株を造成したので、その表現型解析を試みた。

【方法・結果】培地炭素源により発現制御可能な *alcA* プロモーターに *ypdA* 遺伝子を連結し、P*alcA-ypdA* コンストラクトを作製した。これをプロトプラスト PEG 法により *A. nidulans* ABPU1 株に導入し、新たな系統の C*ypdA* 株を作出した。本株は *ypdA* 発現抑制条件において、寒天培地上での顕著な生育悪化が認められ、菌糸形態の異常も観察された。また、定量 PCR により *ypdA* の発現状態を確認したところ、従来の C*ypdA* 株よりも *ypdA* 遺伝子の発現がより抑制されていることが明らかになった。さらに、*ypdA* 遺伝子発現抑制条件における HOG 経路下流の遺伝子 *gfdB*、 *catA* の発現状態を観察したところ、*ypdA* 発現抑制に伴い HOG 経路が活性化されることが明らかになった。次に、新規 C*ypdA* 株を親株として *srrA* 遺伝子の破壊を試みた。その結果、*ypdA* 発現制御時に下流の SrrA 経路が遮断された多重変異株（ C*ypdAsrrA*⊿ ）株の取得に成功した。現在、C*ypdAsrrA*⊿ 株の浸透圧ストレス応答および酸化ストレス応答について解析を進めている。また、 C*ypdAsskA*⊿ および C*ypdAsskA*⊿*srrA*⊿ 株の取得を試みており、YpdA 欠損が致死となるメカニズムについて考察している。(本研究は生研センターにより支援を受けた。)

Aspergillus nidulans, His–Asp phosphorelay, Response regulator

講演番号：4C25a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ C校舎25会場

歯周病原性細菌*Eikenella corrodens*はファージ感染により口腔内で高病原化する

Periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*, enhances its pathogenicity by phage infections in oral cavity.

山田 和範、○倉重 吉宏、加藤 昭夫、恵比須 繁之[1]、阿座上 弘行（山口大・農、[1]阪大院・歯）
Kazunori Yamada, ○Yoshihiro Kurashige, Akio Kato, Shigeyuki Ebisu[1], Hiroyuki Azakami (Yamaguchi Univ, [1]Osaka Univ)

【目的】*Eikenella corrodens* は歯周病関連細菌の一つで、その菌体表層のレクチンが本菌の病原性に大きく関与する。我々は臨床分離株の一つ（1073 株）から線状ファージに由来するプラスミド pMU1 を発見し、それにコードされたリコンビナーゼ遺伝子を標準株（23834 株）に導入することにより、線毛遺伝子領域を含むゲノムが大きく再編されることを報告した。さらに、このゲノム再編により、線毛の消失に伴うコロニー形状の変化が見られ、またレクチン活性、バイオフィルム形成能、溶血活性、増殖速度、炎症性サイトカイン誘導能などの本菌の病原性の各指標が上昇することも明らかにした。ゲノム再編が起こった株の線毛遺伝子領域の塩基配列を解析したところ、ある臨床分離株（VA1 株）とほぼ同じであったことから、このようなゲノム再編如る高病原化が口腔内で頻繁に起こっている可能性が示唆された。そこで、今回は、本菌のゲノム再編による高病原化が口腔内において普遍的に起こり得るのか、またゲノム再編のメカニズムについて調べたので報告する。

【方法および結果】国内外から分離された臨床分離株 7 株に pMU1 由来のリコンビナーゼ遺伝子を導入した。その結果、4 株にゲノム再編が見られたが、残りの 3 株では変化は認められなかった。また、ゲノム再編の見られた 4 株全てにおいて、線毛の消失に伴うコロニー形状の変化が見られ、レクチン活性、バイオフィルム形成能、溶血活性、増殖速度、サイトカイン誘導能が上昇していた。しかし、ゲノム再編が見られなかった 3 株では、これらの変化は見られなかった。したがって、ゲノム再編による高病原化がファージ感染などによって口腔内で頻繁に起こっている可能性が示唆された。また、ゲノム再編が見られた株は全てゲノム中に線状ファージ（pMU1）の配列を含んでいたことから、かつてファージ感染を受けた株が再度感染を受けることによって高病原化する可能性が示唆された。さらに、株が分離された地域性によって組換え株の検出頻度が異なっていたことから、ファージの感染が水平伝播により広がったことも示唆された。

本研究により、口腔内でのファージ感染を介した遺伝子の水平伝播により歯周病原性細菌にゲノム再編が起こり、高病原化株が出現していることが示唆された。

Eikenella corrodens, genomic recombination , phage infection

講演番号：4C25a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ C校舎25会場

歯周病原性細菌*Eikenella corrodens*の溶血因子の精製と解析

Purification and characterization of hemolytic enzyme in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*.

山本 美保子、加藤 昭夫、恵比須 繁之[1]、○阿座上 弘行（山口大・農、[1]阪大院・歯）
Mihoko Yamamoto, Akio Kato, Shigeyuki Ebisu[1], ○Hiroyuki Azakami (Yamaguchi Univ, [1]Osaka Univ)

【目的】歯周病原性細菌*Eikenella corrodens*の臨床分離株1073を羊血液寒天培地で培養したところ、コロニーの周りが透明になるβ溶血が観察された。また、本株から単離されたプラスミド上にコードされたリコンビナーゼ遺伝子を導入した株では、溶血が見られた。*E. corrodens*ではこのリコンビナーゼによるゲノム再編により、高病原化することが示唆されている。本研究では、本菌の溶血因子の解析を行い、溶血と病原性との関わりを明らかにすることを目的としている。
【方法および結果】まず、溶血活性の高い1073株を用いてリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で溶血アッセイを行ってみたが、溶血活性は見られなかった。そこで、生理食塩水でアッセイを行うと、菌体量に依存して溶血活性が見られた。PBSと同じpHのトリス緩衝生理食塩水（TBS）中で反応させても活性が見られたことから、PBS中のリン酸が溶血を阻害する可能性が示唆された。さらに、GalNAcの添加により溶血活性の低下が見られたことから、本菌の溶血活性にはGalNAc特異的レクチンが関与する可能性が示唆された。1073株、23834株、23834株にリコンビナーゼを導入した株の3株の溶血活性を測定したところ、23834株では溶血活性が見られなかったが、リコンビナーゼ導入株では高い溶血活性が見られた。このことから、リコンビナーゼによるゲノム再編によって溶血を引き起こすことが示唆された。

次に、溶血因子の精製を試みた。1073株を培養後、培養上清、細胞膜画分、細胞質画分に分け、溶血アッセイを行ったところ、細胞膜画分に活性が見られた。そこで、細胞膜画分をTriton X-100やn-octyl-β-D-glucosideで可溶化し、DEAE-Toyopearlを使って陰イオン交換クロマトグラフィーにかけた。その結果、一つのフラクションに活性が見られ、溶血因子を粗精製することができた。現在、溶血因子の同定を目指して、さらに精製を続けている。

Eikenella corrodens, hemolysin, purification

講演番号：4C25a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ C校舎25会場

歯周病原性細菌*Eikenella corrodens*のオートインデューサー２分解酵素の解析

Characterization of autoinducer 2-degrading enzyme in periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*

○Karim Minnatul、長尾 章子、加藤 昭夫、恵比須 繁之[1]、阿座上 弘行（山口大・農、[1]阪大院・歯）

○Karim Minnatul, Ayako Nagao, Akio Kato, Shigeyuki Ebisu[1], Hiroyuki Azakami (Yamaguchi Univ, [1]Osaka Univ)

【目的】歯周病原性細菌*Eikenella corrodens*のバイオフィルム形成にはオートインデューサー２(AI-2)を介したクオラムセンシングが関与する。本菌は対数増殖期の中期から後期にかけてAI-2を産生するが、定常期に入るとその産生量は著しく減少し、その後バイオフィルム形成が促進された。また、バイオフィルムを形成しない株では、定常期でのAI-2の減少は見られなかった。これらのことから、定常期特異的にAI-2を分解または不活化する因子の存在が示唆されたので、この因子の解析を行った。アシルホモセリンラクトンであるAI-1を分解するアシラーゼやラクトナーゼの報告は多くあるが、AI-2の分解に関する報告は少ない。

【方法および結果】*E. corrodens* 1073株を12時間培養後、培養上清を酢酸エチルにより抽出し、薄層クロマトグラフィー(TLC)によりAI-2を精製した。一方、18時間培養した培養上清を硫安分画し、各画分を精製したAI-2とインキュベート後、残存するAI-2活性をVibrio harveyi BB170をセンサー株として測定した。その結果、30%硫安画分の添加により精製AI-2が不活化した。また、この画分をAI-2と同様の活性を示す4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone (MHF)に添加したところ、MHFに対しても同様の不活化が見られた。このことから、*E. corrodens*が産生するAI-2もMHFも同じメカニズムで不活化されることが示唆された。また、この画分を100℃、15分間熱処理したところ、AI-2およびMHFの不活化は見られなかったことから、不活化因子はタンパク性であることが示唆された。さらに、30%硫安画分とインキュベートする前後のMHFをTLCおよび逆層HPLCで比較した。その結果、TLCではインキュベートによりMHFのバンドが薄くなっていた。また、逆層HPLCではインキュベートによりピーク位置のシフトが見られた。これらのことから、30%画分とのインキュベートによりMHFが分解されていることが示唆された。

次に、30%硫安画分からのAI-2分解酵素の精製を試みた。DEAE-Toyopearlを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより、MHFのAI-2様活性を不活化するフラクションが得られた。現在、この粗精製したフラクションをさらに精製し、AI-2分解酵素の同定を行おうとしている。

Eikenella corrodens, autoinducer, degradation

講演番号：4C25a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎25会場

黄色ブドウ球菌が産生する二成分性赤血球崩壊毒素 γ-hemolysin の Hlg2 成分の標的細胞膜結合に関与する因子の探索

Study on the factor(s) involved in the target-cell membrane binding of Hlg2 component of Staphylococcal gamma-hemolysin.

○高橋 基史[1]、毛利 彰太[1]、神尾 好是[2]、金子 淳[1]（[1]東北大院・農・生物産業創成、[2]山形大院・理工）

○Motofumi Takahashi[1], Syouta Mouri[1], Yoshiyuki Kamio[2], Jun Kaneko[1] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ., [2]Graduate School of Science and Engineering, Yamagata Univ.)

【目的】黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* は、人畜共通の常在菌である一方で、様々な日和見感染症を引き起こす病原性細菌である。本菌が産生する二成分性赤血球崩壊毒素 γ-hemolysin は、二種類のタンパク質成分である LukF と Hlg2 が赤血球膜上でリング状の7-8量体からなるβバレル型膜孔を形成し赤血球崩壊を引き起こす。α-hemolysin に代表される七量体βバレル膜孔形成毒素は病原細菌に広く存在するが、二成分を必要とするものは他に例がない。LukF と Hlg2 はそれぞれ単独では活性を持たず、Hlg2 の膜結合には LukF の初発の結合が必要である。LukF は膜脂質であるホスファチジルコリン(PC)に結合する PC binding site を持ち、比較的広範な標的細胞認識能を持つ。一方で、Hlg2 はPC binding site を欠き、PC以外の特異的な未知の細胞膜レセプターが存在すると考えられ、それが特定の細胞に対し活性を発揮するために重要であることが示唆された。本研究では、Hlg2 の標的細胞認識機構の正確な解析を進めるために、LukF の結合を介さずに Hlg2 の結合を効率化させる因子を探索した。

【方法】PBS中で各試薬によって処理した赤血球に対し、必要量の毒素成分を単独、あるいは組み合わせて添加し、37 ℃で10 分間保温した後、遠心分離して膜ゴースト画分を取得した。膜ゴーストを低張液で洗浄しSDS 化して各毒素成分に対する抗体を用いて Western blot に供することで、赤血球膜に結合した毒素を検出した。一方遠心上清の 541 nm の吸光度を測定し、遊離したヘモグロビン量を求め、低張溶血時の吸光度に対する相対溶血活性とした。

【結果】1 mM の $CaCl_2$ を含む PBS 中で A23187(calcium ionophore)処理した赤血球では、未処理の赤血球と比較して Hlg2 の結合量が著しく増加することが示された。また、この操作によってHlg2が十分結合した赤血球にLukFを添加することにより、溶血活性が確認された。このことは、これまで LukF によってのみ結合が効率化されると考えられてきた Hlg2 に対し、新たな結合促進因子が見出されたことを意味するとともに、Hlg2 が 先に結合したLukF を認識して結合しているのではなく、赤血球に存在する特異的レセプターを認識して結合しているというモデルを支持している。また、A23187 による Ca イオンの赤血球細胞内への流入が、Hlg2 の結合促進に寄与する可能性が示唆されたことから、現在、LukF による Hlg2 の結合の効率化に Ca が関わっているかどうかを判断するため、LukF 処理した赤血球内の Ca レベルの解析を進行中である

S. aureus, gamma-hemolysin, two-component pore-forming cytolytic toxin

講演番号：4C25a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎25会場

微生物由来のがん細胞傷害性タンパク質parasporin-4のマウスに対する毒性

Toxicity of parasporin-4 from *Bacillus thuringiensis* strain A1470 on mouse

○奥村 史朗、古賀 慎太郎、黒田 理恵子、古賀 浩徳[1]、井上國世[2]、水城英一（福岡県工技セ、[1]久留米大医・内科学、[2]京大院農・食品生物）

○Shiro Okumura, Shintaro Koga, Rieko Kuroda, Hironori Koga[1], Kuniyo Inouye[2], Eiichi Mizuki (Fukuoka ITC, [1]Kurume Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】*Bacillus thuringiensis* A1470株が産生するparasporin-4(PS4)はCACO-2、Sawano、MOLT-4などのヒト培養がん細胞に対して細胞傷害活性を示す一方で、ヒト正常T細胞には示さないことから、がん細胞に特異的なトキシンと考えられている。その作用機構は細胞膜に結合し細孔を形成して細胞死を誘導する穴開け型トキシンと考えられおり[1)]、がん治療薬や診断薬への応用が期待されている。PS4は31kDaの前駆体が組換え体大腸菌により封入体として産生され、この前駆体封入体を10 mMの塩酸により可溶化し、ペプシンによりプロセッシングを行うことで、27kDaの活性体となり、はじめて細胞傷害活性が発現する。*B. thuringiensis*が産生する多くのCryトキシンや他のparasporinは、酸性の溶液中では凝集して失活するが、PS4は酸性でも安定してその細胞傷害活性が維持されることから、PS4を哺乳動物に経口投与すると、その消化器内で可溶化・活性化されることが予想される。今後、PS4活性体の注射やPS4前駆体封入体の経口投与によるがん抑制試験を行う予定であるが、実験条件を決定するためにPS4のマウスに対する急性毒性を測定した。また、PS4投与時のマウス死亡の原因について検討を行った。

【方法】６週齢の雄のICRマウスに、湿重量で60 mgのPS4前駆体封入体を蒸留水に分散して経口投与し、糞をウエスタンブロットにかけて、消化管におけるPS4の可溶化・活性化を解析するとともに、その時のマウスの健康状態を観察した。また、PS4活性体をICRマウスの腹腔内へ投与して、48時間以内での死亡によるLD_{50}を測定した。PS4活性体を腹腔内投与されたマウスについては、通常より色の薄い尿を多量に排出する様子が観察されたことから、マウスに10 μgのPS4活性体を投与し、PS4投与後の尿及び血液を経時的に採取して、腎機能の指標であるクレアチニンおよび尿素窒素濃度とNa^+、K^+、NH_4^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}イオン濃度を測定した。

【結果】PS4前駆体封入体を経口投与した場合、投与後4時間から12時間の間に、PS4活性体の単量体、PS4の多量体およびPS4のペプチド断片がその糞から検出されたが、PS4前駆体の単量体は検出されず、マウス消化管中でPS4が可溶化・活性化されていることが確認できた。また、PS4前駆体の経口投与による健康状態の異常は見られなかった。マウスにPS4活性体を腹腔内投与した時のLD_{50}は290 μg/kgだった。PS4活性体投与後にはマウスの尿中のナトリウム以外の陽イオン濃度の低下が見られた。さらに、クレアチニンおよび尿素窒素濃度については、投与直後から尿中にはほとんど排出されなくなり、血清中の濃度が次第に増加していったことから、PS4活性体によりなんらかの腎障害が発生し、マウスが死に至ったものと推察された。

1) Shiro Okumura *et al.*, Biochim Biophys Acta. 1808(6), 1476-82 (2011)

parasporin, *Bacillus thuringiensis*, toxicity

講演番号：4C25a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎25会場

糸状菌のC末端脂質付加共通配列を欠く低分子量G-タンパク質

Fungal small G-protein which lacks C-terminal lipidation consensus

○笠原 紳，高橋 拓也，山内 優輝（宮城大・食産業）
○Shin Kasahara, Takuya Takahashi, Yuki Yamauchi (Miyagi Univ.)

クリ胴枯病（chestnut blight）は世界三大植物病の一つとして有名で，特に米国アパラチア地方で極めて優勢であった野生のクリ（American chestnut）を半世紀の間に事実上全滅させるほどの被害をもたらした。その原因糸状菌 *Cryphonectria parasitica*（*Endothia parasitica*）は，かつてわが国でも酸性プロテアーゼ生産菌としてさかんに研究され，米国へは 1900 年頃に貨物等に付着して移入されて以降，急速に山間部へと広まり森林の植生破壊を引き起こしたとされる。特に，当時わが国から米国に輸出された貨物やクリ苗木が感染源となったといわれている。現在，*C. parasitica* のゲノム解析はほぼ終了しており，さまざまな角度から同菌の植物への病徴発現メカニズムの解析および制御方法が検討されている。また，菌類ウイルス（ハイポウイルス）によるバイオコントロールの対象としても研究が進められている。

C. parasitica の Ras 関連タンパク質については，すでに RAS1，RAS2 が確認され，遺伝子破壊株の作出等による機能推定がなされているが，本研究では新たに見出された RAS3 について解析を加えた。RAS3 は他の Ras 関連タンパク質にほぼ共通して認められる C 末端領域のファルネシル化部位（CAAX box）を欠くことが大きな特徴で，その点で動物の Rin および Rit との共通性が認められた。RAS3 をコードする遺伝子 *ras3* の破壊が菌糸成長や分生子形成，病原性に及ぼす影響を検討したところ，*ras2* の破壊と同様，緩やかな成育阻害と分生子形成の抑制が認められ，病原性は大きく低下していた。菌糸成長の点では，顕著な障害を示す *ras1* の破壊株とは異なっていた。*ras3* を *gpd-1* プロモーター支配下に置き過剰発現させた株では，菌糸成長への影響は認められなかったものの黄褐色の色素を欠き，分生子形成も大きく抑制されていた。RAS3 を GFP と融合発現させてその局在について観察したところ，細胞表層（細胞膜上）に蛍光が認められた。C 末端 32 アミノ酸を欠失した RAS3 はこの局在を示さず，細胞内部全体に分散して蛍光が認められた。このことから，C 末端 32 アミノ酸もしくはその近傍の領域が膜結合に関与している可能性が示された。また，RAS3 および C 末端 32 アミノ酸を欠く RAS3 を大腸菌中で発現させ，その精製タンパク質の GTP 結合能や GTP アーゼ活性等の生化学的性質を検討した。さらに，RAS3 および RAS1，RAS2 について，シグナル伝達経路における下流因子について考察した。

filamentous fungus, signal transduction, small G-protein

講演番号：4C25a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ C校舎25会場

*Photorhabdus luminescens*の発光誘導における陽イオンおよび陰イオンの影響

Effect of cations and anions on the induction of luminescence in *Photorhabdus luminescens*

○小川 あかね[1]、惠良 真理子[2]、二宮 純子[2]、田部井 陽介[2]、森田 洋[2]
([1]北九大院・国際環境工、[2]北九大・国際環境工)
○[1]Akane Ogawa, [2]Mariko Era, [2]Junko Ninomiya, [2]Yosuke Tabei, [2]Hiroshi Morita
([1]Grad. Sch. Fac. Env. Eng. Kitakyusyu. Univ, [2]Fac. Env. Eng. Kitakyusyu. Univ)

【目的】微生物発光は細胞密度の増加とともに発光量の上昇が引き起こされ、微生物自身が分泌するAutoinducerを産生・蓄積することにより発光誘導することから、Quorum Sensingによって制御されていることが知られている。この細胞密度に依存した発光誘導のメカニズムは、発光性の高さから海洋性の発光バクテリアである*Vibrio fischeri*や*V. harveyi*において多くの研究が行われ、明らかにされてきた。また、Microtox®などに代表されるように、これらの海洋性発光バクテリアは飲料水、廃水、河川水などの毒性を迅速簡便に測定するシステムに利用されている。しかし、生育に3 %程度のNaClを必要とすることや、生育pH範囲が狭いことなどが問題点となっている。一方、生育にNaClを必要としない淡水性の発光バクテリアである*Photorhabdus luminescens*は、発光誘導メカニズムに関する研究がほとんど行われていないのが現状である。そこで本研究では、*P. luminescens*おける陽イオンおよび陰イオンに対する発光量との関係性を明らかにすることを目的とした。
【方法】供試菌として*P. luminescens* ATCC 29999を使用した。発光増強因子の解明では、無機塩類5種類（KCl：0.77 g/L、$CaCl_2$：1.21 g/L、$NaHCO_3$：0.11 g/L、$MgCl_2$・$6H_2O$：4.8 g/L、$MgSO_4$・$7H_2O$：3.5 g/L）をそれぞれ添加した培地（inorganic salts solution:ISS）を用い、30 ℃、70 rpm、18 h培養を行った。また、Nutrient broth（NB）培地により、同様の条件で培養したものと比較を行った。発光量はルミノメータを用いて評価を行い、5 min間の積算値で1 mL中の発光量を測定した。さらに陽イオンおよび陰イオンによる発光増強因子を明らかにするため、ISS中の無機塩類を様々なイオン化合物と置換して、同様に発光量を測定した。
【結果】培地中の無機塩類が発光量に与える影響を検討したところ、富栄養条件下（NB培地）では菌体量の増加とともに高い発光性を示したのに対し、栄養欠乏条件下（ISS培地）では、菌体量がほとんど増加しないにもかかわらず、高い発光性を有していた。このことから、細胞密度に依存しない発光を調節する因子の存在が示唆された。この因子を探索するために、ISS培地から1種類の無機塩類を除いて発光量を測定した結果、KCl、$NaHCO_3$、$MgCl_2$の欠乏で発光量が低下した。次に、ISS培地から2種類の無機塩類を除いた結果では、KCl、$NaHCO_3$、$MgCl_2$を添加した場合において5種類の無機塩類を添加した培地と同程度の高い発光量を示した。さらなる発光増強因子を明らかにするために、様々なイオン化合物と置換して発光量を測定した結果、K^+、Mg^{2+}、HCO_3^-において発光を誘導する効果があることが示唆された。

Photorhabdus luminescens, luminescence, inorganic salts

講演番号：4C25a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ C校舎25会場

フィブロインを固定化担体とした *Vibrio fischeri* の発光性

Luminescence of immobilized *Vibrio fischeri* on fibroin film

○二宮　純子、惠良　真理子、小川　あかね、田部井　陽介、森田　洋
（北九大・国際環境工）
○Junko NINOMIYA, Mariko ERA, Akane OGAWA, Yosuke TABEI and Hiroshi MORITA
(Faculty of Environment Engineering, Kitakyushu University)

【目的】

海洋性発光細菌の一種である *Vibrio fischeri* は、その特徴から Microtox®などの迅速簡便なバイオアッセイに広く利用されている。これまでの研究により、*V. fischeri* の発光性に硫黄源要求性が認められ、硫酸、亜硫酸、チオ硫酸化合物や含硫アミノ酸であるシステインでも細胞密度非依存的に発光が誘導されることがこれまでに明らかとなっている。*V. fischeri* の細胞密度非依存型発光に硫黄源が関与することを用いることで、発光バクテリアへの高い発光性の付与が可能となる。

そこで本研究では、蚕繭のタンパク質成分の一種であるフィブロインがバイオフィルム形成に至る過程のコンディショニングフィルムとして有用であることを着目し、硫黄源のフィブロイン膜に複合化を試みた。この硫黄源複合化フィブロイン膜上に *V. fischeri* を固定化し、その固定化能及び発光性について検討を行った。

【方法】

蚕繭からフィブロインを抽出し、$CaCl_2$ 溶液中で加水分解することによりフィブロイン溶液を得た。このフィブロイン溶液に終濃度 0.2%のグリセロールを添加し、30 ℃、70 %RH の条件下で乾燥させることにより、不溶化フィブロイン膜を作成した。またフィブロイン膜に硫黄源を添加することにより、*V. fischeri* の発光性増大について評価を行った。

使用菌株 *V. fischeri* ATCC 49387 は、温度 22℃で培養し、フィブロイン膜への固定を行った。*V. fischeri* の固定にはフィブロイン膜を接着させたガラスチューブを用いた。一定時間経過後、フィブロイン膜に付着していない *V. fischeri* の洗浄除去を行い、フィブロイン膜への固定、及び発光の評価を行った。膜への固定の評価には SEM 観察を行い、発光の評価にはルミノメータを用いた。

【結果】

V. ficheri はフィブロイン膜単体に対して短時間で高い付着性を示し、SEM 観察においても高い付着が確認された。また、フィブロイン膜に固定された *V. fischeri* の発光についてルミノメータを用いて測定したところ、高い発光性が認められた。また、この付着性及び発光性は細胞増殖の後期になるほど高くなる傾向を示した。

Keyword: luminescence, *Vibrio fischeri*, fibroin

講演番号：4C25a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ C校舎25会場

Vibrio fischeri を利用した毒性評価試験

Toxicity testing method using *Vibrio fischeri*

○惠良 真理子、田部井 陽介、小川 あかね[1]、二宮 純子、森田 洋
（北九大・国際環境工、[1]北九大院・国際環境工）
○Mariko Era, Yosuke Tabei, Akane Ogawa[1], Junko Ninomiya, Hiroshi Morita
(Fac. Env. Eng. Kitakyushu. Univ, [1]Grad. Sch. fac. Eng. Kitakyusyu. Univ)

【目的】

海洋性発光細菌の一種である *Vibrio fischeri* は、その特徴から環境計測センサー、毒物センサーとしての応用・研究が行われている。これまで、有機汚泥物質の指標として、生物化学的酸素消費量(BOD)や化学的酸素要求量(COD) などが一般的に用いられているが、BOD値に関しては公定法によって結果を得るまでに5日間を要することから、より簡易的かつ迅速な手法の確立が望まれている。

そこで本研究では高い微生物付着能を有するフィブロイン膜に *V. fischeri* (ATCC 49387) を固定化し、BODや重金属類の濃度変化と発光量との関係を調べることによって、発光細菌の *V. fischeri*を用いたバイオセンシング技術の構築を目的として実験を行った。

【方法】

使用菌株 *V. fischeri* は、温度22℃ で培養し、不溶化フィブロイン膜に固定化を行った。一定時間経過後、不溶化フィブロイン膜に固定化していない菌体の洗浄除去を行いフィブロイン固定化 *V. fischeri* チューブを作成した。BODの模擬排水としてOECD テストガイドラインの人口排水を用いた。BOD値はBOD_5 公定法のGGA（glucose and glutamic acid）溶液を滴下し検量線を作成した。毒性評価は模擬排水または重金属溶液を、チューブに滴下し一定時間放置した後、発光量の減少をルミノメータにより評価した。

【結果】

毒性評価では主としてニッケルや鉄、銅、水銀などの重金属に対して評価を行ったところ、水銀に対して比較的感度が高く、0.25ppm でも発光の低下を確認することが出来た。また、有機水銀（塩化メチル水銀）でも水銀と同様に0.25ppmでも発光の消光を確認することが出来た。BOD 測定はBOD_5 公定法のGGA溶液を用いて発光の減少を評価し、検量線を作成した。都市下水のBOD汚染濃度の150～300ppm でも発光の減少を確認することが出来た。今回の結果より、都市下水程度の汚染濃度は検出可能であることが示唆された。現在、有害性を判断するのにバイオアッセイ（生物検定）が注目されていることからも、今後、水環境のスクリーニングとして本センサーは役立つのではないかと示唆される。

Keyword: *Vibrio fischeri*, luminescence, toxicity,

講演番号：4C25a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ C校舎25会場

希少放線菌*Actinoplanes missouriensis* の運動性胞子におけるエネルギー代謝の解析

Analysis of energy metabolism in *Actinoplanes missouriensis* motile spore

○乙供 かな依、斎藤 菜摘[1]、曽我 朋義[1]、藤田 信之[2]、早川 正幸[3]、大西 康夫（東大院農生科・応生工、[1]慶大・先端生命研、[2]NITE・NBRC、[3]山梨大・工）

○Kanae Otsutomo, Natsumi Saito[1], Tomoyoshi Soga[1], Nobuyuki Fujita[2], Masayuki Hayakawa[3], Yasuo Ohnishi (Tokyo Univ., [1]Keio Univ., [2]NITE・NBRC, [3]Yamanashi Univ.)

【目的】

Actinoplanes missouriensis は、栄養飢餓状態に陥ると短い胞子嚢柄を介して基底菌糸上に着生する胞子嚢中に多数の胞子を形成する。湿潤した環境におかれると胞子嚢外皮が破れ、べん毛をもった運動性胞子が泳ぎ出す。運動性胞子は栄養源を含まない緩衝液中で一定時間運動を続けるため、運動に必要なエネルギー源を胞子内に貯蔵していると考えられる。胞子の運動性に寄与するエネルギー代謝を解明し貯蔵物質を同定することを目的として、研究を行った。

【方法・結果】

キャピラリー電気泳動－飛行時間型質量分析装置(CE-TOFMS)を用いて運動性胞子のメタボローム解析を行ったところ、グルコース1リン酸以降の解糖系中間体濃度変化から、運動性胞子はグルコースを単位とした多糖をエネルギー源としていることが強く示唆された。ゲノム情報から、*A. missouriensis*はグリコーゲン-トレハロース代謝に関する一連の遺伝子を持つことが分かり、関連遺伝子の転写解析から胞子嚢形成時期にグリコーゲンがトレハロース経由で合成、貯蔵されると考えられた。また、トレハロースは胞子と菌糸で同程度、グリコーゲンは菌糸よりも胞子に多く含まれることがわかった。

そこで、グリコーゲン、トレハロースの合成に関わる遺伝子、*AMIS10890*、*AMIS14460*（両者ともtrehalose 6-phosphate synthaseをコード）、*AMIS52000*（glucose 1-phosphate adenylyltransferaseをコード）の三重破壊株、すなわちこれらの糖類の合成能をもたないと予想される株を作製した。三重破壊株の胞子内の糖量は現在測定中だが、胞子の運動持続性を顕微鏡観察したところ、予想に反して野生株と同程度であった。一方、三重破壊株では胞子嚢形成頻度が低下するとともに、グルコースをC源とした培地において生育不良が見られた。

三重破壊株ではエネルギー貯蔵に関する代謝系に何らかの変化が起こっていると考えられるため、現在、三重破壊株の運動性胞子のメタボローム解析を行っている。

motile spore, metabolome, glycogen

講演番号：4C25a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ C校舎25会場

希少放線菌*Actinoplanes missouriensis*のBldDホモログの機能解析

Functional analysis of the BldD homolog in *Actinoplanes missouriensis*

○小西 健司、藤田 信之[1]、早川 正幸[2]、大西 康夫（東大院農生科・応生工、[1]NITE・NBRC、[2]山梨大・工）

○Kenji Konishi, Nobuyuki Fujita[1], Masayuki Hayakawa[2], Yasuo Ohnishi (Tokyo Univ., [1]NITE・NBRC, [2]Yamanashi Univ.)

【背景・目的】希少放線菌 *A. missouriensis* は多数の胞子を内包した胞子嚢を、短い胞子嚢柄を介して基底菌糸上に形成する。湿潤した環境におかれると胞子嚢外皮が破れ、べん毛をもった運動性胞子が泳ぎ出す。運動性胞子はその走化性により、生育に適した場所まで移動した後、出芽して菌糸状の生育を始める。我々の研究グループは、このような複雑な生活環の背後にある未知の分子機構に興味をもち、さまざまな角度から *A. missouriensis* の分子遺伝学的研究を展開してきた。その 1 つとして、胞子の休眠・運動性・出芽に関する分子遺伝学的な知見を得ることを目的に、運動性胞子と出芽胞子のプロテオーム解析を行い、それぞれに特異的なタンパク質を同定した（日本農芸化学会 2010 年度大会講演要旨集 p. 79）。今回、出芽胞子に特異的なタンパク質（出芽に伴って生産量が増大するタンパク質）の 1 つとして見出された BldD ホモログ（AMIS62190）の機能解析を行ったので発表する。BldD はモデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の気中菌糸形成に必須なグローバルレギュレーターであり、15 塩基からなる BldD box と呼ばれる配列に結合する。BldD は栄養増殖時において形態分化に必要な鍵制御遺伝子の転写を抑制し、不適切な生育段階での形態分化を抑制していると考えられている。

【方法・結果】S1 ヌクレアーゼマッピング法により、*AMIS62190* は菌糸成長中に多く発現していることが示された。また、5'-RACE 法により *AMIS62190* の転写開始点は、翻訳開始点より 56 塩基上流の G であることが示された。*S. coelicolor* では *bldD* のプロモーター領域に BldD box が存在するが、*AMIS62190* のプロモーター領域にも BldD box 様配列が見出された。そこで、大腸菌で生産した組換え AMIS62190 タンパク質を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、AMIS62190 は自身のプロモーターを含む DNA 断片に結合することが明らかになった。また、DNaseI footprint 法により、BldD box 様配列に AMIS62190 が結合することを確認した。一方、形態分化への関与を調べるため、in-flame deletion により *AMIS62190* 破壊株を作製し、その表現型を観察した。胞子嚢形成のための貧栄養寒天培地において、*AMIS62190* 破壊株では野生株より早い時期に胞子嚢形成が始まり、過剰な数の胞子嚢が形成された。また、野生株では胞子嚢が形成されない富栄養寒天培地においても、胞子嚢の形成が観察された。なお、*AMIS62190* 破壊株の胞子嚢はいびつな形状で成熟が不完全なものが多かった。これは胞子嚢形成が不適切なタイミングで行われ、正常な成熟過程が進行していないためであると思われた。以上の結果により、*Streptomyces* とは系統的に離れた希少放線菌である *A. missouriensis* においても、BldD ホモログ（*S. coelicolor* の BldD とアミノ酸配列で67%の相同性）は不適切な生育段階での形態分化を抑制する転写制御因子として機能していることが強く示唆された。

Keywords: *Actinoplanes missouriensis*, BldD, morphological differentiation

講演番号:4C25a12
講演日時、会場:3月25日11:21～ C校舎25会場

ギンネム土壌由来*Erwinia*属ミモシン資化性菌がもつミモシン分解酵素の精製とクローニング

Purification and cloning of mimosine degradation enzyme from *Erwinia* sp. bacteria.

○上原　小亜季、北村　真、福田　雅一、多和田　眞吉（琉球大農・生資科）
○Koaki Uehara, Makoto Kitamura, Masakazu Fukuta, Shinkichi Tawata (Ryukyudai)

【目的】ギンネムは、中央アメリカ原産の熱帯亜熱帯性マメ科植物で、非タンパク質毒性アミノ酸ミモシンを合成する。ミモシンは、金属キレート作用によってDNA合成や細胞周期の進行に関わるタンパク質の活性や発現に影響を与えることにより、他生物へのアレロパシー作用を示す。しかし、ミモシンを有すギンネム群生地には、ミモシンを酵素によって分解し、窒素・炭素源として利用しているミモシン資化性菌が存在する。ミモシン資化性菌は多様であり、資化性菌間でこの遺伝子獲得の進化的経緯を考察する上でも、様々な資化性菌の酵素遺伝子との比較研究が必要である。そこで本研究では、ギンネム群生土壌より単離された*Erwinia*属ミモシン資化性菌がもつミモシン分解酵素遺伝子のクローニングを行うため、酵素精製を試みた。

【方法】*Erwinia*属ミモシン資化性菌をミモシン含有液体培地で培養後、超音波破砕によって粗酵素を抽出し、さらにイオン交換クロマトグラフィー、HPLC、Native-PAGEによって酵素の精製を行った。クロマトグラフィーの担体にはそれぞれ、Q-SepharoseとHi Trap Q HPを使用した。酵素活性は、ピルビン酸比色定量法によって測定した。酵素の分子量は、SDS-PAGEによって推定した。

【結果】SDS-PAGE上から推定される分子量は、約33kDaだった。

mimosine, *Leucaena leucocephala*, *Erwinia* sp.bacteria

講演番号：4C25a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ C校舎25会場

ユーグレナ由来パラミロン誘導体の保湿剤への応用

Moisturizing efficacy of paramylon derived from *Euglena gracilis*.

○藤田　幸子、田中　清隆、高山　悟、アルナシリ　イダマルゴダ（一丸ファルコス・開発部）
○Yukiko Fujita, Kiyotaka Tanaka, Ssatoru Takayama, Arunasiri Iddamalgoda (Ichimaru Pharcos,)

【目的】ミドリムシは、ユーグレナ植物門ユーグレナ藻綱ユーグレナ目に属する鞭毛虫の仲間であり、ユーグレナとも呼ばれる。ミドリムシは、鞭毛運動をする動物的性質をもちながら、同時に植物として葉緑体を持ち光合成を行う為、動物と植物のどちらにも分類される。類縁種としておよそ40属1000種が知られており、主に富栄養条件の淡水域に分布し、水田や水たまりに普通に見られる。大部分のユーグレナ藻は葉緑体を持っており、光合成を行って独立栄養生活を営むが、捕食性のものや吸収栄養性の種もある。光合成色素としてクロロフィルa、bを持ち、その他カロテノイドやキサントフィルを含んでいる。このため近年では、高い栄養性が注目され食品としての応用もされている。

ユーグレナは、光合成や吸収栄養源をもとに貯蔵物質としてβ-1,3-グルカンの顆粒をつくり、これはパラミロンと呼ばれる。パラミロンはβ－１，３-グルカンのみからなる高密度硬化顆粒であり、グルコースのみから構成され、さらに分岐鎖をもたない完全直鎖を基本骨格としている。単一な構成糖、直鎖構造という点で、酵母やキノコ類で生産されるβ－１，３-グルカンとは異なる。

パラミロンは、熱、物理的破壊などに強いという特徴を有する。よって、パラミロン（β－１，３-グルカン集塊）としての純度および安定性は非常に優れてる。今回、我々はこのユーグレナから得られるパラミロンを化学修飾により可溶化し、高純度な皮膚外用保湿剤を開発した。

【方法および結果】ユーグレナより抽出精製したパラミロン末をアルカリ条件下でモノクロロ酢酸ナトリウムと反応させ、カルボキシメチル基を付与した。これにより水に不溶であったパラミロン末が水溶性となり、高純度の水溶液を得ることができた。得られた水溶液は、無色透明で適度な粘度をもち、かつ非常に熱安定性に優れていた。

得られたカルボキシメチルβ－１，３-グルカンは、皮膜性を有するため皮膜の吸放湿性を調べた。室温20℃、湿度65％条件下で皮膜を安定化させた後、室温20℃、湿度65％条件へと変化させた。このとき、重量あたり40％の水分吸収が認められた。その後、再び室温20℃、湿度65％条件下で1時間放置したとき、試験開始時と同等まで水分の放出が認められた。この結果は、化粧品外用に多く使用されるヒアルロン酸ナトリウムと同等の吸放湿性であった。また、同素材を培養皮膚細胞に投与したときの効果を調べた。培養線維芽細胞にカルボキシメチルβ－１，３-グルカンを20ug/mlとなるよう投与したとき、約50％のヒアルロン酸増加を認めた。

このことから、カルボキシメチルβ－１，３-グルカンは皮膚表面の保護による保湿効果と、皮膚内保湿成分のひとつであるヒアルロン酸を生み出す効果により、優れた化粧品素材として有用であることが示唆された。

Euglena, paramylon, moisturizer

講演番号：4C25a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ C校舎25会場

油脂（triacylglycerol）を分泌する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 変異株の解析

Characterization of triacylglycerol-secreting mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*

○秦野 琢之、藤井 清隆、池本 ひとみ、松崎 浩明（福山大生命工・生物工）
○Takushi Hatano, Kiyotaka Fujii, Hitomi Ikemoto, Hiroaki Matsuzaki (Fukuyama Univ.)

【目的】現在までに報告されている油脂生産微生物のほとんどは、産物油脂を菌体内に蓄積する。そのため細胞内で油脂が飽和すると、それ以上は生産できない。我々は、油脂を分泌発酵法で生産する技術の開発を目指し、油脂を細胞外へ分泌生産する微生物の育種を行ってきた。これまでに2種の酵母（野生酵母 *Trichosporon* sp. および実験室酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ）のtriacylglcerol（TG）分泌変異株を取得し、これらを材料として、TGの細胞外排出機構の解析を進めてきた。今回は *S. cerevisiae* 変異株で得られた知見について報告する。

【方法・結果】*S. cerevisiae* のSTG1変異株は、グルコース培地で生産したTGを菌体外に漏出する。細胞外へのTGの蓄積は、STG1株の細胞内に大腸菌β－ガラクトシダーゼを生産させた形質転換体の細胞外（培地中）に当該酵素活性が検出されなかったことより、溶菌ではなく分泌によるものであると考えている。STG1株のTG分泌（$Halo^+$；TG分泌コロニー周囲での不飽和脂肪酸要求性テスター株のマイクロコロニー形成）形質は１遺伝子変異に由来（四分子解析）し、野生型遺伝子により相補される。また本変異株は強い細胞凝集性を示すため、種々の処理や *Flo* 遺伝子の破壊を試みたが、凝集解除には至らなかった。この細胞凝集性は遺伝子クローニングの妨げとなり、TG分泌を相補する遺伝子のクローニングは進展していなかった。そこで変異遺伝子を特定するため、Yeast-Knock-Out collection（YKO、約4800株）よりTG分泌の表現型（$Halo^+$）を示す株をスクリーニングした。得られた候補株について、STG1株との交配試験ならびに菌体外TGの検出を行った。その結果、*SPC72* 遺伝子がTG分泌抑制に関与していることが強く示唆された。さらに親株（YP1）の *SPC72* を破壊した（YP1/*SPC72*Δ）ところ、菌体外にTGが検出されるようになった。また親株の *SPC72* をSTG1株に導入したところ、TG分泌は抑制された。一方、*spc72* 株は、細胞内の油滴形成に異常を生じることが明らかとなった。Spc72pは622アミノ酸で構成されcoiled-coil構造を有し、SPBのouter plaqueに局在する。その機能として、細胞質微小管や星状体微小管の形成・安定に関わることが示されている。*S. cerevisiae* における *SPC72* の変異がTG分泌にどのように関与するかについて、今後解析を進める。

triacylglycerol, secretion, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：4C25a15
講演日時、会場：3月25日11:54～ C校舎25会場

ゴエモンコシオリエビと外部共生するεプロテオバクテリアの化学独立栄養生産性の細胞特異的検出

The cell-specific thioautotrophic productivity of epsilon-proteobacterial epibionts associated with *Shinkaia crosnieri*

○和辻智郎[1]，西澤学[1]，諸野祐樹[1]，平山仙子[1]，佐野有司[2]，高畑直人[2]，高井研[1]（[1]海洋研究開発機構，[2]東大・大気海洋研）

○Tomo-o Watsuji[1], Manabu Nishizawa[1], Yuki Morono[1], Hisako Hirayama[1], Naoto Takahata[2], Yuji Sano[2] and Ken Takai[1] ([1]JAMSTEC, The University of Tokyo)

【目的】

深海熱水噴出孔の周りに群がる無脊椎動物の中には体の一部に細菌を高密度に付着させたものが見られ、細菌-動物間の外部共生が成り立っている。沖縄の深海熱水噴出域に生息するゴエモンコシオリエビは自身の体毛に細菌を付着させているだけではなく、その細菌をエサとして食べて生活することが知られる唯一の深海動物である。熱水噴出孔から噴き出す熱水には硫化水素などの還元的な硫化物が含まれているが、ゴエモンコシオリエビに付着する外部共生菌相にはその硫化物を利用して生育する独立栄養性の硫黄酸化細菌が存在する。また、深海熱水噴出域において外部共生が成り立つ無脊椎動物の細菌相には共通して、εプロテオバクテリアに属し、繊維状の形状をした*Sulfurovum*が優占的に存在している。本研究では、ゴエモンコシオリエビの外部共生細菌相においても優占種である*Sulfurovum*が独立栄養性の硫黄酸化細菌であることを明らかにすることを目的とした。

【方法】

捕獲したゴエモンコシオリエビから切断した体毛に、^{13}Cで標識された炭酸水素塩とチオ硫酸塩を与えたトレーサー実験を船上で行い、外部共生細菌相中の独立栄養性の硫黄酸化細菌を標識した。48時間のインキュベーション後、4%パラフォルムアルデヒドで固定し、50%エタノール溶液で保存した。体毛上に存在する独立栄養性の硫黄酸化細菌と優占種の*Sulfurovum*が一致するかを調べるため、*Sulfurovum*の16S rRNA遺伝子の配列情報から作製した特異的なプローブを用いたfluorescence *in situ* hybridization (FISH)とnano-scale secondary ion mass spectrometry (Nano-SIMS)解析を組み合わせた実験を行った。

【結果】

FISHとNano-SIMS解析の組み合わせにより、チオ硫酸の添加によって炭素13を4000倍に濃縮する*Sulfurovum*が検出されたことから、ゴエモンコシオリエビの外部共生細菌相に独立栄養性の硫黄酸化を行う*Sulfurovum*が含まれることが実証された。外部共生細菌相で優占化する*Sulfurovum*が熱水から供給される還元的な硫化物を利用して生育する独立栄養性の硫黄酸化細菌であることが明らかとなったことで、*Sulfurovum*が栄養源として宿主を支える中心的な役割を担うことが強く示唆された。

FISH, Nano-SIMS, symbiosis

講演番号：4C26a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ C校舎26会場

トコトリエノールの組織への取り込みと消失に及ぼすα－トコフェロールの影響

α-Tocopherol inhibits tissue uptake of tocotrienol but not its degradation in rats

野村 早、内田 友乃、○池田 彩子（名古屋学芸大・管理栄養）
Saki Nomura, Tomono Uchida, ○Saiko Ikeda (NUAS)

【目的】 α－トコトリエノール(αT3)をラットに摂取させたときの組織中のαT3濃度は、α－トコフェロール(αT)の同時摂取によって低下することが知られている[1)]。本研究では、ラットにトコトリエノール(T3)を摂取させた後のT3の組織への取り込みと消失の程度を組織間で比較するとともに、T3の組織貯留性に及ぼすαTの影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】実験1：経口摂取させたT3の組織への取り込みについて検討した。αT3およびγ－トコトリエノール(γT3)を含む試験溶液をラットに強制的に経口投与し、0、8、24時間後に屠殺した。また、αTを同時に投与した場合の影響についても調べた。

実験2：組織のT3レベルは、取り込みと消失のバランスによって決まると考えられる。そこで、組織からのT3の消失について検討した。ビタミンEとしてαT、αT3、γT3を添加した飼料でラットを6週間予備飼育することによって、ラット体内にビタミンEを十分に蓄積させた。その後、飼料をビタミンE無添加飼料に交換して、さらに0、1、2、3、4週間ラットを飼育した。

実験3：次に、組織からのT3の消失にαT摂取の有無が影響するかどうかを調べた。ビタミンEとしてαT3とγT3を添加した飼料でラットを4週間予備飼育した。その後、飼料をビタミンE無添加飼料またはαT添加飼料に交換して、さらに0、1、2、4週間飼育した。

【結果】実験1：試験溶液を経口投与して8時間後のαT3濃度は、副腎で270 nmol/gと最も高かったのに対し、腎周囲脂肪で3.5 nmol/g、精巣上体脂肪で1.9 nmol/gであり、脂肪組織のαT3濃度は非常に低かった。また、ほとんどの組織のαT3濃度は、αTの同時投与により低下した。

実験2：肝臓と心臓のαT3濃度は、ビタミンE無添加飼料を摂取させて1週間後にはそれぞれ59%と34%に低下した。ところが、脂肪組織のαT3濃度は、ビタミンE無添加飼料を4週間摂取させてもまったく低下しなかった。この脂肪組織でのビタミンEレベルの維持は、αTやγT3についても観察され、脂肪組織はビタミンEを消失しにくい組織であることが明らかになった。

実験3：脂肪組織や心臓のαT3とγT3濃度は、αT摂取によってまったく影響を受けなかった。

以上の結果から、T3を長期間摂取したときの脂肪組織におけるT3の蓄積は、その高いビタミンE保持能によってT3が少しずつ蓄積した結果であることが推察された。また、αTはT3摂取後の組織への取り込みを抑制するが、組織中にいったん取り込んだT3の消失には影響しないことが明らかになった。

1) Ikeda et al. J Nutr 133: 428–434 (2003)

tocopherol, tocotrienol, vitamin E

講演番号：4C26a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ C校舎26会場

米ぬか給与鶏の可食部におけるビタミンEの分布

Vitamin E distribution in chickens fed with rice bran

○木村俊之、山岸賢治、大矢浩司[1]、泉田和子[1]（農研機構 東北農研、[1]福島県農総セ 畜産研）
○Toshiyuki Kimura, Kenji Yamagishi, Koji Oya[1], Kazuko Izumida[1](NARO Tohoku Agricultural Research Center, [1]Fukushima Agricultural Technology Centre)

【目的】トウモロコシなどの穀物価格の上昇により、供給、価格が安定している国産の飼料米、米ぬか等を添加した飼料の開発が望まれている。これまでも飼料への米ぬか配合は行われてきたものの、鶏に米ぬか給餌したのみでは訴求性に乏しく大きく普及するには至っていない。一方、米ぬかは注目の機能性成分であるトコトリエノール（T3）を豊富に含み、T3はビタミンEの一種で強い抗酸化性、コレステロール抑制効果が報告されている。このため、米ぬかを給与した鶏肉がT3を高含有すれば、品質の面から消費者にアピールすることが可能である。本発表では、米ぬかを給餌した鶏肉の可食部位へのT3の移行・蓄積とその品質について検討を行ったので、報告する。

【方法】（１）米ぬか無しの通常ブロイラー肥育飼料（慣行区）、ブロイラー肥育飼料に米ぬか10%配合した飼料（米ぬか 10%区）、米ぬか 30%配合飼料（米ぬか 30%区）を調製した。鶏（会津地鶏）1 群 40 羽とし 28 日齢より各飼料に切り替え平飼い（40 羽/7.8 ㎡）した。出荷時期(130日)まで肥育した後、各群より 20 羽を抽出し、17 時間絶食後に屠殺し、血液、組織（ムネ、モモ、ササミ、皮、心臓、肝臓、砂のう、内臓脂肪）を採取した。（２）組織中のビタミン E（T3およびトコフェロール）量を定量した。（３）強制酸化前後の TBARS 値測定により酸化抵抗性を評価した。（４）血液生化学分析（総蛋白、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、γ-GTP、AST、ALT など）による鶏の健康状態の評価を行った。（５）官能試験（調理法：スープ、ゆで肉）により肉の食味性の評価を行った。

【結果】（１）飼育期間中、死亡、病気は無かった。米ぬか30%区では生体重、飼料摂取量に減少が見られた。採取された組織重量に群間差は無く、組織の目視観察では異常は認められなかった。（２）各組織のビタミンE（T3とトコフェロール）を定量した結果、試料中の米糠配合の割合に依存し組織中のT3含量が増加した。また、内臓脂肪、皮、心臓に顕著にT3の移行が認められた。（３）各組織の過酸化物価（TBARS値）は心臓、肝臓が高かったが、群間差は認められなかった。酸化抵抗性は皮のみにビタミンEとの相関がみられ、特に米ぬか30%区ではトコトリエノール含量との相関（R^2 = 0.5844）が認められた。（４）血液生化学分析の結果、対照群（慣行区）に対する群間差は認められなかった。（５）官能試験の結果、対照群（慣行区）に対する群間差は認められなかった。

Tocotrienol, rice bran, distribution

講演番号：4C26a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ C校舎26会場

ビタミンK欠乏食給餌がKK-Ayマウスの糖代謝に及ぼす影響

The effect of vitamin K deficient diet on glucose metabolism in KK-Ay mice

○平原　啓甫、白川　仁[1]、齋藤　正頼[1]、Puspo E. Giriwono[1]、桂井　朋子[1]、後藤　知子[1]、駒井三千夫[1]（東北大・農、[1]東北大・院農）

○Keisuke Hirahara, Hitoshi Shirakawa[1], Masayori Saito[1], Puspo E. Giriwono[1], Tomoko Katurai[1], Tomoko Goto[1], Michio Komai[1] (Faculty of Agriculture, Tohoku University, [1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

【目的】ビタミンK（VK）は、VK依存性タンパク質のGlu残基のγ位カルボキシル化（Gla化）を行う酵素γ-glutamylcarboxylaseの補因子として作用し、血液凝固や骨代謝に関与する。天然のVKには植物由来のVK1（フィロキノン）と主に微生物が産生するVK2（メナキノン類：MK-n）が存在し、摂取されたVKの一部は生体内においてVK2の一種であるメナキノン-4（MK-4）に変換されることが知られている。変換の生理的意義は未だ不明であるが、脳や膵臓、精巣において変換活性が高く、MK-4が多量に含まれている。MK-4は、Gla化を介さない作用（アポトーシス誘導、転写因子PXRのリガンド、など）を有することが報告されている。疫学調査結果から、VK1の摂取量とインスリン感受性との間に正の相関があること、健常者への薬理量VK投与が糖負荷後のインスリン分泌量を増加させることが報告されており、VKが糖代謝に関与していることが示唆されている。本研究では、遺伝的糖尿病モデルマウスを用いて、VK欠乏食が糖代謝に及ぼす影響について解析した。

【方法】KK-Ayマウス（4週齢、雄）を2群に分け、AIN93G組成の標準飼料（VK1を0.75 mg/kg添加：cont群）、またはVK無添加飼料（K free群）を与え、60日間飼育した。飼育期間中は体重、摂食量、摂食時血糖値の測定を行った。また、飼育33日目に経口糖負荷試験、41日目にインスリン負荷試験を実施した。飼育期間終了後、解剖に供し、血清、各臓器を採取した。臓器中のVK量は、定法に従い蛍光HPLC法で定量した。また、膵臓、肝臓、筋肉、脂肪組織からtotal RNAを調製し、定量RT-PCR法によって糖代謝関連遺伝子のmRNA量を測定した。

【結果】体重、摂食量は群間で差は見られなかった。摂食時の血糖値は、飼育日数に従い両群で上昇したが、K free群においてcont群に比べ有意な増加が観察された。経口糖負荷試験では、cont群と比較してK free群で耐糖能が悪化する傾向が見られた。また、糖負荷後の血漿インスリン濃度は、糖負荷後60分、120分においてK free群でcont群に比べ低下傾向が観察された。インスリン負荷試験では、K free群でインスリン抵抗性が増大していた。膵臓中の総VK量、MK-4量は、K-free群で有意に減少していた。以上のことから、VK無添加飼料は、膵臓中のMK-4量を低下させ、糖負荷時のインスリン分泌量を低下させること、また、インスリン感受性の低下をもたらす可能性が示唆された。

vitamin K, diabetes, insulin

講演番号：4C26a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎26会場

マウス精巣由来細胞におけるゲラニルゲラニオールの男性ホルモン産生促進

Enhanced production of testosterone by geranylgeraniol in mouse testis derived tumor cell

吉田　理紗、○白川　仁[1]、伊東　あさぎ[1]、 Giriwono Puspo Edi[1]、駒井　三千夫[1]（東北大・農、[1]東北大・院農）

Risa Yoshida, ○Hitoshi Shirakawa[1], Asagi Ito[1], Puspo Edi Giriwono[1], Michio Komai[1] (Faculty of Agriculture, Tohoku University, [1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

【目的】近年、高齢者人口の増加に伴い加齢男性性腺機能低下症候群（LOH症候群）が注目を集めている。この主な原因は、男性の加齢に伴う男性ホルモン産生の低下であり、筋肉機能や骨密度、性機能が低下する。男性ホルモンは20歳代にピークを迎えてから徐々に低下してゆき、加齢とともに症状が現れる。今日、高齢者の健康増進や予防医学の意識が高まり、薬学的治療やホルモン療法に加えて、食品による症状改善にも関心が集まっている。我々はこれまでに、ビタミンK2の一種であるメナキノン-4（MK-4）が、テストステロン（Ts）産生の促進作用を有することを動物実験、培養細胞試験によって示してきた[1)]。また、他のビタミンK2同族体によるTs分泌量は、イソプレノイド側鎖の短いMK-3で上昇傾向、側鎖の長いMK-7では増加が見られた一方、フィチルキ基側鎖を有するビタミンK1では変化しなかった。このことから、Ts産生促進作用には、ビタミンKのナフトキノン骨格ではなく、ビタミンK2のもつイソプレノイド側鎖が関与していることが示唆された。そこで本研究では、MK-4の側鎖構造体であるゲラニルゲラニオール（GGOH）のTs産生に及ぼす影響を精巣由来培養細胞を用いて解析した。

【方法】マウス精巣由来癌細胞I-10をGGOHの存在下・非存在下で一定時間培養した後、培地中に分泌されたTs量をELISA法によって測定した。また、I-10細胞はTs産生経路の中間体に当たる、プロゲステロンも分泌することから、培地中のプロゲステロン量を同様に測定した。GGOH処理後、経時的に細胞を回収し、Ts産生制御に関わる因子（PKA、CREB、StAR、CYP11a）の発現量をウエスタンブロット法で解析した。また、アデニル酸シクラーゼやPKAの阻害剤で処理し、GGOHの作用点を推定した。

【結果】GGOHは0－30μMで添加量依存的、0－24時間で時間依存的に、I-10細胞のTs分泌量を有意に増加させた。プロゲステロン分泌量は、Tsと同様にGGOH添加量に依存して増加したことから、GGOHはTs合成経路のプロゲステロン生成よりも上流の経路に作用することが示唆された。ウエスタンブロットの結果、GGOH処理によりPKAのリン酸化が亢進した。また、PKA阻害剤（H89）の処理によってTs産生促進作用が阻害されたことから、GGOHによる促進作用はPKAのリン酸化（活性化）を介することが明らかになった。

1) Ito A., et al. Menaquinone-4 enhances testosterone production in rats and testis-derived tumor cells. Lipids Health Dis. 2011 **10**: 158

geranylgeraniol, testosterone, I-10 cells

講演番号：4C26a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎26会場

アスコルビン酸欠乏による肝シトクロムP-450の減少とその機構解析

Reduction of hepatic cytochromeP-450 (CYP2B1/2B2) by ascorbic acid deficiency and its mechanism

○星長 夕貴子、三浦 奈津子、徳田 優希、小林 美里、村井 篤嗣、堀尾 文彦（名大院生命農・応用分子生命科）

○Yukiko Hoshinaga, Natsuko Miura, Yuki Tokuda, Misato Kobayashi, Atsushi Murai, Fumihiko Horio (Nagoya Univ.)

【目的】シトクロムP-450 (CYP) は生体異物代謝の中心酵素であり、ヘムを補欠分子族として保有する。アスコルビン酸(AsA)生合成不能のODSラットやモルモットにおいて、AsA欠乏により肝臓のCYPが減少する。CYPには多くの分子種が存在するが、その中でもAsA欠乏のODSラットの肝臓ではフェノバルビタール(PB)誘導型CYPであるCYP2B1/2B2が減少することが報告されている。しかし、AsA欠乏によるCYP減少の機構は明らかにされていない。一方で我々は、AsA欠乏のODSラットの肝臓ではヘム分解の律速酵素であるheme oxygenase-1(HO-1)のmRNAレベルが上昇することを見出しており、AsA欠乏時の肝臓ではヘム分解が亢進していることが推定される。本研究では、PB投与したODSラットにおけるAsA欠乏時の肝臓のCYP2B1/2B2の減少とHO-1発現の上昇とを確認し、HO-1の発現上昇による肝臓でのヘム分解の促進がCYP2B1/2B2量の低下を引き起こす可能性を検討することを目的とした。

【方法】**実験１**：ODSラット（雄、6週齢）にAsA添加食(1,000mg/kg)を与える対照群と、AsA無添加食を与える欠乏群とを設けて18日間飼育した。10日目以降は、対照群へは欠乏群の飼料摂取量に相当する量の飼料を与えた。飼育開始後16、17日目に生体異物であるPBを腹腔内注射(50 mg/kg体重)した。　**実験２**：ODSラット（雄、6週齢）にAsA添加食(1,000mg/kg)を与えて9日間飼育した後、10日目から13日目にかけてPBを腹腔内注射（4回、50 mg/kg 体重）して肝臓のCYP2B1/2B2を誘導した。14日目に、HO-1誘導剤であるlipopolysaccharide(LPS)を腹腔内注射(2mg/kg 体重)し、48時間後に屠殺した。対照群には生理食塩水を腹腔内注射した。解剖時に肝臓を採取し、総CYP量の測定、CYP2B1/2B2、HO-1のmRNAおよびタンパク質レベルを測定した。

【結果】**実験１**：AsA欠乏群では対照群に比べて、肝臓の総CYP量は有意に減少し、CYP2B1/2B2タンパク質レベルも低かった。HO-1のmRNAおよびタンパク質レベルの測定を行った結果、有意に上昇しており、ヘムの分解産物であるビリルビンの血中濃度も欠乏群で有意に上昇していた。**結果２**：LPS投与群では対照群に比べて、HO-1タンパク質レベルは有意に上昇し、肝臓の総CYP量とCYP2B1/2B2は有意に減少した。

【考察】AsA欠乏により肝臓のCYP2B1/2B2の減少が観察され、同時にHO-1発現が上昇することが確認された。そして、HO-1誘導剤であるLPS投与によって肝臓のCYP-2B1/2B2が減少した。これらの結果より、AsA欠乏時の肝臓CYP減少の機構の一つとして、HO-1発現上昇によるヘム分解の促進が寄与していることが示唆された。

Ascorbic acid deficiency, Cytochrome P-450 , Heme Oxygenase-1

講演番号：4C26a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎26会場

アスコルビン酸欠乏がラットの不安行動に及ぼす影響

Effect of ascorbic acid deficiency on anxiety-like behavior of ODS rats.

○橋本 理恵子、寺田 裕紀、竹中 麻子（明治大農・農化）
○Rieko Hashimoto, Yuki Terada, Asako Takenaka(Dept. Agric. Chem., Sch. Agric., Meiji Univ.)

【目的】われわれはアスコルビン酸合成能欠如ラットを用いて、7日間のアスコルビン酸欠乏により不安行動が増加することを報告してきた。本研究では、アスコルビン酸欠乏と不安行動の関連性を詳細に検討する目的で、１）アスコルビン酸欠乏下での不安行動に抗不安薬が及ぼす影響を解析するとともに、２）不安行動の制御要因となるグルココルチコイド分泌にアスコルビン酸欠乏が及ぼす影響を解析した。
【方法】動物実験１と２を行った。［実験１，２共通］5週齢のODS/Shijc1-od/od 雄ラット（アスコルビン酸合成欠如モデル）を購入した。対照群にはAIN-93Gに準じた精製飼料にL(+)-アスコルビン酸(3g / kg)を添加した食餌を与え、アスコルビン酸欠乏群にはアスコルビン酸を添加しない精製飼料を与えた。飼料は6日間自由摂取させた。［実験１］飼育7-8日目に、対照群とアスコルビン酸欠乏群それぞれに、抗不安薬であるdiazepam (0.5mg / kg b.w)あるいはvehicleを腹腔内投与した。投与30分後に、高架型十字迷路試験(EPM test)で不安行動の評価を行った。EPM test直後にラット尾静脈から採血し、コルチコステロン濃度の測定を行った。［実験２］飼育5日目に安静時のラット尾静脈から採血した（定常状態採血)。飼育7-8日目に、対照群とアスコルビン酸欠乏群それぞれを拘束ホルダーに入れて拘束ストレスを与えた。拘束開始15分後と1時間後に、尾静脈から採血した（ストレス状態採血)。採取した血漿中のコルチコステロン濃度を測定した。［実験１，２共通］飼育10日目に12時間絶食下で解剖し、血漿、脳を採取した。
【結果】実験１では、アスコルビン酸欠乏によりEPM testにおける探索行動が有意に減少し、不安行動の増加が確認された。またアスコルビン酸欠乏による不安行動の増加は、diazepamの投与により解消された。このことから、アスコルビン酸欠乏時の不安行動は、GABA作動性の抗不安薬の投与により抑制されることが示された。また、血中コルチコステロン濃度はdiazepam投与群で低く、アスコルビン酸欠乏による不安行動の制御にコルチコステロンが関与している可能性が考えられた。実験２では、拘束開始直後から経時的に血中コルチコステロン濃度が上昇したが、アスコルビン酸欠乏による影響は見られなかった。このことから、少なくとも7日間のアスコルビン酸欠乏では、ストレスに応答したグルココルチコイド分泌量は変化しないことが示された。

Anxiety-like behavior, Ascorbic acid, Corticosterone

講演番号:4C26a07
講演日時、会場:3月25日10:16～ C校舎26会場

高リン食摂取がラット肝臓に及ぼす影響のDNAマイクロアレイによる解析

Effect of a high-phosphorus diet on rat liver: a DNA microarray analysis

○千　善宇[1]、石島　智子[1]、陶山　達也[1]、阿部　啓子[12]、中井　雄治[1]（東大院・農生科・応生化、[2]KAST）

○Sunwoo Chun[1], Tomoko Ishijima[1], Tatsuya Suyama[1], Keiko Abe[12], Yuji Nakai[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]KAST)

【目的】本研究は、DNA microarrayを使った遺伝子発現レベルの網羅的解析により、高リン食摂取が肝臓及び肝臓が関与する生体内代謝に及ぼす影響を予測する目的で実施された。
【方法】4週齢のWistar系雄ラットを1週間の予備飼育後、コントロール食(リン含量: 0.3%)摂取群と高リン食(リン含量: 1.2%)摂取群に分け、24日間飼育した。その後解剖を行い、血液の採取と肝臓の摘出を行った。解剖の際には最終摂食のタイミングによる影響を少なくするため、解剖前に4時間絶食させた。摘出した肝臓からtotal RNAを抽出し、Affymetrix社のGeneChip Rat Genome 230 2.0を使ってDNA マイクロアレイを行った。得られたデータをqFARMSによって正規化した後、RankProducts法による二群間比較を行った。算出されたFalse Discovery Rate(FDR)が0.05未満となったプローブセット848個を有意に発現変動したものとした。これらについてはDAVIDを用いてGene annotation enrichiment analysisを行った後、 P-value < 0.01を満たす57個のGO(Gene ontology)termを抽出した。抽出されたGOtermはQuickGOを用いて階層を可視化した。
【結果】 抽出されたGOtermを階層化した結果、脂質代謝関連のGOtermがもっとも多く含まれたことから、脂質代謝関連遺伝子を詳しく見た。関連遺伝子の発現変動から脂肪酸β酸化、脂肪酸合成、コレステロール合成の変動(up- or down-regulation)が予想された。胆汁酸合成関連遺伝子の発現変動から体内胆汁酸恒常性にも影響を及ぼすことが予想される。これらの結果は、高リン食摂取がコレステロール及び脂肪酸の代謝と関連する可能性があることを示唆するものである。今後、生化学的･組織学的な解析を行い、高リン食摂取が肝臓に及ぼす影響について多角的に検証する予定である。

High phosphorus diet, Rat liver, DNA microarry

講演番号:4C26a08
講演日時、会場:3月25日10:27～ C校舎26会場

短期間のマグネシウム欠乏食摂取ラットにおける肝臓の遺伝子発現解析

Analyzing the effect of short-term dietary magnesium deficiency in rats on their hepatic gene expression

○中村　紀章[1]、石島 智子[1]、阿部　啓子[1,2]、中井　雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]KAST）
○Toshiaki Nakamura[1], Tomoko Ishijima[1], Keiko Abe[1,2], Yuji Nakai[1]（[1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]KAST）

【背景・目的】マグネシウム(Mg)は体内で300種類以上の酵素反応に補因子として関与しており、正常な細胞機能の維持に必要不可欠なミネラルである。そのため体内保留量の不足によって様々な障害、例えば全身性の炎症、血中トリアシルグリセロール濃度の上昇、腎機能の低下などが報告されている。ところが、Mg欠乏が遺伝子発現に与える影響については不明な点が多い。これまでに我々は28日間と14日間のMg欠乏食投与が肝臓の遺伝子発現変動に及ぼす影響についての網羅的解析を行い、栄養素代謝、その他の過程でほぼ同様の遺伝子発現変動が起きることを明らかにした。しかし、Mg欠乏状態の進行度合いと遺伝子発現変動の関連については依然として不明であるため、本研究では14日間よりも短い期間のMg欠乏食投与による遺伝子発現変動を解析し、Mg欠乏食投与によって速やかに引き起こされる事象の概要を明らかにすることを目的として短期間のMg欠乏食投与実験を行った。
【方法】実験動物には4週齢Wistar系雄性ラットを用いた。飼料はAIN-93G組成に基づいて作製し、ミネラルミックスから酸化マグネシウムを取り除いたものをMg欠乏食とした。そこにマグネシウム濃度が0.5%となるように酸化マグネシウムを添加したものを正常食とした。正常食で7日間の予備飼育を行った後に平均体重が均等になるように2群に分け、1つの群に正常食、もう1つの群にMg欠乏食を3日間投与した。なお、正常食投与群の摂食量をMg欠乏食投与群に合わせるようPair-feedingを行った。飼育期間終了後解剖をし、血清と肝臓を採取した。肝臓サンプルからRNAを抽出し、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析に供した。
【結果】Mg欠乏食投与群で血清中Mg濃度の有意な低下が見られ、Mg欠乏状態が速やかに引き起こされた。また、14日間投与(前回)では有意差が見られていた血清中HDLコレステロール、LDLコレステロール濃度では有意差が見られず、逆に有意差が見られていなかった血清中遊離脂肪酸濃度で有意な低下が確認されるなど、14日間投与とは異なった影響が表れていた。遺伝子発現解析からは14日間投与実験で見られていたような脂質代謝関連遺伝子に加え、新たに細胞周期制御やプロテアソームによるタンパク質分解に関連する遺伝子で有意な発現変動が見られた。以上、本研究によって短期のMg欠乏状態が生体に及ぼす影響の特徴が明らかとなった。

magnesium deficiency, dna microarray, liver

講演番号:4C26a09
講演日時、会場:3月25日10:38～ C校舎26会場

分離大豆タンパク質がマグネシウム欠乏ラットに及ぼす生理効果の解析

Analysis of the physiological effect of dietary soy protein isolate on rats with magnesium deficiency

○米光　翔吾[1]、石島　智子[1]、中村　紀章[1]、阿部　啓子[1,2]、中井　雄治[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]KAST）

○ Shogo Yonemitsu[1], Tomoko Ishijima[1] ,Toshiaki Nakamura[1],Keiko Abe[1,2],Yuji Nakai[1]
([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]KAST)

【背景・目的】マグネシウム(Mg)は、生体内において多くの生理的・生化学的作用に関与している。近年、食生活の変化によるMg摂取量の不足が指摘されている。ラットを用いた実験において、Mg欠乏食投与により、脂質代謝をはじめとする種々の代謝系が変化することが知られている。一方、大豆タンパク質は必須アミノ酸をバランスよく含む植物性タンパク質で、現在食品分野で広く利用されている。動物実験においては、大豆タンパク質から精製された分離大豆タンパク質（soy protein isolate,SPI）が、通常飼料のタンパク質に用いられるカゼインと比較して、血清トリグリセリドおよびコレステロール濃度を低下させるというような脂質代謝への作用が知られている。そこで本研究では、Mg欠乏食およびSPIの投与により生体に引き起こされる代謝変化を明らかにすることを目的とする。
【方法】被験動物としては4週齢Wistar系オスラットを用いた。飼料はAIN-93G飼料組成をもとに作製した。飼料中Mg濃度は正常食(0.05%)とMg欠乏食(0.02%)に設定し、タンパク質給源にはカゼインとSPIの2種類を用いた。ラットは24匹を4群に分け(n=6)、飼料中Mg濃度とタンパク質給源の視点から、正常カゼイン食、正常SPI食、Mg欠乏カゼイン食、Mg欠乏SPI食をそれぞれに4週間自由摂食させた。
【結果】血清Mg濃度はMg欠乏食群で有意に低値となり、Mg欠乏食投与によりMg欠乏状態が引き起こされていることを確認した。血清カルシウムおよびリン濃度はMg欠乏食群で有意に高値となり、カゼイン食群とSPI食群との間に差は見られなかった。つまり、血中のミネラル濃度に関しては食餌性のMg濃度のみが影響し、タンパク質給源の違いによる影響は見られなかった。血清総タンパクおよびアルブミン濃度はSPI食群で有意に低値となったが、いずれも食餌中Mg濃度の違いによる有意な差は見られなかった。これらのタンパク質栄養状態を示す指標においては、食餌性Mg濃度は影響せず、タンパク質給源の差が影響した。血清トリグリセリドおよび遊離脂肪酸濃度はSPI食群で有意に低値となり、Mg濃度の違いによる有意な差はなかった。SPI食群でこれらの血中脂質成分が減少することは、従来の知見と一致した。総じて、ミネラル代謝以外の、タンパク質代謝および脂質代謝に関連する生化学的指標の多くが、正常食とMg欠乏食の差異によらず、カゼインとSPIというタンパク質給源の違いに左右される結果となり、食餌性Mg量よりもタンパク質給源の影響が強く表れることが示唆された。

magnesium deficiency, soy protein isolate, rat

講演番号：4C26a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ C校舎26会場

亜鉛の欠乏により生じる味覚の変化についての解析

Analysis of changes in taste sensitivity caused by zinc deficiency

○川嶋 朋子、辻谷 知子、呉 性姫、林 由佳子（京大院・農）
○Tomoko Kawashima, Tomoko Tsujitani, Seong-Hee Oh, Yukako Hayashi (Grad. Sch. Kyoto Univ)

【目的】

味覚障害には、様々な原因が存在するが、その１つとして亜鉛の欠乏があげられる。亜鉛は、細胞の分裂や分化に必要不可欠な微量元素の１つである。一方、味細胞の寿命は短く、約10日で新しい味細胞と入れ替わるということがわかっている。これまで、亜鉛欠乏状態に陥ると、この味細胞の入れ替わりが遅延し、また、味蕾中の味細胞の減少や微絨毛の消失といった形態的な変化がおこるという報告がなされている。味覚障害患者に亜鉛を投与することで症状が回復するという例も知られている。しかし、亜鉛欠乏によって具体的にどのような症状が生じるのか、その機序などについてはまだ結論がでていない状況である。

そこで、今回の研究では、味神経レベル、また個体レベルで、亜鉛の欠乏が味覚受容にどのような変化を及ぼすのかを確かめることを目的とした。

【方法】

まずC57BL/6J Jms SlCマウス(メス)に亜鉛欠乏食を1～6週間給餌し、亜鉛欠乏マウスを作製した。味神経レベルでの味覚の変化を調べるため、亜鉛欠乏食給餌開始から1週間ごとに5基本味に対して鼓索神経応答解析を行った。この実験に用いたマウスの亜鉛が欠乏していることを確かめるため、実験後、腹部大動脈から採血を行い、分離した血清中の亜鉛濃度を測定した。さらに48時間二瓶選択法を用いて、亜鉛欠乏マウスの個体レベルでの種々の味溶液に対する嗜好の変化を調べる予定である。

【結果】

亜鉛欠乏食を給餌したマウスの血清中の亜鉛濃度は、正常食を摂取させていたコントロールマウスに比べて有意に低下していた。この亜鉛欠乏マウスにおいて、塩味に対する味神経応答の有意な低下がみられた。さらに、酸味に対する応答も低下する傾向がみられた。一方、甘味、うま味、苦味に対する応答値にはほとんど変化がみられなかった。一般的に、味細胞はⅠ～Ⅳ型に分類される。変化がみられなかった3つの味質はⅡ型細胞で、変化がみられた塩味や酸味はⅠ型細胞もしくはⅢ型細胞でそれぞれ受容されると考えられている。これらのことから、亜鉛欠乏による味覚の変化は、イオンチャネル型受容体を有するといわれているⅠ型、Ⅲ型細胞で主に生じる可能性が示唆された。

今後は食後効果を排除できる短時間二瓶選択法を用い、味覚のみに依存する嗜好の変化を調べることでさらなる知見が得られると期待できる。また、味細胞の観察により、減少している細胞型の特定を行い、さらに検証していく。

Zinc deficiency, taste, mouse

講演番号：4C26a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ C校舎26会場

亜鉛吸収に機能するトランスポーターZIP4の発現を促進する食品因子の探索

Rapid screening for food factors enhancing Zinc absorption

○橋本彩子、木津久美子[1]、宮前友策、増田誠司、永尾雅哉、成田宏史[1]、神戸大朋（京大生命・統合生命、[1]京女大・家政・食物栄養）

○ Ayako Hashimoto, Kumiko Kizu[1], Yusaku Miyamae, Seiji Masuda, Masaya Nagao, Hiroshi Narita[1], Taiho Kambe（Grad Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [1]Dept. of Food and Nutr., Kyoto Women's Univ.）

【目的】亜鉛は、タンパク質の構造因子、酵素の補因子、種々のシグナルの調節因子として機能する必須微量元素である。その為、亜鉛欠乏は味覚障害や皮膚炎、成長遅延等をもたらすことが知られている。さらに、重篤な亜鉛欠乏状態の高齢者は、褥瘡や食欲不振、舌痛等により Quality of life が大きく低下しており、日々の食生活を通した亜鉛の充足は極めて重要となる。食物由来の亜鉛は主に小腸で吸収される。この吸収過程において必須の役割を果たすのが、先天性亜鉛欠乏症（腸性肢端皮膚炎）の原因遺伝子である亜鉛トランスポーターZIP4 である。ZIP4 は亜鉛欠乏時に分解が抑制され、小腸上皮細胞頂端膜に蓄積して小腸上皮細胞内への亜鉛の取り込みに働く。本研究は、亜鉛欠乏予防効果のある食品を見出だすことを目的に、ZIP4 の発現を促進する食品因子を探索した。

【方法】小腸上皮細胞と同様に、亜鉛欠乏状態で ZIP4 を発現する性質を持つ Hepa 細胞を見出し、探索スクリーニング系を構築した。ZIP4 の検出のため、抗 ZIP4 モノクローナル抗体を作製した。種々の食品サンプルを Hepa 細胞の培養液中に添加し、24 時間培養後、全細胞を回収した。細胞可溶化後、Western blot により ZIP4 の発現変化に及ぼす影響を解析した。また、食品サンプルが細胞内への亜鉛取り込みに及ぼす効果については、細胞内亜鉛量のマーカーであるメタロチオネインの Northern blot、ならびにメタロチオネインプロモーター下流に分泌型のアルカリフォスファターゼを接続した MRE-SEAP レポーターシステムを利用して検討した。

【結果】300 を超える食品サンプルを検討した結果、大豆イソフラボン抽出画分サンプルに再現性よく ZIP4 の発現促進効果が認められた。また、メタロチオネインの mRNA 発現、SEAP 活性ともに有意に増加していた。従って、本抽出画分は ZIP4 の発現を促進し、細胞内亜鉛量を増加させる効果を有することが示唆された。さらに、この ZIP4 発現促進効果の作用機序について解析を進めた結果、ZIP4 タンパク質の分解抑制効果に起因すると示唆される結果を得た。本報告は、ZIP4 の発現促進効果を持つ食品成分として初めての報告となる。

zinc, transporter, ZIP4

講演番号：4C26a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ C校舎26会場

亜鉛トランスポーターZIP4の発現を促進する食素材成分の精製

Purification of food factors with ZIP4 expression promoting activity

○大倉克摩、高橋正和、橋本彩子[1]、永尾雅哉[1]、神戸大朋[1]、大東 肇（福井県大院・生物資源、[1]京大院・生命）

○Katsuma Ookura, Masakazu Takahashi, Ayako Hashimoto[1], Masaya Nagao[1], Taiho Kanbe[1], Hajime Ohigashi （Dept. of Biosci., Fukui Pref. Univ., [1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ.）

【目的】亜鉛は、タンパク質の構造因子や酵素の補因子、さらにはシグナル伝達因子として必須の微量金属元素であり、その欠乏は味覚機能障害や免疫機能低下・皮膚疾患などをもたらすことが知られている。これらの疾患予防には食事からの亜鉛摂取が最も重要であるが、腸管からの亜鉛吸収効率は低く、近年の亜鉛欠乏患者の増加の一因ともなっている。亜鉛トランスポーターZIP4は、小腸上皮細胞のapical側細胞膜に発現し、亜鉛吸収に必須な役割を果たしている。したがって食素材由来のZIP4発現促進因子は、亜鉛吸収効率の向上をもたらし、亜鉛欠乏症状の予防・改善に有望と期待される。本研究ではスクリーニング結果から有望と判断された食素材について、ZIP4発現促進活性を有する成分の単離・精製を行った。

【方法】Hepa細胞は小腸上皮細胞と同様に、亜鉛欠乏状態でZIP4の細胞膜発現量が増大する培養細胞である。そこでHepa細胞培養系に各種食素材由来サンプルを添加し、24時間培養処理後に細胞を剥離し、細胞破砕サンプルを調製し、抗ZIP4モノクローナル抗体を用いたWestern blotting法でZIP4の発現促進活性を検討した。特に強いZIP4発現促進活性を示した食素材試料について、中圧クロマトグラフィーとHPLCによって精製した。

【結果】多様な食品素材サンプルについてZIP4発現促進活性を検討したところ、大豆抽出物において比較的強い活性が認められた。そこで、この大豆抽出物4.2 gを中圧カラムクロマトグラフィー分画に供し、さらに活性画分をprep-HPLCによって活性成分（S-1）を約30 mg得た。S-1の作用を検討した結果、用量依存的に明瞭な活性を示し、その比活性は出発材料とした大豆抽出物の約３倍であった。

food factor, zinc transporter, ZIP4

講演番号：4C26a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ C校舎26会場

貧血ラット十二指腸におけるフェリチン非依存的抗酸化メカニズム

Ferritin independent anti-oxidative mechanism in the duodenum of iron deficient rats

○山本　真智子、篠田　卓弥、団　未那美、篠田　粧子（首都大院・人間健康科学研究科・栄養生化学）

○Machiko Yamamoto, Takuya Shinoda, Minami Dan, Shoko Shinoda　(Syutodai)

【目的】鉄は生命活動に必須な微量金属であるが、Fenton反応を介してヒドロキシラジカル(˙OH)を発生するため、通常は細胞内のフェリチンと結合することで反応が抑制されている。一方、鉄欠乏状態では鉄吸収が亢進し、同時にフェリチン発現量が低下するため、十二指腸粘膜細胞内で遊離鉄が増加する可能性がある。Fenton反応で生成されたヒドロキシラジカルを消去する代表的な抗酸化物質であるグルタチオンは細胞内濃度が高く、酸化還元状態を維持するために最も重要な細胞性抗酸化物質とされている。貧血ラットでは、このグルタチオン濃度が鉄充足群に比べて高く維持され、脂質の過酸化を抑制するフェリチン非依存的な抗酸化システムが働くこと見いだしたので報告する。

【方法】4週齢のWistar系雄ラットをAIN-93G飼料（FeS）または鉄無添加飼料（FeD）で3週間飼育した。ラットは解剖の6～7時間前に絶食させ、麻酔下で十二指腸を結紮して、鉄として100または1000μg含む$FeSO_4$溶液を投与した。15分後に結紮した十二指腸を摘出し、上皮粘膜を採取した。細胞内の遊離鉄（labile iron pool:LIP）はバソフェナントロリン比色法で、脂質の過酸化の指標としてマロンジアルデヒド（MDA）をチオバルビツール酸法で測定した。十二指腸粘膜の総グルタチオン（tGSH）および酸化型（GSSG）はGSSG/GSH Quantification Kit (Dojindo)を用いて定量し、tGSHとGSSGの差から還元型GSHを求めた。グルタチオン合成阻害剤 L-ブチオニン(S,R)-スルホキシミン（BSO）を胃内投与し、小腸粘膜細胞のグルタチオンを低下させたラットにおいても鉄投与実験を行い、貧血ラット十二指腸におけるGSH濃度の上昇が脂質の過酸化に及ぼす影響について検討した。

【結果】十二指腸粘膜細胞内のグルタチオン量は、FeD群でFeS群に比べて有意に高くなった。FeD群、FeS群共に、tGSHに占める還元型GSHの割合（GSH/tGSH）は99%以上であった。結紮腸管に鉄を投与すると、LIPはFeD群で有意に増加した。還元型グルタチオンの割合はFeS,FeD両群で減少したが、その減少率はFeS群に比べてFeD群で有意に大きかった。一方、鉄の1000μg投与における脂質の過酸化は、FeS群に比べてFeD群で有意に抑制された。グルタチオンを低下させた小腸では、FeS群、FeD群共にMDA生成量が増加したが、FeD群の方がFeS群よりも低く保たれていた。したがって、FeD群ではグルタチオン濃度の上昇に加え、他の抗酸化物質も関与するフェリチン非依存的な抗酸化システムが働いていることが示唆された。

Iron deficiency, Glutathione, Intestine

講演番号：4C26a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ C校舎26会場

ニュートリゲノミクスによる鉄安全摂取基準アセスメント

Safety assessment for dietary iron intake by nutrigenomics

○亀井 飛鳥、渡部 由貴、篠崎 文夏、荒井 綜一[1]、阿部 啓子[2]（KAST、[1]東農大・総研、[2]東大院・農生科・応生化）

○Asuka Kamei, Yuki Watanabe, Fumika Shinozaki, Soichi Arai[1], Keiko Abe[2] (KAST, [1]Tonodai, [2]Todai)

［目的］

鉄は、酸素の運搬体や酵素の補欠分子族などとしての役割を担う必須のミネラルである。出血や摂取不足などにより鉄が不足すると、臓器中の貯蔵鉄が利用されて減少し、やがて貧血に至る。我々はこれまで、鉄欠乏食摂取による生理変化について、ラット肝臓を対照とした遺伝子発現解析を行った[1)]。一方、鉄の過剰摂取は臓器内の不安定鉄プールを増加させる。不安定鉄は、タンパク質と結合せずに存在し、Fenton反応によりヒドロキシルラジカルを産生して酸化ストレスを誘導し、臓器にダメージを与える。今回、食餌性鉄過剰の影響を明らかにするため、鉄の最大の貯蔵臓器で様々な栄養素の代謝の中心的存在である肝臓につき、網羅的な遺伝子発現解析を実施した。

［方法］

3週齢の雄性SDラットを予備飼育後、AIN93G食を与える群（通常食群）、AIN93G食に鉄を10倍量添加した食餌を与える群（鉄過剰食群）とに分け、8日間飼育した。飼育期間中は、食餌および水を自由摂取させた。9日目に麻酔下で血液および肝臓を採取し、血液中の生化学パラメータ測定および肝臓のDNAマイクロアレイ解析を行った。

［結果および考察］

飼育期間中の摂食量、体重増加に2群間での差は認められなかった。一方、血中のヘモグロビン濃度は、鉄過剰食群で有意に増加した。また、血中フェリチン濃度は増加傾向であった。血中フェリチン濃度は生体内の貯蔵鉄量を反映して変動することから、鉄過剰食摂取ラット体内では、通常食摂取ラットに比べ、鉄が多く蓄積されていることが示唆された。肝臓のDNAマイクロアレイの階層的クラスター解析結果より、鉄過剰食摂取ラット肝臓では通常食ラット肝臓に対して遺伝子発現パターンが大きく変動していると考えられた。個々の変動遺伝子に着目したところ、糖、脂質などの栄養素代謝に関わるものの濃縮度が高いことが明らかになった。今回の発表では、鉄過剰食摂取実験の結果に加え、既報である鉄欠乏食摂取実験のデータも踏まえ、鉄摂取量の安全摂取基準について、ニュートリゲノミクスの観点から考察を加え、報告する。

1) Kamei, A. et al., *Physiol. Genomics*, 42, 149-56, 2010

iron overload, liver, DNA microarray

講演番号：4C27a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ C校舎27会場

小腸様細胞株 Caco-2 細胞におけるスクラーゼ・イソマルターゼ遺伝子発現に対するメチル化ヒストン H3K4 結合タンパク質 CHD1 の役割

The role of a methylated histone H3 K4 binding protein CHD1 on Sucrase-Isomaltase gene expression in enterocyte-like Caco-2 cells

○稲用　裕子、望月　和樹、大崎　愛弓、合田　敏尚(静岡県立大院・生活健康科学・栄養生理)
○Yuko Inamochi, Kazuki Mochizuki, Ayumi Osaki, Toshinao Goda(Nutr. Physiol., Gread. Sch. of Nutr. And Environ. Sci., Univ. of Shizuoka)

【目的】

二糖類水解酵素であるスクラーゼ・イソマルターゼ複合体(SI)の遺伝子は、小腸幹細胞であるクリプト部の細胞から吸収細胞へと分化する過程で発現し、流入する栄養素の消化吸収に対応する。近年の研究により、このような分化に伴い増大する遺伝子の発現には、標的遺伝子周辺のヒストン修飾(メチル化、アセチル化)が関与することが知られてきた。特に、ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基（K4）のメチル化部位に結合するクロモドメインタンパク質 CHD1 は、クロマチンリモデリング活性を有しヘテロクロマチンをユークロマチンに変化させるタンパク質であるため、分化時における遺伝子の発現誘導に強く関与すると考えられている。そこで本研究では、ヒストン H3K4 のメチル化および CHD1 タンパク質の SI 遺伝子の発現調節への関与を検討した。

【方法】

小腸様細胞株 Caco-2 を培養し、コンフルエント 100%になった時点を Day0 とし、そこから 5 日後（Day 5）、10 日後（Day 10）の細胞をそれぞれ回収した。SI 遺伝子およびメチル化ヒストン結合タンパク質（CHD1、BPTF、WDR5）の遺伝子の発現量を real time RT-PCR 法によって定量した。SI 遺伝子周辺領域（上流域および転写領域）におけるヒストン H3 K4 のメチル化修飾、ヒストン H3 ならびに H4 のアセチル化修飾、CHD1 の結合および RNA polymerase II (Pol II)の結合をクロマチン免疫沈降法によって調べた。

【結果】

SI遺伝子およびCHD1遺伝子の発現は、コンフルエント後のCaco-2細胞の分化の進行に伴って増大した。さらに、SI遺伝子周辺領域におけるヒストンH3K4のジ、トリメチル化およびCHD1の結合は、SI遺伝子の発現増大に伴って上昇した。SI遺伝子周辺領域におけるヒストンH3ならびにH4のアセチル化およびPol IIの結合も、SI遺伝子の発現増大に伴い上昇した。以上の結果から、Caco-2細胞の分化に伴うSI遺伝子発現の増大には、SI遺伝子周辺領域のヒストンH3K4のメチル化の増大に伴うCHD1タンパク質の結合の増大が関与すると考えられた。

CHD1, methylation, Sucrase-Isomaltase

講演番号:4C27a02
講演日時、会場:3月25日09:11～ C校舎27会場

遺伝子ノックアウト細胞を用いたヒストンバリアントH2A.Zアイソフォームの機能解析

Analysis of isoforms of the histone variants H2A.Z with gene knockout cells.

○日下部 将之[1]、松田 涼[1]、北村 大志[1]、堀 哲也[2]、深川 竜郎[2]、原田 昌彦[1](1東北大院・農・分子生物学、[2]国立遺伝研)

○Masayuki Kusakabe[1], Ryo Matsuda[1], Hiroshi Kitamura[1], Tetsuya Hori[2], Fukagawa Tatsuo[2], Masahiko Harata[1] ([1]Grad.Sch.Agri.Sci.,Tohoku Univ., [2]Natl.Inst.Genet.)

【目的】核内に収納されたゲノムはヒストンと結合し、ユークロマチンやヘテロクロマチンといった不均一な構造を形成している。クロマチンはその構造を変換することで転写、DNA損傷修復、分配など様々なゲノム機能を制御しており、これがエピジェネティクスの分子基盤となっている。このクロマチン構造変換因子の一つとして、ヒストンH2Aのバリアントであるが知られている。H2A.Zは、遺伝子発現制御、DNA損傷修復、クロマチン構造の境界形成、植物におけるDNAメチル化との拮抗作用、など多様な機能を有している。しかしながら、その機能や分子機構については不明な点が多い。我々はH2A.Zの解析を進める過程で、脊椎動物にはH2A.Zに二種類のアイソフォーム(H2A.Z-1, H2A.Z-2)が存在することを発見した(1)。本研究では遺伝子ノックアウト(KO)細胞を用いることで、脊椎動物のH2A.Zアイソフォームがクロマチン機能構造形成にどのように関与するかを解析した。

【方法】ニワトリDT40細胞を用いて、二つのH2A.Zアイソフォーム遺伝子の単独KO細胞、二重KO細胞を作製した。これらの遺伝子KO細胞について、増殖の比較、FACS解析による細胞周期やアポトーシスの比較、さらにマイクロアレイ解析による遺伝子発現変化の比較解析を行った。また、両アイソフォームのヌクレオソーム中の存在量をウェスタンブロットやクロマチン免疫沈降法によって解析した。さらに、H2A.ZとDNAメチル化との拮抗作用の有無を確認するため、メチル化DNA感受性制限酵素処理とSouthern blot法を用いた解析を行った。

【結果】H2A.Zアイソフォーム単独KO細胞は生育可能であったが、二重KO細胞は致死性を示したことから、両アイソフォーム間に重複した機能が存在することが示唆された。単独KO細胞の比較により、それぞれのH2A.Zアイソフォームが細胞増殖、遺伝子発現、アポトーシスの誘導において、特異的な機能も有することも示唆された。ヒストン脱アセチル化阻害剤であるTSA処理によりヌクレオソーム中のH2A.Z-1のみが顕著に減少したことから、高アセチル化条件でのヌクレオソームへの取り込みの差が、アイソフォーム間の特異的な機能に結びついていると考えている。また、ニワトリW性染色体の反復DNA配列のメチル化がH2A.Z二重KO細胞でDNAメチル化が増加したことから、植物において観察されたH2A.ZとDNAメチル化の拮抗が、脊椎動物においても保存されていることが示唆された。

Reference:1, Matsuda et al., Nucleic Acids Res.(2010,Vol.38,No.13,4263-4273)

epigenetics, histone variants, DNA methylation

講演番号：4C27a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ C校舎27会場

新生仔肝臓の脂肪合成遺伝子のDNAメチル化制御

DNA methylation in the regulation of lipogenic gene expression in the neonatal liver

○亀井康富[1,2]、江原達弥[1,4]、高橋真由美[1]、袁勲梅[1]、金井紗綾香[1]、山崎聖美[5]、江崎治[5]、菅波孝祥[1]、岡野正樹[6]、小川佳宏[1,3]（[1]東京医歯大難治研　分子代謝、[2]臓器代謝、[3] GCOE、[4]森永乳業、[5]栄養研基礎栄養、[6]理研発生再生セ）

○Yasutomi Kamei[1,2], Tatsuya Ehara[1,4], Mayumi Takahashi[1], Xunmei Yuan[1], Sayaka Kanai[1], Tomomi Yamazaki[5], Osamu Ezaki[5], Takayoshi Suganami[1], Masaki Okano[6], and Yoshihiro Ogawa[1,3] ([1] Mol Med Metab、[2] Organ Net Metab、[3]GCOE, Med Res Inst, Tokyo Med Dental Univ、 [4]Morinaga Milk [5]Natl Inst Health Nutri, [6]RIKEN)

【背景】生活習慣病の発症には塩基配列の変化による遺伝素因のみならず栄養環境を含む環境因子が関与することが知られており、分子基盤の一つとしてエピジェネティクスによる遺伝子発現制御が指摘されている。しかしながら、栄養環境によりエピジェネティクス制御を受ける標的遺伝子は同定されていない。

【目的と方法】バイサルファイト法により、種々の栄養状態において雄性 C57BL6 マウスの肝臓における脂肪合成遺伝子の DNA メチル化状態を検討した。

【結果と考察】肝脂肪合成の律速酵素グリセロール 3 リン酸アシル基転移酵素（GPAT）遺伝子プロモーターにおける DNA メチル化の程度は遺伝子発現と逆相関していた。DNA メチル化の変化は GPAT 遺伝子プロモーターに特異的であり、脂肪酸合成酵素（FAS）やステアロイル CoA デサチュラーゼ（SCD1）など他の脂肪合成遺伝子には認められなかった。培養細胞を用いた検討により、DNA メチル化により GPAT 遺伝子プロモーター転写活性が抑制されることが明らかになった。また、妊娠期ー授乳期の母獣の栄養状態により仔マウス肝臓の GPAT 遺伝子プロモーターの DNA メチル化が変動しうることが示された。さらに GPAT 遺伝子プロモーターには DNA メチル化酵素がリクルートされることが判明した。以上より、DNA メチル化により GPAT 遺伝子はエピジェネティクス制御を受けることが示唆された。

Keyword1 DNA methylation, Keyword2 lipogenesis, Keyword3 liver

講演番号：4C27a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎27会場

筋分化抑制因子USP19遺伝子のエストロゲンによる転写調節機構の解析

Transcriptional regulation of ubiquitin-specific peptidase 19 by estrogen in myoblasts

○小川 真弘、山地 亮一、原田 直樹、中野 長久[1]、乾 博（大阪府大院・生命環境、[1]大阪女子短大）

○Masahiro Ogawa, Ryoichi Yamaji, Naoki Harada, Yoshihisa Nakano[1], Hiroshi Inui (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ., Osaka Pref. Univ., [1]Osaka Women's Junior College)

【目的】体重の約40%を占める骨格筋組織は、運動器としての役割だけでなく糖質あるいは脂質の代謝も担い、生命活動に重要な機能を果たしている。そのため骨格筋量の低下は運動機能のみならず、様々な生理機能に影響を与える。骨格筋量の減少は、主要なタンパク質分解経路であるユビキチン-プロテアソーム系の亢進によりタンパク質の分解と合成のバランスが崩れることで引き起こされる。エストロゲン（17β-エストラジオール、E2）により活性化したエストロゲン受容体（ER）はゲノムDNA に存在するエストロゲン応答配列（ERE）に結合することで機能を発揮する。骨格筋組織でER は２つのアイソフォーム（ERαとERβ）として発現しているが、それらの骨格筋組織における機能はわかっていない。骨格筋組織ではサテライト細胞が筋芽細胞へと分化し、さらに筋芽細胞が融合して筋管細胞へと分化するが、我々はこれまでの研究から、E2 が筋分化を抑制し、脱ユビキチン化酵素であるUSP19 発現を上昇させることと、筋分化抑制作用にはERαが関与していることを見出している[1]。本研究では、E2 による筋分化抑制に重要な因子であるUSP19 の発現制御機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】ERαが転写因子としてUSP19 遺伝子を調節しているかを検討するため、USP19 遺伝子の転写開始点の5'末端側上流からイントロン1 までを含む領域のゲノムDNA をクローニングし、マウス筋芽細胞株（C2C12 細胞）を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した。その結果、E2 あるいはERα選択的アゴニストに対してレポーターは応答し、ERαをノックダウンさせるとE2 によるレポーターの活性上昇は消失した。ゲノムDNA 配列を解析したところUSP19 遺伝子のイントロン1 に２つのERE（ERE1とERE2とする）が推定された。そこで、ERαとERE1 あるいはERE2 との結合をクロマチン免疫沈降法により解析したところ、E2 依存的にERαがどちらのERE にも結合することがわかった。一方、ERβを高発現させるとE2 によるUSP19 の発現上昇がタンパク質レベルで抑制され、さらにERβアゴニスト濃度依存的にE2 によるレポーター活性の上昇とUSP19 の発現上昇は減少した。またクロマチン免疫沈降法により、ERE1 においてERβアゴニスト濃度依存的にERαのEREとの結合量は減少するのに対し、ERβの結合量は増加することが判明した。以上の結果より、ERαは転写レベルでUSP19 発現を亢進させ、USP19 遺伝子 のイントロン1 に存在するERE1 においてERβが拮抗的に作用することでE2 によるUSP19 の発現上昇を転写レベルで抑制することが示された。

[1] Ogawa M. et al., (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 41455-41465

estrogen, ubiquitin-specific peptidase 19, skeletal muscle

講演番号：4C27a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎27会場

エストロゲン依存性細胞増殖における新規ERα複合体の機能解析

Analysis of a novel ER alpha complex in estrogen-dependent cell proliferation

○岡田　麻衣子、朝妻　知子、土屋　光、陳　淑チン、大竹　史明、
加藤　茂明　（東大・分生研・核内情報）
○Maiko Okada, Tomoko Asatsuma, Hikaru Tsuchiya, Shu-Ting Chen,
Fumiaki Ohtake, Shigeaki Kato (Nuclear signaling, IMCB, Univ. of Tokyo)

エストロゲンは、女性生殖器の発達・成熟を担う女性ホルモンである。その作用機構として、エストロゲンによる標的組織細胞の増殖が挙げられる。一方で、エストロゲンの細胞増殖促進作用は乳癌の増殖と密接に関連するため、その分子機構の解明は重要な課題である。このようなエストロゲンの細胞増殖促進作用は、核内受容体に属する ERαを介して発揮される。ERαはエストロゲン依存性転写因子であり、その転写機能を介して細胞周期の G1 期/S 期移行を促進する。しかしながら、他の細胞周期における ERαを介したエストロゲン作用は未知である。特に M 期においては、ERαの転写活性化能が低下することが明らかとなっており【Okada, M. et al., *EMBO Rep.* **9**, 563-8. (2008)】、ERαが新規機能を有する可能性が考えられる。そこで本研究では M 期における ERαの新規機能の探索・解析を目的とし、エストロゲン依存的な細胞増殖促進作用の解明を試みた。

まず、内在性 ERα のM期相互作用因子群を精製・同定した。その結果、HECT 型 E3 ligas UBE3C 及び脱リン酸化酵素 PP2A を同定した。機能解析を行った結果、ERα は UBE3C と複合体を形成し、エストロゲン依存性ユビキチン E3 ligase として機能することを見出した。この複合体において UBE3C は酵素活性及び基質認識サブユニットとして機能する。一方で、ERα はエストロゲン依存性活性化サブユニットとして機能することが示された。

続いて、エストロゲン依存性細胞増殖における ERα/UBE3C 複合体の寄与を検討した。その結果、UBE3C のノックダウンによりエストロゲン依存性細胞増殖が減弱することが示された。mouse xenograft model を用いた解析により、エストロゲン依存性の乳癌増大においても UBE3C は促進的に作用することが示された。UBE3C の酵素活性失活変異体においても、エストロゲン依存性の細胞増殖が減弱したことから、ERα/UBE3C 複合体によるタンパク分解機能がエストロゲン依存性細胞増殖に重要であることが示唆された。

さらに、ERα相互作用因子として取得された脱リン酸化酵素が、ERαの脱リン酸化を介してM期特異的なERα/UBE3C複合体形成に寄与する可能性が示唆されている。今後、この脱リン酸化酵素についての詳細な解析を行い、ERα/UBE3C複合体によるエストロゲン依存性タンパク分解機構の破綻と乳癌増悪との関連性を検討していく予定である。

Estrogen receptor, ubiquitin ligase, breast cancer

講演番号：4C27a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎27会場

細胞周期依存的な新規ERα複合体の同定及び機能解析

To clarify the function of S-phase specific Estrogen receptor alpha complex.

○陳淑チン、岡田麻衣子、大竹史明、加藤茂明（東大分生研）
○Shuting Chen, Maiko Okada ,Fumiaki Ohtake, Shigeaki Kato (IMCB, University of Tokyo)

The female sex hormone estrogen regulates many physiological events including formation of female secondary characteristics which are attributed to mediating of cell proliferation and differentiation. Estrogen-induced cell proliferation is primarily mediated by ERα. ERα is an estrogen-dependent transcription factor. The estrogen-induced ERα complex formation is important for ERα-target gene expression. Moreover, it was reported that the formation of ERα complex is modulated by various signalings, including cell cycle signaling. In particular, ERα could form M-phase specific complex which are involved in estrogen-dependent cell proliferation. Taken together, these implicate that ERα could form cell cycle specific-complex to regulate cell proliferation. To understand the molecular mechanism of estrogen-induced cell proliferation, we have to clarify the molecular function of cell cycle-specific ERα complexes. Since the task of ERα in S phase is still poorly understood, I biochemical identification of the S-phase specific ERα complex.

The GST-tag fused ERα protein, GST- ERα(LBD) was utilized to purify the S-phase specific ERα interactants. Firstly, ERα- positive breast cancer cell line, MCF-7 was synchronized to G1/S phase with 2 mM thymidine for 24 hours, and subsequently separated into cytoplasmic fraction and nuclear extracts. The nuclear extracts of asy- and syn-chronized cells were subjected to affinity purification with liganded GST-ERα(LBD) or GST. Subsequently, the proteins associated with GST-ERα(LBD) or GST were eluted by 30 mM glutathione. After identifying through LC-MS/MS, in addition to SRC-3 which is a well known ERα co-activator, several novel S-phase specific ERα interactants were identified.

In conclusion, the results suggest that ERα exerts novel functions in S phase. And characterisation of these S-phase specific ERα interactants will be further investigated in order to clarify the role that ERα performs in S phase.

estrogen, estrogen receptor alpha, S phase

講演番号：4C27a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ C校舎27会場

タイトル　新規 Ub 修飾による Histone Ub 化制御機構の解明

Title Identification of ubiquitin modification in ubiquitinated Histones

○土屋光、大竹史明、朝妻知子、吉村充騎、岡田麻衣子、加藤茂明（東大分生研）

○ Hikaru Tsuchiya, Fumiaki Ohtake, Tomoko Asatsuma, Atsunori Yoshimura, Maiko Okada, Shigeaki Kato (IMCB,University of Tokyo)

タンパク質の翻訳後修飾は、DNA の塩基配列のみでは説明出来ない生物機能の複雑性を説明する重要な分子メカニズムである。ユビキチン(Ub)は、76a.a から構成され、標的タンパクに共有結合することにより、修飾基として機能する。Ub 化は、モノ Ub 化(mUb 化)や異なるリジンで連結したポリ Ub 化(pUb 化)など多様な形態をとる。これらの Ub 化が異なるタンパクに認識されることにより多彩な生命機能を制御する。Histone H2A/H2B は細胞内で mUb 化が主であるとされ、転写制御に重要である。一方、H3 及び H4 は主に pUb 化を受ける。しかしながら Ub 化の種類及び機能の振り分け制御機構において不明な点が多い。Ub は低分子タンパクであるが、Ub タンパクに対する翻訳後修飾はわかっていない。そこで、本研究では様々な Ub 修飾を受けることが知られている Histone を Ub 化モデルとし、新規 Ub 翻訳後修飾の同定を試みた。

まず、Ub 化 Histone における Ub 修飾の同定のために Ub 化 Histone の精製系の構築を試みた。293T 細胞からヌクレオソーム画分を取得し、スクロースグラジエントにより高純度のヌクレオソームを取得した。精製産物を銀染色により染色したところ、ヌクレオソームおよび Ub 化 Histone のバンドを確認した。以上のことから 293T 細胞から Ub 化 Histone を取得する精製系が構築された。

次に、上記の精製産物を用いて質量分析計により Ub 化 Histone における Ub 修飾の同定を試みた。H2A/H2B における既知の Ub 化サイトが同定されたことから検出系の構築が確認された。さらに Ub における修飾の同定を試みたところ、Ub の K63 残基のアセチル化(K63Ac)を同定した。さらに、K63 Ac 特異的抗体を用いた Western Blotting による解析の結果、K63 Ac は、2 または 3 個 Ub が付加した H2A/H2B に多く存在することが明らかとなった。さらに、Ub K63Ac が Histone Ub 化に及ぼす影響を解析した。Ub K63 に対するアセチル化酵素として同定されている CBP/P300 のノックダウンにより H2A の pUb 化が減弱した。よって Ub K63Ac は、H2A の pUb 化形成に関与することが示唆された。以上より本研究では、Ub 化 Histone における新規 Ub 修飾として K63Ac を同定し、これが Histone の pUb 化促進に関与することが明らかとなった。

講演番号：4C27a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ C校舎27会場

骨組織における局所的性ホルモン合成の生理機能解析

Analyses physiological function of local sex steroids synthesis in bone

○星野　麻衣子、奥野　陽亮、井上　和樹、金藤　紫乃、辻　直也、井上　絵里奈、今井　祐記、加藤　茂明（東大・分生研）

○Maiko Hoshino, Yosuke Okuno, Kazuki Inoue, Shino Kondoh, Naoya Tsuji, Erina Inoue, Yuuki Imai, Shigeaki Kato(IMCB, Univ. of Tokyo)

活性型女性ホルモンである 17β-Estradiol(E2)は、主に卵巣において変換酵素である Aromatase（Ar）により Testosterone（T）から産生され、乳腺の発達や排卵制御、脂質代謝制御などの多様な生理作用を発揮する。一方で、閉経後女性の多くが骨粗鬆症を来すことなどから、近年骨組織においても E2 による骨量維持作用が重要視されている。骨量は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスにより維持されている。しかしながら閉経後骨粗鬆症は、このバランスが崩れ、骨吸収の比重が大きくなることで引き起こされる。このような骨量維持作用を持つ E2 の供給源は、内分泌機構により供給された血中由来の E2 であると考えられている。一方で、骨組織においても Ar の発現を認めることから、骨組織局所で合成された E2 の寄与が示唆されている。しかしながら、Ar により局所で合成された E2 による骨防御作用の詳細は不明である。そこで本研究では骨局所において合成される性ホルモンの、生体内での寄与を明らかにすることを目的とした。

はじめに骨組織における性ホルモンの作用を確認するため、精巣摘出マウスを用いた性ホルモン投与実験を行った。その結果、骨量回復は、T 投与群が DHT 投与群を上回った。また T 投与群の血中 E2 は優位な上昇を認めなかったことから、骨組織おける Ar によって産生された E2 による効果であることが示唆された。更に、血中および骨組織中の性ホルモン濃度を LC-MS/MS を用いた高感度測定により定量した。その結果、T および E2 は、血中に比較して骨組織中では高濃度に存在している事が明らかとなった。Ar の基質である T が高濃度に存在していることからも、骨組織における Ar による局所 E2 合成の重要性が示唆された。

このような Ar の生体内高次機能を明らかにするためには、Ar 遺伝子欠損マウスの解析が有用である。そこで本研究では、Ar flox マウスを作出、CMV-Cre マウスと交配し、全身性欠損マウスを作出した結果、Ar の欠損、子宮萎縮や精嚢肥大を確認した。この結果より、作出した flox マウスが正しく機能することが確かめられた。次に、Ar は骨組織中では骨芽細胞特異的に発現していることから、骨芽細胞特異的 Ar 欠損マウスを作出し、骨芽細胞内の Ar による、局所的な性ホルモン合成の生理作用の解明に向けて、現在解析を進めている。

sex steroid hormones, aromatase, bone

講演番号：4C27a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ C校舎27会場

軟骨細胞分化における男性ホルモン受容体機能の解明

The function of androgen receptor in chondrocytogenesis

○司源、ヨンミンヨン、井上和樹，山本陽子、今井祐記、加藤茂明（東大分生研）
○Yuan Si, Min-Young Youn, kazuki Inoue, Yoko Yamamoto, Yuuki Imai, Shigeaki Kato (IMCB, the University of Tokyo)

Chondrocytogenesis is the process by which cartilage is formed from condensed mesenchyme at growth plate, the ends of long bones, where longitudinal bone growth occurs. This process starts from mesenchymal stem cell (MSC), and then goes to chondrocyte proliferation and differentiation into hypertrophic chondrocytes. It is documented that androgen exerts the function through binding with the androgen receptor (AR) and may be involved in the regulation of chondrocytogenesis because AR is abundantly expressed in most cells of growth plate regardless of gender. However, the molecular mechanism of AR in chondrocytes has still been unclear. Thus, the purpose of this study is to clarify the molecular mechanism of AR in chondrocytogenesis *in vitro* and *in vivo.*

To establish the chondrocyte differentiation model *in vitro*, C3H10T1/2 (10T1/2) cell line was utilized and treated with bone morphogenetic protein 2 (BMP2) via micro mass culture. Then the mRNA levels of the marker genes in chondrocytes during the differentiation process of 10T1/2 cells were analyzed. As a result, at day 5, the mass of the cultured 10T1/2 cells differentiated into proliferative chondrocytes, whereas, at day 9, the cells were divided into hypertrophic chondrocytes. In the chondrocytogenesis experiment, the treatment of Dihydrotestosterone (DHT), an active androgen, could induce the expression of a key transcription factor of chondrocytogenesis, *Sox9*, and proliferative chondrocyte marker gene *Col2a1* spatially and temporally, suggesting that AR may activate the chondrocytogenesis via activation of expression of *Sox9*. Meanwhile, the chondrocyte-specific ARKO mice are produced to determine the direct biological function effects of AR in longitudinal bone growth. As the results of analyses of the chondrocyte-specific ARKO mice, there was no significant different weight phenotype between hypertrophic chondrocyte specific ARKO mice and WT mice in or bone length. Thus, more precise phenotypic analyses including the proliferative chondrocytes specific ARKO mice should be required, such as growth plate zone or pubis symphysis.

講演番号：4C28a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ C校舎28会場

ミズクラゲ幼生の変態を誘導する化合物のスクリーニング

Screening for substances that induce metamorphosis of the moon jellyfish polyps.

○国吉 久人、奥村 衣澄、黒田 理絵、小路 淳、荒川 賢治[1]、斎藤 臣雄[2]、長田 裕之[2]
（広島大院・生物圏、[1]広島大院・先端研、[2]理研基幹研・ケミカルバイオロジー）
○Hisato Kuniyoshi, Izumi Okumura, Rie Kuroda, Jun Shoji, Kenji Arakawa[1], Tamio Saito[2], Hiroyuki Osada[2] (Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ., [1]Grad. Sch. AdSM Hiroshima Univ., [2]Chem. Biol. RIKEN ASI)

【目的】刺胞動物ミズクラゲ(*Aurelia aurita*)のライフサイクルは、無性世代(ポリプ世代)と有性世代(クラゲ世代)を繰り返す。ポリプは、夏の間は出芽や分裂によって無性的に増殖し、冬期に海水温が低下すると、有性世代の前段階であるストロビラ幼生へと変態し、さらにクラゲ形態の最初期幼生であるエフィラ幼生を複数匹放出する。このような無性世代から有性世代への変態過程はストロビレーションと呼ばれる。ストロビレーションは、ポリプの触手の直下にくびれが現れ、足盤側に向けて節が１つずつ増えていく分節形成期と、それぞれの節が1匹のエフィラの形態に変化する形態形成期の２段階で構成される。演者らは、ストロビレーションの分子機構を解明するための分子プローブの獲得を目的として、理研 NPDepoの化合物ライブラリーを用いたストロビレーション誘導物質のスクリーニングをおこなった。
【方法】25℃でポリプを飼育した場合、ストロビレーションは決して起こらない。24穴プレートの各ウェルに3～5個のポリプを移し、試料物質10μgを含む濾過海水1 mL中で、25℃にて培養し、ストロビレーションが起こるかどうかを観察した。この生物検定法を用いて、理研 NPDepoの化合物ライブラリーの456化合物について、ストロビレーション誘導活性を調べた。
【結果】スクリーニングの結果、プロスタグランジン(PG)類の生合成阻害剤であるIndomethacinがストロビレーション誘導活性を示すことが見出された。Indomethacinは、ポリプからストロビラを経てエフィラ放出に至るまでのストロビレーション過程を完全に再現した。Indomethacinを投与してから最初のくびれが現れた段階、すなわち分節形成が開始した直後にIndomethacinを除去した場合でも、ストロビレーションはそのまま最後まで進行して、エフィラが放出された。このことから、Indomethacinは非可逆的に有性世代への運命を決定する作用を持つことが示唆された。IndomethacinがPG類の生合成阻害剤であることから、内在性のPG類が生理的な変態抑制因子である可能性が考えられた。しかし、IndomethacinとPG標品(PGE_2または$PGF_{2\alpha}$)の同時投与により変態誘導が抑制されるか調べた結果、いずれのPGも抑制効果を示さなかった。さらに、Indomethacin以外のPG類生合成阻害剤５種(Aspirin, Diclofenac, Ibuprofen, NS398, Bromoenol lactone)について生物検定をおこなったが、いずれも誘導活性を示さなかった。以上の結果から、Indomethacinによるストロビレーション誘導効果は、PG類の生合成阻害によるものではなく、未知の標的分子への作用に起因するものと考えられる。

screening, jellyfish, metamorphosis

講演番号：4C28a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ C校舎28会場

ミズクラゲ幼生の変態を阻害する化合物のスクリーニング

Screening for substances that inhibit metamorphosis of the moon jellyfish polyps.

○黒田 理絵、奥村 衣澄、小路 淳、荒川 賢治[1]、斎藤 臣雄[2]、長田 裕之[2]、国吉 久人
（広島大院・生物圏、[1]広島大院・先端研、[2]理研基幹研・ケミカルバイオロジー）
○Rie Kuroda, Izumi Okumura, Jun Shoji, Kenji Arakawa[1], Tamio Saito[2], Hiroyuki Osada[2], Hisato Kuniyoshi （Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ., [1]Grad. Sch. AdSM Hiroshima Univ., [2]Chem. Biol. RIKEN ASI）

【目的】刺胞動物ミズクラゲ（*Aurelia aurita*）のライフサイクルは、無性世代（ポリプ世代）と有性世代（クラゲ世代）を繰り返す。ポリプは出芽や分裂によって無性的に増殖し、冬期に海水温が低下すると、有性世代の前段階であるストロビラ幼生になる。ストロビラは胴体部に複数の節を持ち、１つ１つの節が盤へと形態変化する。さらに盤は一枚ずつ遊離してエフィラ幼生となり、成長して成体のクラゲとなる。ポリプからストロビラを経てエフィラに至る変態過程はストロビレーションと呼ばれ、無性世代から有性世代への転換期に位置づけられる。演者らは、ストロビレーションを司る細胞内および細胞間シグナル伝達因子群を同定するための分子プローブの獲得を目指して、理研 NPDepoの化合物ライブラリーを用いたストロビレーション阻害物質のスクリーニングをおこなった。
【方法】スクリーニングには以下の２つの生物検定法を用いた。①10℃アッセイ： 研究室内でポリプを25℃で飼育した場合、ストロビレーションは決して起こらず、ポリプとして無性増殖を続ける。25℃で飼育したポリプを10℃のインキュベータに移すと、約5週間でストロビレーションが開始し、約6週間でストロビラになる。ストロビレーションへの運命決定が起こる前の4週間目にポリプ3～5匹を24穴プレートに移して、試料物質10μgを含む濾過海水1 mL中で、引き続き10℃で培養する。その後、ストロビレーションが阻害されるかどうか、形態異常も含めて観察した。②インドメタシン（IM）アッセイ：通常25℃ではストロビレーション起こらないが、インドメタシンを投与することにより、ストロビレーションを人工的に誘導できる。50μM IMを投与した場合、5～6日目でストロビレーションが開始し、10～12日目にエフィラが遊離する。25℃で培養したポリプ3～5匹を、IM（50μM）と試料物質10μgを含む海水1 mL中で、25℃で培養し、IMによるストロビレーションの誘導が阻害されるか観察した。
【結果】理研 NPDepoの化合物ライブラリーの456化合物について生物検定をおこなった結果、４化合物がストロビレーション阻害活性を示した。そのうちの１つの化合物（isoxazoline 化合物）は、軽度の形態異常が観察されたものの、10℃アッセイとIMアッセイの両方で強い阻害活性を示した。残りの３つの化合物（NPD3433, NPD237, triazole-sulfanyl-acetoamide 誘導体）は、10℃アッセイではストロビレーションを阻害し、IMアッセイではストロビレーションの開始を3～4日遅らせた。これら３化合物は、いずれも致死や形態異常などの毒性を全く示さなかった。今後は、各物質について容量依存性や可逆性など、活性の特徴づけを進める予定である。

screening, jellyfish, metamorphosis

講演番号：4C28a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ C校舎28会場

ペプチドーム解析によるミズクラゲ幼生の変態関連ペプチドの探索

Peptidome analysis for metamorphosis-related peptides in the moon jellyfish.

○吉岡 沙弥香、辻田 菜摘、奥村 衣澄、小路 淳、荒川 賢治[1]、国吉 久人
（広島大院・生物圏、[1]広島大院・先端研）
○Sayaka Yoshioka, Natsumi Tsujita, Izumi Okumura, Jun Shoji, Kenji Arakawa[1], Hisato Kuniyoshi （Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ., [1]AdSM Hiroshima Univ.）

【目的】刺胞動物ミズクラゲ(*Aurelia aurita*)のライフサイクルは、無性世代[プラヌラ→ポリプ]と有性世代[ストロビラ→エフィラ→クラゲ]を繰り返す。ポリプは出芽や分裂によって無性的に増殖し、冬期に海水温が低下すると、有性世代の前段階であるストロビラになる。ストロビラは胴体部に複数の節を持ち、１つ１つの節が形態変化して盤になり、皿を数枚重ねたような形態になる。さらに、盤が一枚ずつ遊離してエフィラとなり、成長して成体のクラゲとなる。ポリプ→ストロビラ→エフィラの変態過程はストロビレーションと呼ばれる。ストロビレーションは、胴体部の節が口側から足側に向けて1つずつ増えていく分節形成期と、完成したそれぞれの節がエフィラの形態へと変化していく形態形成期の２段階に分けられる。

ミズクラゲと同じ刺胞動物門に属するヒドラやウミヒドラでは、多数のペプチド性物質が同定されており、いくつかは形態形成や変態に関与することが示されている。例えば、ヒドラの口側の分化を誘導するアミノ酸12個のペプチドHeady [Lohmann & Bosch (2000) Genes Dev. 14: 2771-2777]や、ウミヒドラの着生変態を誘導するLWamideペプチド[Schmich et al. (1998) Dev. Genes Evol. 208: 267-273]などが報告されている。これらの知見を踏まえ、ストロビレーション過程の分節や形態形成を制御する因子群の一部は、ペプチド性物質であることが予想される。

本実験では、ミズクラゲ幼生のペプチド性物質の網羅的同定とカタログ化を目指して、ポリプおよびストロビラからのペプチドの抽出法を確立した。さらに、抽出物を逆相HPLCに供し、クロマトグラムを比較して、各変態ステップに特異的なペプチドの探索を試みた。

【方法】ポリプまたは分節形成期ストロビラを冷アセトン中でホモジナイズして脱脂した後、残渣を冷90%メタノールで抽出してペプチド画分を得た。その後熱処理によって内在性プロテアーゼを失活させた後、冷2% NaCl水溶液で抽出してタンパク質画分を得た。90%メタノール抽出物(ペプチド画分)を凍結乾燥した後、水に溶解し、ODSカラムを用いた逆相HPLCに供した。

【結果】100匹のポリプまたは分節形成期ストロビラを出発材料として、予備実験をおこなった。上記抽出法により、ポリプまたはストロビラ1匹当たり、90%メタノール画分ではそれぞれ4.1μgと6.9μgのペプチドが、2% NaCl画分ではそれぞれ0.3μgまたは1.0μgのタンパク質が回収された。90%メタノール画分を逆相HPLCで分析した結果、クロマトグラム上に、ポリプでは32本、ストロビラでは25本の主要ピークが検出された。このうち、ポリプにのみ検出されたピークは8本、ストロビラのみのピークは1本であった。今後は全ての主要ピークのペプチドを分取し、アミノ酸配列分析、質量分析などにより、構造解析を進めていく予定である。

peptide, jellyfish, metamorphosis

講演番号：4C28a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎28会場

ミズクラゲ幼生の変態関連遺伝子の探索

Molecular analyses of metamorphosis-related genes in the moon jellyfish.

○辻田 菜摘、桑原 宏行、矢中 規之、小路 淳、荒川 賢治[1]、国吉 久人
（広島大院・生物圏、[1]広島大院・先端研）
○Natsumi Tsujita, Hiroyuki Kuwahara, Noriyuki Yanaka, Jun Shoji, Kenji Arakawa[1], Hisato Kuniyoshi （Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ., [1]AdSM Hiroshima Univ.）

【目的】刺胞動物ミズクラゲ（*Aurelia aurita*）は、その生活史において有性世代と無性世代を交互に繰り返す。成体のミズクラゲは雌雄異体であり、雄クラゲから放精された精子は、雌クラゲの体内で卵と受精する。受精卵は雌クラゲの保育嚢内で分裂を繰り返して、繊毛を有した楕円形のプラヌラ幼生となり、海水中に泳ぎだして、貝殻や岩などの適当な基盤上に付着し、ポリプに変態する。ポリプは小さなイソギンチャクのような形態をしており、出芽や分裂によって無性的に増殖していく。冬期になって海水温が低下すると、ポリプは有性世代の前段階であるストロビラ幼生となる。ストロビラは胴体部に複数の節を持ち、１つ１つの節がクラゲ型の形態に変化した後、１枚ずつ遊離してエフィラ幼生となり、さらに成長して成体クラゲとなる。本研究では、ポリプからストロビラを経てエフィラに至る変態過程（ストロビレーション）の分子メカニズムの解明を目指し、変態の進行に伴って発現量が変動する遺伝子群の探索を試みた。また、実験に先立ち、ストロビレーション過程の形態学的および発生学的特徴の記載をおこなった。
【方法と結果】実験室内では、25℃で維持したポリプ・クローン系統を 10℃に移すことによって、人工的にストロビレーションを誘導することができる。ストロビレーションは分節形成期と形態形成期の２段階に分けられる。分節形成期には、ポリプの触手のすぐ下にくびれが現れ、その後くびれを起点として口側から足側へと節が１つずつ増えていく。形態形成期には、節の形成が終わり、赤い色を帯びながら、それぞれの節が徐々にエフィラの形態に変化する。エフィラの形態が完成すると、拍動運動を始め、遊離してエフィラとなる。また、最初のくびれが現れた段階、すなわちストロビレーションの開始直後のストロビラを 25℃に戻しても、その後ストロビレーションは最後まで進行し、エフィラを放出した。このことは、ストロビレーションが開始した段階で、既に有性世代への運命づけが完了していることを意味する。次に、変態過程に伴って発現量が変化する遺伝子群（DEG; Differentially-Expressed Genes）の探索をおこなった。まず、節の形成過程に関与する遺伝子群の獲得を目指して、ポリプと分節形成期ストロビラ（節の数が3つ以上）のそれぞれから Proteinase K 法（Schroth et al., 2004）により total RNA を調製し、Differential display 法（Yanaka et al., 2003）による DEG の探索をおこなった。現在までのところ、増幅された遺伝子断片 142 本のうち、10 本のポリプ特異的遺伝子と、17 本の分節形成期ストロビラ特異的遺伝子を見出した。また、ストロビレーションに伴って発現量が増加または減少する遺伝子断片は、それぞれ 5 本と 8 本あった。今後は、それぞれの DEG の増幅断片について塩基配列分析を進めるとともに、発現解析をおこなう予定である。

gene, jellyfish, metamorphosis

講演番号：4C28a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎28会場

深海性ヨコエビが持つ多糖分解酵素の性質

Properties of polysaccharide hydrolases in the deep-sea amphipod

○小林 英城（海洋機構）
○Hideki Kobayashi（JAMSTEC）

【目的】地球上には極地・砂漠・深海・高地など多種多様な環境が存在する。低温、高温、乾燥、高水圧などの環境因子により、極限環境微生物のみ生存可能な過酷な環境も存在する。中でも地球の表面積の約半分を占める深海環境、特に深度7,000m を超える超深海領域では魚類の存在が確認されていないほど、過酷な環境である。しかしながら、深度10,000m を超える世界最深部マリアナ海溝チャレンジャー海淵において、1960年代からヨコエビ類やナマコ類の存在が確認されている。果たして、これら超深海生物は超高静水圧・低温・貧栄養の環境にどのように適応して「生息」しているのか、または「生息」しているわけではなく、本来の生息海域から力つきて落ちてきただけなのか、その生態には不明な点が多い。そこで、超深海生物の生態を明らかにすることを目的として、マリアナ海溝チャレンジャー海淵から採取されたヨコエビ類を用いて、その食性について検討した。
【方法】マリアナ海溝チャレンジャー海淵より採取されたヨコエビ（和名：カイコウオオソコエビ）を数個体すりつぶし、各種種酵素活性の検出を試みた。しかし、カイコウオオソコエビ体液に含まれる夾雑物が、各種酵素活性測定に支障を与えた。そこで基質0.5%を含む寒天プレートにカイコウオオソコエビ粉砕液を滴下し、室温にて静置後、ハロー形成の有無にて酵素活性の検出を行った。次に、カイコウオオソコエビ粉砕液に６０％(w/v)硫安沈殿を行い、タンパク質溶液を調製し、検出できた酵素活性について、活性量の測定を行った。なお、カイコウオオソコエビの消化酵素群に多糖分解酵素が含まれていたため、薄層クロマトグラフィーにて、酵素反応物の検討を行った。
【結果】カイコウオオソコエビはサバの切り身を使ったベイトトラップにて捕獲できるため、消化酵素としてプロテアーゼの存在は予想しており、検出もできた。さらにアミラーゼを始めとした植物性多糖類の分解酵素まで消化酵素として検出できた。また、α-グルコシダーゼの活性も検出でき、でんぷん質からグルコースまでの分解が確認できた。でんぷんは植物由来以外にもグリコーゼンとして深海魚に大量に蓄積されている。したがって、深海魚の死体が落ちてきた場合、アミラーゼは栄養を得るための主要な消化酵素であると考えられる。一方、消化酵素の至適反応 pH は 6.0 以下の酸性領域にあった。チャレンジャー海淵の環境pH は 8.0 付近であり、消化管内は酸性に保たれていることが明らかとなった。

Keyword1, Keyword2, Keyword3 Mariana trench, deep-sea animal, polysaccharide hydrolase

講演番号：4C28a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎28会場

軟体動物組織再生へのレチノイン酸の関与

Retinoic acid-mediated regeneration of molluscan tissues

○高橋　勇二、長澤　香幸、雑賀　絢、渡邊　弘明、水上　薫、金子　浩子、伊東　翼、中野　春男、梅村　真理子、高橋　滋（東京薬科大学・生命科学）

○Yuji Takahashi, Kayuki Nagasawa, Aya Saiga, Hiroaki Watanabe, Kaoru Mizukami, Hiroko Kaneko, Tsubasa Ito, Nakano Haruo, Mariko Umemura, Shigeru Takahashi (School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences)

【目的】イボニシ（Thais clavigera）は新腹足類に属する巻き貝で、有機スズの海洋汚染によって雌イボニシに輸精管やペニスなどの雄性付属生殖器官の異形成が生じるインポセックスを呈する。有機スズはレチノイドX受容体（RXR）のアゴニストであること、また、レチノイン酸の投与によっても有機スズと同様にインポセックスを発症することが示された。イボニシのレチノイン酸シグナルを介した組織異形成から、我々は、イボニシの組織再生を予想した。今回、ペニス再生の初期過程を組織学的に解析し、再生様式とレチノイン酸の関与を明らかにすることを試みた。

【方法】茨城県ひたちなか市阿字ヶ浦海岸、および、神奈川県真鶴半島で採取したイボニシを麻酔し、触角あるいはペニスを切断し、その後の再生過程を12週間観察した。また、レチノイン酸合成阻害剤のシトラールを投与し、経時的に解剖し、組織をDavidson液で20時間固定後、定法に従いパラフィン切片を作製した。脱パラフィンの後にヘマトキシリン・エオジン染色、あるいは、抗PCNA抗体を用いた免疫組織染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察した。また、連続切片を用いて組織の３次元構成モデルを構築した。

【結果】ペニスの切断の１日後に、切断部位は単層の細胞で覆われ、その下部に浸潤細胞の集積が認められた。切断４日目には再生芽が、また、先端に管腔状の凹みが形成された。切断７日目には再生部位に神経が認められ、輸精管上皮を含む再生部位の細胞に分裂象が観察された。再生１４日目には再生組織の伸長が認められ、PCNA陽性細胞が組織の伸長部位に多数認められた。再生１２週間後には、ペニス内部に輸精管、神経、筋肉組織の再形成が観察され、輸精管はジグザグ状に折れ曲がり、ペニス再生組織が明らかとなり、機能的回復を示唆する組織像をえた。触角も同様に再生した。また、レチノイン酸合成阻害剤のシトラールの投与により、再生速度の低下が認められた。これらの結果は、イボニシ組織の部分切除組織は、再生芽を介した付加形成により再生されること、また、再生にはレチノイン酸が関与することを示唆している。

molluscs, regeneration, retinoic acid

講演番号：4C28a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ C校舎28会場

タイトル：尿に由来する揮発性肺がんマーカーの探索

Title:Urinary Volatile Compounds as a Biomarker for Lung Cancer

○花井陽介、下野健[1]、松村幸一[2]、Anil Vachani[3]、Steven Albelda[3]、山崎邦郎[2]、Gary Beauchamp[2]、岡弘章[1]（名大・革新ナノバイオデバイス研究セ、[1]パナソニック㈱、[2]モネル、[3] ペンシルバニア大・医療セ、）

○Yosuke Hanai, Ken Shimono[1], Koichi Matsumura[2], Anil Vachani[3], Steven Albelda[3], Kunio Yamazaki[2], Gary Beauchamp[2], Hiroaki Oka[1] (Nagoya University's FIRST Research Center, [1]Panasonic, [2]Monell, [3] Penn Lung Center)

【目的】肺がんは、がんによる死亡原因のトップで約 25%を占めている。初期の肺がんはほとんど症状が出ないため、早期に診断することは非常に困難である。高い死亡率を低下させるためには、簡便でかつ高感度・高特異的な肺がんの早期診断方法の開発が強く望まれている。本研究では、肺がん患者と健常者の尿サンプルを用い、尿に由来する揮発性有機化合物を比較することによって、肺がんの指標となるバイオマーカーを探索した。

【方法】肺がん患者（20名）および健常者（20名）から回収した尿サンプルを用いて以下の分析を行った。段階的に限外ろ過処理を行い、最大分子量3000 Da以下の化合物を含む尿サンプルを得た。尿中の揮発性有機化合物の抽出は、固層マイクロ抽出法（SPME法）を利用した。尿サンプルを入れたバイアルへSPMEファイバーを挿入し、45℃で50分間抽出を行った後、ガスクロマトグラム飛行時間型質量分析計（GCT Premier、ウォーターズ）で分析を行った。得られた分析データを統計学的処理を行い、肺がんマーカー候補となる揮発性有機化合物を絞込んだ。さらに、得られた肺癌マーカー候補はバイオマーカーとしての有用性をROC曲線により評価した。

【結果】肺がん患者と健常者を区別できる9種類の肺がんマーカー候補を得た。これらの肺がんマーカー候補に対してROC解析を行った結果、高い感度（85-95%）かつ高い特異度（70-100%）が得られた。AUC値については0.79-0.96が得られ、肺がんマーカーとして信頼できることが示された。さらに、肺がんマーカー候補の一つは、主成分分析の結果から腺癌と扁平上皮癌を区別できる可能性も示唆された。本研究において特定された揮発性肺がんマーカーは、肺がんを診断するための非侵襲的なバイオマーカーとして臨床的可能性を有しているといえる。

Lung cancer, Biomarker, Volatile organic compounds

講演番号：4C28a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ C校舎28会場

ウシリポカリンの生体内分布

Bodily distribution of a bovine lipocalin

Tamar Japaridze、○福田 健二、片山 翔太[1]、木田 克弥、Rupert Bruckmaier[2]、浦島 匡、（帯畜大院・畜産衛生、[1]帯畜大・畜産生命、[2]Bern Unv.・Vet. Physiol.）
Tamar Japaridze, ○Kenji Fukuda, Shota Katayama[1], Katsuya Kida, Rupert Bruckmaier, Tadasu Urashima (OUAVM・Anim. Food Hyg., [1]OUAVM・Life Sci. Agric., [2]Bern Univ.・Vet. Physiol.)

【目的】ウシ初乳に見出されたリポカリンbovine colostral odorant-binding protein (bcOBP)は、分子量約18kDaの酸性タンパク質である。類縁タンパク質から推定されるbcOBPの機能は疎水性低分子化合物の結合・運搬であるが、生体内での役割を始め、その基本的性質の詳細は不明である。本研究は、bcOBPの生体内分布の解明を目的としておこなった。
【方法】ウシ初乳、常乳、唾液、鼻粘液、涙、汗、尿、羊水、膣分泌液を帯広畜産大学フィールド科学センターで飼育する健康な泌乳期のフリージアンーホルスタイン種3頭から吸い取りあるいは拭き取りにより採集した。各体液から80%飽和硫安沈殿によりタンパク質画分を回収し、生理食塩水に再溶解した。血液はベルン大学で飼育する健康なブラウンスイス種3頭の頚静脈から分娩50日前、当日、20日後に採集し-20℃で保存したものを使用した。融解した血液に凝集防止剤を添加し、20分間室温で放置したのち遠心分離により血漿を回収した。各試料中のタンパク質を12%SDS-PAGEにより分離し、PVDF膜に転写したのち、抗bcOBPモノクローナル抗体を一次抗体、HRP標識抗マウスIgMモノクローナル抗体を二次抗体として用いウエスタンブロット解析をおこなった。各試料中のタンパク質量は、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として用い、ブラッドフォード法により見積もった。病理解剖に供された泌乳期のウシから各種組織を採集し、リアルタイムPCR法によりbcOBPをコードするmRNAの発現定量解析をおこなった。
【結果】ウエスタンブロット解析により、泌乳期のウシにおいて、bcOBPは初乳、常乳、唾液、鼻粘液、羊水、膣分泌液、血漿に存在することが明らかとなった。存在の有無に関して、個体間に差異は認められなかった。また、分娩直後に採集した初乳中のbcOBP濃度は181±39μg/Lであり、全乳中におけるbcOBP濃度は分娩後少なくとも10日までほぼ一定であった。乳以外の各体液中におけるbcOBP濃度は、乳と同程度か、より少ないと推定された。血漿中のbcOBP濃度は分娩日に最も高く、分娩後20日では有意に低下した。リアルタイムPCRの結果、mRNA発現量は涙腺で最も高かった。乳腺組織、耳下腺、扁桃腺、気道上皮組織、鼻粘膜組織、嗅覚上皮、鋤鼻器官、子宮内膜組織、膣粘膜組織、リンパ節やその他臓器にもmRNAが認められたが、その発現量は涙腺の10^{-3}～10^{-6}程度であった。また、個体間における差異も認められた。タンパク質発現では、bcOBPが鼻口腔周辺、生殖器周辺、乳、および血液に分布すると示されたが、mRNA発現の結果とは必ずしも一致するものではなく、涙腺での転写後調節や幅広い組織における極微量なタンパク質発現の可能性が示唆された。生体内分布パターンおよびアミノ酸配列（CxxxCモチーフ）の共通性から、bcOBPはフェロモンの結合・運搬への関与が示唆された。

milk, odorant-binding protein, pheromone

講演番号：4C28a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ C校舎28会場

Adiponectinが皮膚中I型コラーゲン合成に及ぼす影響

Effects of adiponectin on type I collagen synthesis in skin

○山根 拓実、佐藤 ますみ、坂本　真美、服部　一夫、大石　祐一（東農大応生科・栄養）
○Takumi Yamane, Masumi Sato, Mami Sakamoto, Kazuo Hattori, Yuichi Oishi (Tounodai)

【目的】現在の日本人の栄養状態は、戦後と比較して、脂肪の摂取が増加している。これまでに筆者らは、高脂肪食摂取によって、血中adiponectin濃度が減少した状態では、皮膚のハリや弾力に関与するI型コラーゲンの量が減少することを報告した[1)]。そこで本研究では、Adiponectinが皮膚中I型コラーゲンに及ぼす影響について、正常ヒト皮膚線維芽細胞を用いて検討した。
【方法】正常ヒト皮膚線維芽細胞（Detroit 551）にfull length adiponectinまたはglobular adiponectinを3, 10 μg/mlの濃度で培地に添加し、72時間培養後、type I tropocollagen量をWestern blotting法にて測定した。
【結果】培地中の type I tropocollagen 量は、full length adiponectin または globular adiponectin 添加によって顕著に増加した。以上のことから、full length adiponectin 及び globular adiponectin が、直接的あるいは間接的に I 型コラーゲン合成を制御している可能性が示唆された。現在、これらの制御メカニズムを検討中である。

1) Yamane et al., ***Mol. Nutr. Food Res.***, 54, S53-S61, (2010)

skin, collagen, adiponectin

講演番号：4C28a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ C校舎28会場

表皮角化細胞におけるTGF-β1のセラミド合成への影響

Effect of TGF-β1 on ceramide synthesis in keratinocytes

○村松　愛美、山根　拓実、服部　一夫、大石　祐一（東農大応生科・栄養）
○Aimi Muramatsu, Takumi Yamane, Kazuo Hattori, Yuichi Oishi (Tounodai)

【目的】体内水分の蒸散抑制ならびに外部刺激からの身体保護などに関わる重要な器官である皮膚は、栄養条件による影響を受けやすいことが知られている。我々はこれまでに、高脂肪食条件下で、ラット皮膚中のⅠ型トロポコラーゲンおよびヒアルロン酸量が減少することを見出し、その減少には皮膚中のTGF-β1の減少が関与していたことを示した。また、セラミド合成の律速酵素であるserine palmitoyltransferase（SPT）の減少を介して、皮膚中のセラミド量が低下することも報告した。しかし、SPTを制御するメカニズムに関しては、未だ明確になっていない。そこで本研究では、TGF-β1が、SPTの制御にも関与しているか否かを検証した。
【方法】正常ヒト表皮角化細胞は、HuMedia-KG2（KURABO）培地を用いて培養した。サブコンフルエントに達するまで培養した後、96穴プレートに細胞を播種した。その後、TGF-β1（30 ng/ml）を添加し、0、12、24、36、48 h後に細胞からtotal RNAを抽出し、リアルタイムPCR法にて*SPT*のmRNA量を測定した。
【結果】TGF-β1の添加によって、*SPT*のmRNA量は経時的に増加し、12、24、36、48 hで有意に増加した。この増加は、48 hで最も顕著であった。以上のことから、表皮角化細胞においてTGF-β1がSPTの遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。現在、TGF-β1の下流シグナルを検討中である。

keratinocyte, TGF-beta1, serine palmitoyltransferase

講演番号：4C29a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ C校舎29会場

タイトル　DNAメチル化レベル低下によりDNA損傷が誘導されるゲノム領域の同定

Title Identification of DNA damaged regions induced by a decrease in DNA methylation levels

○吉村　健，杉村　和人[1]，緒方　正人[1]，奥村　克純[2]（三重大院生資，[1]三重大院医，[2]三重大院生資，三重大院地域イノベコアラボ）

○Takeshi Yoshimura, Kazuto Sugimura[1], Masato Ogata[1], Katsuzumi Okumura[2] (Bio., Grad. sch., Mie Univ., [1]Grad. Sch. of Med., Mie Univ., [2]CoreLab, Grad. Sch. of Reg Innov Stu, Mie Univ.)

【目的】DNAのメチル化は，遺伝子発現やクロマチン構造の制御に関わるエピジェネティック修飾のひとつである。一方、DNAメチル化酵素 (DNMT) の欠損や減少によりDNA損傷が誘導されることから、ゲノム安定性に寄与していると考えられている。しかし、DNMTの欠損や減少が引き起こすDNA損傷が具体的にどのような領域でおこるのか，またその領域の配列の特徴は不明である。

【方法】ヒト網膜上皮細胞（RPE細胞）をDNMT阻害剤である5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)で処理し，免疫染色によりDNA二本鎖切断マーカーであるγ-H2AXの発現レベルの上昇を検討した。また，5-aza-dC処理したRPE細胞に対し，クロマチン免疫沈降法 (ChIP)によりγ-H2AXの蓄積する領域を回収し，ヒトセントロメア周辺のCpGリッチなリピート配列であるhuman satellite 2, human satellite αの回収率をPCR，リアルタイムPCRにより解析した。一方で，DNAメチル化レベルの低下と染色体脆弱性発現との関連を検討するため，染色体脆弱部位と共局在することが報告されているp53 binding protein 1（53BP1）の5-aza-dC処理細胞における発現レベルを免疫染色により検討した。

【結果】5-aza-dCで処理した細胞においてγ-H2AXの発現レベルが上昇したことから、DNA二本鎖切断が生じることが明らかとなった。また、γ-H2AXの発現レベルは細胞周期におけるS期の核で顕著に増加したことから、DNA複製依存的にDNA損傷が誘導されることが示唆された。そこで，ChIPによりDNA二本鎖切断マーカーであるγ-H2AXの蓄積するDNA領域を回収し，human satellite 2やhuman satellite αの定量解析を行ったところ，5-aza-dC処理細胞においてこれらの配列の回収率が増加したことから，DNMTの阻害によりCpGリッチな配列においてDNA損傷が起きていることが示唆された。また，53BP1のfoci形成が5-aza-dC処理細胞において顕著に上昇したことから，DNAのメチル化と染色体脆弱性との関連性も示唆された。以上の結果から，DNAメチル化レベルの低下によるCpG配列における複製依存的なDNA損傷が生じることや，DNAメチル化レベルの低下が染色体脆弱性をもたらすことが示唆された。そこで，DNAメチル化レベルの低下によりDNA損傷が起こる領域をゲノム全体で網羅的に同定するために，次世代シークエンサーを用いたChIP-sequence法による解析を現在行っているところである。

Keyword1 DNA methylation, Keyword2 chromosome fragility, Keyword3 ChIP-sequence

講演番号：4C29a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ C校舎29会場

ケラチノサイトのEGFによるダイオキシンの毒性発現抑制メカニズム

Inhibitory mechanism of dioxin toxicity to keratinocytes by EGF

○藤野貴広、重川庸介、佐藤寛之、能丸幸治[1]、岩田久人[1]（愛媛大・総科研、[1]愛媛大・沿岸）

○Takahiro Fujino, Yosuke Omokawa, Hiroyuki Sato, Koji Nomaru[1], Hisato Iwata[1] (Ehime Univ. INCS, [1]Ehime Univ. CMES)

動物に対するダイオキシン類の毒性は発癌性、生殖毒性、免疫毒性など多岐にわたり、その毒性発現には生物種差が存在する。この生物種に見られる感受性の差はダイオキシンに対するダイオキシン受容体（AHR）の結合親和性と相関が認められるが、一方で皮膚に対するTCDDの毒性には全くその相関が認められない。そこで、ダイオキシン受容体欠損（AHR KO）マウスからケラチノサイトを単離し、様々な生物種由来のAHR・cDNAを導入することで安定的にAHRを発現するケラチノサイトを得た。これらの細胞にダイオキシン（TCDD）を作用させた所、ケラチノサイトにおけるCYP1A1の発現誘導は恒常的活性化（constitutively-active）AHRを発現する細胞を除き、ほとんど認められなかった。この結果は、ヒト・ケラチノサイトにおいて培地に含まれるEGFがTCDDによるAHRを介したCYP1A1の発現誘導をブロックするという報告と一致した。これらの細胞をEGF非存在下、またはEGF受容体阻害剤存在下で前培養を行った後にTCDDを作用させた所、CYP1A1の高い発現誘導が認められた。これら結果は、EGFシグナルによるAHRを介したCYP1A1の発現誘導阻害は他の生物種でも認められることや生物種間のAHRの違いには依存しない事を示した。EGFシグナルによるAHRを介したCYP1A1発現誘導の阻害メカニズムを解析する目的で、EGFシグナル伝達系の下流に位置する様々なキナーゼ阻害剤を作用させた所、ERKの上流に位置するMEK1及び2の阻害剤（U-0126）が若干の阻害抑制効果を示したが、JNK及びMAPKに対する阻害剤では抑制効果は全く認められなかった。一方、26Sプロテアソーム阻害剤（MG132）を作用させると、EGFの効果を濃度依存的に抑制出来ることが明らかとなった。また、一部のAHR高発現ケラチノサイトでは部分的にEGF効果を克服することが出来た。AHRはユビキチンリガーゼであることが知られており、AHRの結合パートナーであるエストロゲン受容体及びARNTをTCDD依存的に分解を誘導する。また、自身もTCDD依存的にユビキチン化によってプロテアソームによる分解を受ける事が知られている。このプロテアソーム阻害剤によるEGF阻害効果の抑制は、AHRのプロテアソームにおけるTCDD依存的分解がTCDDの皮膚に於ける毒性発現に於いて重要な働きをしていることを強く示唆した。

Dioxin, Aryl Hydrocarbon Receptor, Keratinocyte

講演番号：4C29a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ C校舎29会場

高温ストレスによるがん特異的な細胞死誘導機構の解析

Mechanism of cancer-specific cell death induction under the thermal stress.

○藤本香子、小林由香利、吉川博文、千葉櫻拓（東京農大・応生科・バイオ）
○Kako Fujimoto, Yukari Kobayashi, Hirofumi Yoshikawa, Taku Chibazakura
(Dept. Biosci, Tokyo Univ. Agric.)

【背景・目的】

がん細胞は高温ストレスに感受性を示すことが知られているが、そのメカニズムは不明な点が多い。当研究室において高温ストレス（42℃）下での正常細胞株とがん細胞株（U2-OS）の細胞周期・細胞死について解析を行った結果、正常細胞では高温ストレス下においてDNA合成が停止し、生存するのに対し、がん細胞ではDNA合成が進行し、M期に細胞死を引き起こすことが見出されている。現在までに、U2-OSにおいて高温ストレスによる細胞死が誘導されるまでに起きる３つの異常として、①G2/M期停滞、②染色体分配異常、③スピンドルチェックポイントの長期活性化が起こること、その結果として、M期後期に進むことなく細胞死に至るM期崩壊が起こることが分かっている。また、①・②の異常およびM期崩壊は、ストレス応答性MAPキナーゼであるJNKおよびスピンドルチェックポイント制御キナーゼMps1の阻害剤（SP600125)により抑制されることが示されている。

そこで、本研究では、高温ストレス下でのM期崩壊誘導におけるMps1とJNKの機能と、その誘導機構の解明を目的とした。

【方法・結果】

42℃下でMps1をRNA干渉法によりノックダウンした場合と、Mps1特異的な阻害剤（Reversine）を添加した場合において、U2-OSの細胞周期進行をそれぞれ解析した結果、どちらも高温ストレスによるG2/M期停滞は解除され、G1期に進行することが示された。一方、JNK特異的な阻害剤(JIP-1)を添加した場合には、高温ストレスによるG2/M期停滞は解除されなかった。これらのことから、高温ストレス下でのG2/M期停滞およびM期崩壊にMps1 が関与することが示唆されたため、Mps1の活性制御を解析した。Mps1抗体による免疫沈降及びキナーゼ活性測定を行った結果、42℃下では、Mps1活性の亢進が見られたが、SP600125を添加すると、37℃下と同様の活性状態に戻ることが示された。

一方、M期崩壊誘導機構を解析するために、染色体分配異常の要因として中心体に着目し、中心体周辺タンパク質γ-tubulinの蛍光免疫染色により中心体の局在を解析した。その結果、42℃下でのM期の細胞では、中心体数の増加傾向が見られた。しかし、Mps1をノックダウンした場合には、42℃下での中心体数の増加は見られなかった。以上の結果から、高温ストレス下ではMps1活性の亢進によって中心体数の異常が引き起こされ、染色体分配異常・スピンドルチェックポイントの長期活性化を経て、M期崩壊が誘導されることが示唆された。

cancer, cell death, thermal stress

講演番号：4C29a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ C校舎29会場

タイトル　細胞膜上GM3によるマウスメラノーマ細胞浸潤調節機構の解析
Title　Regulation of mouse melanoma invasion by membrane GM3
○及川　洋祐、矢ヶ崎　一三、三浦　豊（東京農工大・農）
○Yosuke Oikawa, Kazumi Yagasaki, Yutaka Miura (Tokyo Noko University)

Many studies suggest that membrane gangliosides have various physiological functions. Gangliosides have recently been reported to exert significant effects especially on tumor cells. We have already reported that exogenously-added ganglioside GM3 could inhibit the invasive activity of mouse melanoma B16F10 cells by suppressing both their adhesive activities to normal cell layer and their motility. In this report, we investigated the effects of GM3 synthase silencing on the invasion of mouse melanoma cells.

Mouse melanoma cells were transfected with GM3 synthase-targeted siRNA or the scramble RNA (scRNA). After 72 hrs, the suppression of GM3 synthase gene expression was confirmed by RT-PCR. We also assessed the level of total GM3 contents by HPTLC and membrane GM3 by flow cytometry. The expression of GM3 synthase was dramatically suppressed at mRNA level and, total and membrane GM3 contents were clearly decreased by siRNA. There was no difference in the growth between two groups when analyzed by WST-8 assay. The invasive activity was determined by co-culturing siRNA or scRNA transfected B16F10 cells with primarily cultured mesentery-derived mesothelial cells monolayer. The invasive activity of siRNA transfected cells increased compared with scRNA transfected cells. The invasion ability is known to be correlated with the motility activity. So, we next explored it by wound healing assay and Boyden chamber assay. Similar to the invasion, the motility was enhanced in GM3 synthase silenced cells.

We know that GM3 locates at the microdomain on the cell membrane and it is thought that microdomain controls the strength of signal transduction. Therefore, we investigated how the decrease of GM3 contents affected the microdomain. After isolating microdomain fraction by sucrose density-gradient ultracentrifugation, we assessed the change of the location of c-met and integrins which are interacted with GM3 and involved with motility. In the siRNA transfected cells, expression of these proteins was promoted in the microdomain fraction.

These results clearly suggest that the decrease of membrane GM3 enhanced the invasion ability of B16F10 cells by promotion of their motility. And now, we are investigating the effect of GM3 synthase silencing on *in vivo* metastatic ability by injecting scRNA or siRNA transfected cells into BDF1 mice through tail vain.

Keyword1 GM3, Keyword2 cancer, Keyword3 microdomain

講演番号：4C29a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ C校舎29会場

Apigeninによるヒト白血病細胞K562の赤血球分化誘導作用の解析

Analysis of apigenin-induced erythroid differentiation on human leukemia K562 cells

○翁長 彰子[2]、韓 畯奎[1,2]、礒田 博子[1,2]（[1]筑波大生命環境、[2]北アフリカ研究センター）
○Shoko Onaga[2], Junkyu Han[1,2], Hiroko Isoda[1,2]（[1]Univ. of Tsukuba, [2]ARENA）

【目的】Apigeninはパセリやセロリ、オレンジやオリーブオイルなど、さまざまな果物や野菜に含まれるフラボノイド化合物の一種である。Apigeninには抗がん、高血圧抑制、抗アレルギーなど多くの生理作用があることが報告されている。また、ヒト白血病細胞K562細胞はヘミンやButyric acid、Ara-Cなどの作用により赤血球への分化誘導能を示し、ヘモグロビンの産生が認められるようになることが知られている細胞である。そこで本研究は、ApigeninのK562細胞に対する赤血球分化誘導活性について調べた。
【方法】K562分化誘導実験は、10%ウシ胎児血清（FBS）を含むRPMI-1640培地で37℃、5% CO_2条件下で24時間培養後に、Apigeninを添加することにより行った。細胞周期および細胞表面分化マーカーの解析にはフローサイトメトリーを用いた。細胞内ヘモグロビンの産生は、分化誘導後の細胞をBenzidine染色することにより確認した。各遺伝子の発現解析は、ISOGENでtotal RNAを抽出後、リアルタイムPCR法を用いて行った。
【結果】75 μMのApigeninをK562細胞に処理した後、細胞の観察および各種解析を行った。Apigenin処理6日目の顕微鏡観察において、細胞の形態の変化が観察された。フローサイトメトリーを用いて細胞表面分化マーカーの解析を行った結果、赤血球分化マーカーであるGlycophorin Aを発現している細胞の増加が見られ、その割合は50%であった。また、ヘモグロビン産生細胞を染色するBenzidine染色を行った結果、Apigenin処理によってBenzidine染色陽性細胞数の増加が観察された。さらに、Apigenin処理10日目の細胞を回収し、色を確認したところ、ペレットの色が赤く変化していた。以上のことよりApigeninはK562細胞に対する赤血球分化誘導能を持つことが示された。細胞周期を調べた結果、ApigeninはK562に対してG_2/M arrestを引き起こすことが明らかになった。正常ヘモグロビンには、2本のα鎖と2本のγ鎖によって構成される胎児型ヘモグロビン（$\alpha_2\gamma_2$）と2本のα鎖と2本のβ鎖で構成される成人型ヘモグロビン（$\alpha_2\beta_2$）が存在する。赤血球分化誘導後のヘモグロビンの各鎖（α、β、γ）のmRNA発現量の変化を調べる目的で、75 μM Apigenin処理後2日、4日、6日、8日目のK562細胞を回収し、RNAを抽出後、リアルタイムPCRを行った。その結果、α鎖およびγ鎖はApigenin処理後2日目には発現増加が確認でき、8日目における発現量は、Apigenin未処理のものと比較すると、それぞれ約30倍および約9倍にまで増加していた。しかし、β鎖はApigenin処理後4日目まで発現量の増加は見られず、8日目における発現量増加は約2倍程度であった。ヘモグロビンのα鎖およびγ鎖の発現が有意に増加していたことより、Apigenin処理による赤血球分化細胞内には主に$\alpha_2\gamma_2$ヘモグロビンが存在していることが推測された。本研究により、Apigeninはヒト白血病細胞K562に対する赤血球分化誘導活性を有すること、また、その赤血球分化には細胞周期のG_2/M arrestが関与していることが示唆された。

apigenin, erythroid differentiation, K562

講演番号：4C29a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ C校舎29会場

タイトル　前立腺がん細胞における断片化アンドロゲン受容体の産生について
Title　Production of the cleaved form of androgen receptor in prostate cancer cells
○原田 直樹、山地 亮一、中野 長久[1]、乾 博（大阪府大・生命環境、[1]大阪女子短大）
○Naoki Harada, Ryoichi Yamaji, Yoshihisa Nakano[1], Hiroshi Inui (OPU, [1]OWJC)

【目的・背景】アンドロゲン受容体（AR）は男性ホルモン（テストステロンやジヒドロテストステロン）依存的に細胞質から核に移行して転写因子として機能することでホルモン感受性前立腺がん細胞の増殖を亢進する。一方で、AR の C 末端側に存在するリガンド結合ドメインを人為的に欠損させた変異体は、恒常的に核に局在してリガンド非依存的に転写活性化することが知られる。初期前立腺がんの治療には、AR を標的とした去勢術、アンドロゲンアンタゴニストや LH-RH アナログ投与といった外科的・内科的ホルモン療法が一般的に用いられる。これらのホルモン療法は一時的に優れた治療効果を発揮するが、数年後に男性ホルモン非依存的に増殖する予後不良の前立腺がん（castration-resistant prostate cancer: CRPC）として高頻度で再発することが問題となっている。CRPC の発達においても AR は転写因子として重要な役割を果たすと考えられているが、その作用機構に関しては不明な点が多い。本研究では、CRPC 発達における男性ホルモン非依存的な AR の活性化メカニズムに関して検討した。
【方法・結果】ホルモン感受性ヒト前立腺がん細胞株 LNCaP 細胞を、ステロイドを除去してさらにアンドロゲンアンタゴニストを加えた培地で生育させることにより、*in vitro* の CRPC モデルであるアンドロゲン非依存的に増殖する LNCaP（AI-LNCaP）細胞を樹立した。AI-LNCaP 細胞の AR をウエスタンブロットにより解析したところ、親株の LNCaP 細胞にはない AR の N 末端側を含む短鎖型 AR のバンドを 90 kDa 付近に見出した。短鎖型 AR はプロテアソーム阻害剤（MG132）存在下で培養した AI-LNCaP 細胞で増加し、同様の現象が親株の LNCaP 細胞でも観察された。MG132 を用いた検討により、短鎖型 AR は内分泌療法を模倣した男性ホルモン非存在下やアンドロゲンアンタゴニスト（ビカルタミド, ヒドロキシフルタミド, 酢酸シプロテロン）存在下で産生され、テストステロンやジヒドロテストステロンにより産生が阻害されることが明らかとなった。また、外因性 AR を高発現させた際にも短鎖型 AR は同様に産生されたこと、さらにセリンプロテアーゼ阻害剤である 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride により産生が阻害されたことから、選択的スプライシングではなく野生型 AR がプロテオリシスを受けることで産生されることが示唆された。また、部位特異的変異を導入した変異体 AR(L26A/F27A)を用いた検討から、AR の N 末端に存在する ^{23}FQNLF^{27} モチーフが短鎖型 AR の分解に関与することが明らかとなった。短鎖型 AR は、リガンド結合ドメインを欠き恒常的に核に局在する人工的な変異体と分子量的に類似することから，細胞分画によって局在を検討したところ、短鎖型 AR は核に局在することが判明した。これらの結果から、ホルモン療法時に産生された短鎖型 AR は男性ホルモン非依存的に転写活性化することにより、男性ホルモンには依存しないが AR 機能に依存した前立腺がんの再発に寄与すると推測された。

androgen receptor , prostate cancer, transcription

講演番号:4C29a07
講演日時、会場:3月25日10:16～ C校舎29会場

低酸素条件下における癌細胞悪性化の機構解析

Analysis of malignant progression mechanisms of cancer cells under hypoxia

○佐藤　直也、三村　真吾、矢ヶ崎　一三、三浦　豊、石井　一夫[1]、古崎　利紀[1]、
田中　あかね[2]（東京農工大・院・応用生命化学、[1]東京農工大・院・農学系ゲノム科学人材育成プログラム、[2]東京農工大・農・獣医）
○Naoya Sato, Shingo Mimura, Kazumi Yagasaki, Yutaka Miura, Kazuo Ishii, Toshinori Kozaki, Akane Tanaka(Tokyo Noko University)

【目的】低酸素環境において、癌細胞は悪性化することが知られている。また近年、糖脂質であるガングリオシドと、癌細胞の諸性質との関連性が報告されている。ガングリオシドの一種であるGM3は、細胞膜上の構造ユニットである細胞膜マイクロドメインにおいて、膜タンパク質であるCD9や細胞接着因子であるインテグリンと相互作用し、癌細胞の接着や遊走に関与していると考えられている。本研究では、低酸素条件下で培養した癌細胞におけるガングリオシドGM3、およびGM3と相互作用する膜タンパク質・接着因子等の挙動変化について検討し、癌細胞悪性化の機構解析を行うことを目的とした。【方法】マウスメラノーマ細胞B16F10を1%O_2の低酸素条件で前培養したものを実験群とした。接着能は各種マトリックスタンパクをコートしたプレートへの接着細胞数を位相差顕微鏡下で観察することで測定し、運動能は傷つけアッセイにより測定した。細胞膜中のGM3及びCD9含量はFlow cytometerを用い、GM3合成酵素のmRNA量はRT-PCRを用いて測定した。細胞膜マイクロドメインの分離はショ糖密度勾配超遠心法により行い、各画分中のインテグリン分子をWestern blottingにより検出した。【結果】Hypoxia培養群では、接着能の低下と運動能の亢進が観察され、低酸素環境においてB16F10が悪性化していることが明らかとなった。その際、Hypoxia培養群では細胞膜上のGM3存在量が増加していた。また、Hypoxia培養群ではGM3 synthaseのmRNA発現量も増加していた。従って、Hypoxia培養群では細胞内の総GM3が増加しているものと予想したが、細胞内脂質抽出後、HPTLCにより分析したところ、予想に反して細胞内の総GM3含量はほとんど変化していないことが明らかとなった。このことから、低酸素条件下では細胞内GM3の細胞膜上への局在化が進む可能性が示唆された。そこで、GM3と相互作用するインテグリンの、細胞膜マイクロドメインへの局在変化を解析したところ、Hypoxia培養群では細胞膜マイクロドメイン画分におけるインテグリンα5及びβ1の局在が増加していた。以上の結果から、低酸素条件下ではGM3の細胞膜上への局在変化によって細胞膜マイクロドメインの構造に変化が生じ、このことが低酸素環境における癌細胞の接着能および運動能の変化、ひいては癌細胞の悪性化に関与している可能性が示唆された。現在、免疫組織染色による細胞内GM3、CD9の局在変化についての検討、次世代シークエンサーを用いたHypoxia培養群におけるトランスクリプトーム解析を行っている。

Keywords:hypoxia,GM3,GM3 synthase

講演番号:4C29a08
講演日時、会場:3月25日10:27～ C校舎29会場

Chemical inhibition of Ser/Thr protein phosphatase type 1 reveals relationship between ATM and ribosomal protein S6

○Ying LI, Shinya MITSUHASHI, Makoto UBUKATA (Div. Appli. Biosci.,Grad. Sch. Agric.,Hokkaido Univ.)

【Objectives】A specific inhibitor of PP1, tautomycetin (TC) and an antibody to phospho-(S/T)Q sites of ATM kinase substrate were used to identify common substrates of PP1 and ATM in regulating the pathway of DNA damage response.
【Methods】The candidate protein was purified with anion exchange and gel filtration chromatography and then identifided by LC-MS/MS. UV irradiation and doxorubicin were used to activate DNA damage response.KU-55933 was used to inhibit the activation of ATM kinase.
【Results】Firstly, ribosomal protein S6 (RPS6) has been identified as a substrate of PP1 and ATM. Secondly, immediately after UV irradiation, the phosphorylation at Ser247 of RPS6 decreased by PP1-mediated dephosphorylation. Thirdly, in response to DNA damage, ATM activity is required for rephosphorylation of RPS6 at Ser247. We propose a novel mechanism for modulation of RPS6 function by PP1 and ATM.

講演番号：4C29a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ C校舎29会場

抗肝線維化物質テトランドリンによる肝星細胞でのマクロリポファジー制御

Tetrandrine regulates macrolipophagy in hepatic stellate cells

○宮前 友策、仲井 奈緒美、翁長 彰子[1]、韓 畯奎[1]、礒田 博子[1]、芦田 久、神戸 大朋、入江 一浩[2]、永尾雅哉（京大院・生命、[1]筑波大院・生命環境、[2]京大院・農）

○Yusaku Miyamae, Naomi Nakai, Shoko Onaga[1], Junkyu Han[1], Hiroko Isoda[1], Hisashi Ashida, Taiho Kambe, Kazuhiro Irie[2], Masaya Nagao (Graduate School of Biostudies, Kyoto University; [1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba; [2]Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】抗肝線維化活性を有するツヅラフジ科植物由来イソキノリンアルカロイドのテトランドリンが、肝線維化に関わる肝星細胞における脂肪蓄積を促進するか、その際オートファジー系の制御が関与するかについて明らかにすることを目的とした。肝星細胞は通常、静止期にあり、ビタミンAを含む脂肪滴を貯蔵しているが、炎症時には活性化されて脂肪滴が消失し、筋芽細胞様に形質転換して、コラーゲンを産生し、平滑筋型α-アクチンが発現する。本研究ではまず抗線維化物質テトランドリンが肝星脂肪の静止期の特徴である脂肪蓄積を促進するか検討した。また最近、脂質代謝とオートファジーが関連について報告があるため(Singh *et al. Nature* 2009)、テトランドリンによる脂肪蓄積促進活性におけるオートファジー制御について検討した。
【方法】ラット由来肝星細胞株HSC-T6をテトランドリン存在下で培養し、Oil Red-O染色法により細胞内脂肪滴を染色することで脂肪滴蓄積促進活性を評価した。肝星細胞の活性化抑制にPPARγが関わることが知られているため、ヒト肝癌細胞株HepG2細胞にGal4DNA結合ドメイン/PPARγリガンド結合ドメインキメラ分子と、Gal4の標的配列を上流に接続したルシフェラーゼレポーターを用いたアッセイ系によりテトランドリンのPPARγアゴニスト活性を評価した。またオートファジーの関与を検証するため、オートファゴソームのマーカーであるLC3蛋白質の抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、テトランドリン処理によるHSC-T6細胞内のLC3タンパク質量の変動を調べるとともに、LC3をGFP蛍光タンパク質と融合させてHSC-T6細胞に発現させ、テトランドリン処理時におけるLC3の細胞内局在を蛍光観察した。
【結果】Oil Red-O染色の結果、テトランドリンを処理したHSC-T6細胞において顕著な脂肪滴蓄積促進活性が認められた。しかし、レポーターアッセイの結果、本化合物は脂肪細胞分化に関わるPPARγのアゴニスト活性を示さなかった。そこでテトランドリンによる脂肪蓄積促進活性におけるオートファジー制御の関与を検証した。オートファゴソームのマーカーであるLC3とGFPを融合し発現するHSC-T6細胞を樹立し、テトランドリン処理をしたところ、Nile Redで染色される脂肪滴の増加と、その脂肪滴へのLC3の共局在が観察された。また、抗LC3抗体を用いたウェスタンブロットでも、テトランドリン処理した際の細胞内LC3タンパク量の増加が確認でき、リソソーム阻害剤のPepstatin、E64d処理してもLC3量に変化がなかったことから、本化合物はリソソームとの融合による分解の前段階でオートファジーを阻害する可能性が示唆された。

Tetrandrine, Autophagy, macrolipophagy

講演番号：4C29a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ C校舎29会場

ラミニンが脂肪細胞特性に与える影響解析

Effects of laminin on adipocyte characteristics.

○木内 里美、森 忍、村瀬 孝利、大内 敦、長谷 正（花王生科研）
○Satomi Kiuchi, Shinobu Mori, Takatoshi Murase, Atsushi Oouchi, Tadashi Hase (Kao Corporation, Biological Science)

【目的】脂肪細胞はラミニンやコラーゲン等の細胞外マトリックス(ECM)に取り囲まれて存在している。ECMは受容体に結合することで細胞内にシグナルを伝達し、様々な生理作用を誘導することが報告されていることから、脂肪細胞もECMからシグナルを受容していることが推察される。そこで本研究では、特にラミニンが脂肪細胞特性に与える影響について解析した。
【方法】**(1-1)** 脂肪細胞分化成熟に伴うラミニンの発現パターン解析：未分化/分化成熟状態の皮下脂肪由来初代培養細胞における、各ラミニンサブタイプの発現量をmRNAレベルで定量した。**(2-1)** ラミニンが分化成熟/エネルギー代謝関連遺伝子の発現量、および脂肪蓄積に与える影響解析： ラット皮下/内臓脂肪由来初代培養細胞をラミニン存在条件下にて分化成熟させ、分化成熟/エネルギー代謝関連遺伝子の発現量を検証した。また脂肪染色により脂肪蓄積を検証した。**(2-2)** ラミニンがインスリンシグナル伝達系に与える影響解析： 3T3-L1細胞をラミニン存在条件下にて培養し、インスリン応答性に対するラミニンの影響を、インスリン受容体下流遺伝子群のリン酸化にて検証した。**(2-3)** ラミニン制御による脂肪細胞分化成熟制御の検討： 3T3-L1細胞を、ラミニン - ラミニン受容体の結合を競合的に阻害するペプチドの存在条件下にて分化成熟させ、分化成熟関連遺伝子の発現量に与える影響を検証した。
【結果】**(1-1)** ラミニン-α4, -β1, -γ1について、分化成熟に伴い発現量が有意に増加した。脂肪細胞におけるラミニン産生量は、分化成熟状態に連動して変化することが示唆された。**(2-1)** ラミニン存在条件下にて、分化成熟マーカーの発現が有意に増加した。また、脂肪蓄積が有意に亢進した。ラミニンは分化成熟および脂肪蓄積を亢進させる作用を有する。**(2-2)** ラミニン存在条件下にて、インスリン受容体下流遺伝子であるIRS-1およびAktのリン酸化が亢進した。これは、インスリンシグナル伝達が亢進し、脂肪細胞の分化成熟が促進方向に動いていることを示唆する。ラミニンによる分化成熟促進効果の一因として、インスリン刺激に対する応答性が亢進することが示唆された。**(2-3)** ラミニン阻害ペプチド/ラミニン共存在条件下にて、ラミニンによる分化成熟促進効果が有意に抑制された。ラミニンによる分化成熟促進効果は、ラミニン受容体への結合阻害によりラミニンに起因するシグナルを阻害することで抑制される。
【まとめ】脂肪細胞におけるラミニンの発現量は、分化成熟に伴い増加する。またラミニンは分化成熟促進効果を有する。ラミニンは分化成熟に伴い産生され、脂肪細胞の分化成熟をより一層促進させている可能性がある。このように脂肪細胞は、分化成熟状態に連動した細胞外ECMを産生することで、分化成熟度を変化/維持していることが示唆された。

adipocyte, laminin, extracellular matrix

講演番号：4C29a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ C校舎29会場

脂肪細胞における細胞内コリンの新規供給経路

Potential source of intracellular choline in adipocyte.

○中村 啓司、吉田 円、吉澤 郁美、廣崎 晴香[1]、加藤 範久、矢中 規之（広島大院・生物圏科学、[1]広島大・生物生産）

○Keishi Nakamura, Madoka Yosida, Ikumi Yoshizawa, Haruka Hirosaki[1], Norihisa Kato, Noriyuki Yanaka(Grad Sch., Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [1]Hiroshima Univ)

【目的】脂肪細胞の分化・成熟過程で細胞内に中性脂肪の蓄積が認められるが，その脂肪滴の成長に伴って表面積が増大することから，表層のリン脂質一重層のphosphatidylcholine (PC)の生合成が深く関与し，PC合成のための細胞内のcholine (Cho)の供給が重要であると考えられる．一方近年，肥満にともなう生活習慣病の発症とエピジェネティックな制御が注目されており，DNAなどのメチル化反応においてはメチル基供与体としてChoは重要な役割を果たすと考えられている．そこで本研究では脂肪細胞におけるChoの供給経路に着目し，新規リン脂質代謝酵素であるGDE5によるglycerophosphocholine (GPC)の分解によるChoの供給，およびcholine transporter familyによる細胞外からのCho供給について可能性を検証した．
【方法および結果】細胞内Cho，およびPCの分解産物であるGPCの定量系をHILICを用いたLC/MS法により確立した．動物細胞で発現させたGDE5は*in vitro*の酵素反応においてGPCを基質として分解し，Choを産生した．GDE5の生理的な役割を解析するため，マウス前駆脂肪細胞株3T3-L1においてGDE5をノックダウンさせたところ，細胞内のGPC濃度は5.6倍に上昇したことから，3T3-L1細胞内においてGDE5はGPCを分解することでChoの供給経路としての役割を担うことが示唆された．さらに3T3-L1細胞の脂肪細胞分化にともなってGDE5はRNAレベル，およびタンパク質レベルにおいて著しく増加し，また脂肪細胞の分化誘導に関わるPPARγのアゴニストであるTZDの添加によってもGDE5の発現上昇がみられた．脂肪細胞分化・成熟においてChoの供給経路としてのGDE5の重要性が示唆された．

一方，細胞外からのCho供給経路について，choline transporter familyの発現をhigh-affinity choline transporter (CHT1), choline transporter-like protein (CTL), organic cation transporter (OCT)について解析を行った結果，3T3-L1細胞の分化過程においてCHT1，CTL3，OCT2などの発現変動が認められた．一方，3T3-L1細胞の容積を計測した結果，Choの細胞内濃度が266μMであるのに対して，GPCの細胞内濃度が1.31mM（GDE5のノックダウンにより7.25mMまで上昇した）と豊富に存在し，一方，細胞外（培養液）Cho濃度が30μM程度であることから，細胞外からのChoの流入よりもGPCの分解によるChoの供給経路の重要性が示唆された. 細胞内に豊富に蓄積するGPCとその分解経路の脂肪細胞の分化や成熟過程における役割について，GDE5をノックダウンさせた際の遺伝子発現をDNA microarray法により解析した結果と合わせて報告する．

Keyword1 choline, Keyword2 3T3-L1, Keyword3 glycerophosphocholine

講演番号：4C29a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ C校舎29会場

タイトル　肥満において単球・マクロファージとの相互作用により脂肪細胞で応答する因子群の探索

Title Characterization of interaction of adipocytes with macrophages in obese adipose tissue

○久本 高央、真田 洋平、米中 久喜[1]、加藤 範久、西村 英紀[2]、矢中 規之（広島大院・生物圏科学、[1]広島大・生物生産、[2]広島大院・医歯薬）

○Takahiro Kumoto, Yohei Sanada, [1]Hisaki Yonenaka, [2]Fusanori Nishimura, Noriyuki Yanaka (Grad Sch., Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [1]Fac. of Appl. Biol. Sci., Hiroshima Univ. [2]Grad Sch., Biomed. Sci., Hiroshima Univ.,)

<目的>

内臓脂肪型肥満を背景として発症するメタボリックシンドロームは，生活習慣病と深く関連している．肥満に伴い脂肪組織は肥大化し，組織に浸潤した単球･マクロファージが脂肪組織の病態に深く関与するが，特に脂肪細胞とマクロファージの相互作用は極めて重要なシグナルと考えられている．以前の vitamin B6(B6)の抗炎症作用に着目した研究において，ICR マウスに B6 を高容量で摂取させた際の白色脂肪組織の遺伝子発現に対する影響を DNA microarray 法を用いて網羅的に解析した結果，高 B6 群において単球･マクロファージの浸潤が抑制され，マクロファージのマーカー遺伝子やケモカイン類，さらに炎症性因子の mRNA 発現の抑制が認められた．そこで，B6 の単球･マクロファージの浸潤の抑制効果に着目し，マクロファージの浸潤を特異的に抑制するモデルとして利用することを考えた．すなわち，肥満病態モデルマウス(db/db マウス)の白色脂肪組織で発現変動する数多くの遺伝子群と比較解析することによって，肥満において単球･マクロファージの浸潤に関連して応答する因子群を抽出することを試みた．本研究では，肥満時に白色脂肪細胞に浸潤した単球･マクロファージの浸潤との相互作用によって *in vivo* の脂肪細胞において引き起こされる細胞応答を解析することを目的とした．

<方法と結果>

肥満モデルマウスには db/db を用いて高脂肪食下で 3 週間飼育し，同週齢の db/+マウスをコントロールとした．精巣周囲白色脂肪組織より total RNA を調製し，Dye-swap 法により DNA microarray 解析を行った．db/db マウスの脂肪組織で発現が有意に上昇する遺伝子は 1810 個あり，単球･マクロファージの遊走に関わる CCL2 等のケモカイン類の著しい発現上昇を認めた．その 1810 遺伝子の中で，上述の単球･マクロファージの浸潤が抑制される食餌性 B6 の摂取量の増加に応答して発現減少した遺伝子は PTX3 や MMP3 などを含み 262 個存在した．そこで，transwell を用いてマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1，およびマウスマクロファージ RAW246.7 細胞の共存培養を行い，3T3-L1 細胞より total RNA を調製し，real-time PCR 法により mRNA 発現の解析を行った．その結果，LPS 刺激を行った RAW 細胞との共存培養された 3T3-L1 細胞において PTX3 や MMP3 などの mRNA 発現の著しい上昇が認められた．さらに，肥満児の白色脂肪組織で発現が上昇する PTX3 や MMP3 の mRNA 量は組織内に浸潤した単球･マクロファージ(F4/80 陽性)の細胞数と正の相関していた．以上の結果から，先の 262 遺伝子は肥満形成に伴って，単球･マクロファージの白色脂肪組織に浸潤に応答して脂肪細胞において発現誘導した因子群を含む可能性が高いと考えられた．

Keyword1 obesity, Keyword2 3T3-L1 , Keyword3 macrophage

講演番号：4C29a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ C校舎29会場

タイトル 脂肪細胞におけるRassf6の発現はマクロファージとの相互作用によって減少する

Title Downregulation of Rassf6 expression in adipocytes by the interaction with macrophages

真田 洋平、久本 高央、米中 久喜[1]、西村 英紀[2]、畑 裕[3]、○矢中 規之（広島大院・生物圏科学、[1]広島大・生物生産、[2]広島大院・医歯薬、[3]東京医歯大・難治研）

Yohei Sanada, Takahiro Kumoto, [1]Hisaki Yonenaka, [2]Fusanori Nishimura, [3]Yutaka Hata, Noriyuki Yanaka (Grad Sch., Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [1] Hiroshima Univ., [2]Grad Sch., Biomed. Sci., Hiroshima Univ., [3]Med. Res. Inst., Tokyo Med. and Dent. Univ.)

【目的】肥満の脂肪組織において単球・マクロファージの浸潤量の増加が報告されて以来，肥満の慢性炎症として病態が注目され，特に脂肪組織における脂肪細胞と単球・マクロファージの相互作用の意義の解明が進められている．当研究室では，ビタミンB6（B6）の摂取による脂肪組織の単球・マクロファージの浸潤量の減少効果に着目して、肥満の白色脂肪組織において発現変動する数多くの因子群の中から，*in vivo*において脂肪細胞とマクロファージの相互作用に関する因子群の抽出を試みた．その結果，ptx3やmmp3などを単離し，単球・マクロファージとの相互作用によって，脂肪細胞において発現が著しく上昇することが示された．さらに本研究では，肥満時の*in vivo*の白色脂肪組織において，単球・マクロファージとの相互作用よって脂肪細胞において機能が低下，あるいは消失する因子群を単離することを研究目的とした．

【方法, および結果】肥満db/db マウスと同週齢の野生型マウスの精巣周囲白色脂肪組織よりtotal RNAを調製し，DNA microarray解析に供した．野生型マウスと比較してdb/dbマウスの肥満白色脂肪組織で発現が低下する遺伝子は1845個あり，その中で，単球・マクロファージの浸潤を抑制するB6の摂取によって，逆に発現量が増加する遺伝子は15個存在した．その中で，細胞寿命や細胞死に関わるrassf6 (Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 6)について着目した．rassf6の発現量はdb/db マウスの白色脂肪組織において野生型と比較して1/10まで低下しており，B6の摂取によって2.2倍増加した．また高脂肪食負荷による肥満マウスの白色脂肪組織においてもRassf6の発現は低下し，Rassf6のmRNA発現量は白色脂肪組織へ浸潤したマクロファージ細胞(F4/80陽性細胞)数と負の相関を示した．白色脂肪組織を酵素分散させたところ，Rassf6は成熟脂肪細胞に多く発現し，また，マウス前駆脂肪細胞3T3-L1の分化誘導において発現量は増加した．さらに，マウスマクロファージRAW264.7との共存培養によって3T3-L1細胞でのRassf6の発現量は減少し, 活性化させたRAW細胞の培養上清やTNFαの添加によってもRassf6 mRNAは減少した．以上の結果は，脂肪細胞におけるRassf6の発現はマクロファージとの相互作用によって減少し，細胞死を調節する可能性が考えられた．Rassf6の消失の意義を検討するため，3T3-L1細胞のRassf6をノックダウンさせた際の遺伝子発現をmicroarray法により探索した結果，Rassf6ノックダウン細胞においてCD44やHmga2の有意な発現上昇が認められた．今後，脂肪細胞の増殖や細胞死の観点で解析を行う予定である．

Keyword1 Rassf6 , Keyword2 3T3-L1, Keyword3 obesity

講演番号：4C29a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ C校舎29会場

骨格筋の細胞内代謝における脂肪酸結合タンパク質３の役割の検討

The roles of fatty acid binding protein 3 in the metabolism of mouse muscle cells.

○楠堂 達也、片岡 直也、山下 均（中部大・生命医科）
○Tatsuya Kusudo, Naoya Kataoka, Hitoshi Yamashita (Chubudai)

【目的】

Fatty acid binding proteins (FABPs)は疎水性リガンドに対して高いアフィニティーを持つ小型のタンパク質であり細胞内における脂溶性物質の輸送に重要な役割を果たしている。FABPsは組織特異的に９種類が報告されているが、FABP3は心筋や骨格筋において高レベルで発現するFABPである。FABP3欠損マウスは運動持続能力の低下や骨格筋での脂肪酸利用が低下していることが報告されていることから、FABP3が骨格筋におけるエネルギー利用に重要な働きを果たしていることが示唆されている。また、我々の実験においても、高脂肪食摂食によりFABP3が通常では発現の見られない白色脂肪組織に発現が誘導されることや、骨格筋におけるFABP3の発現が体重や内臓脂肪重量など相関するというデータが得られている。これらのことからFABP3は肥満や生活習慣病の発症に積極的な役割を果たしているのではないかと考えられた。そこで、本研究では培養細胞を用いて、骨格筋の糖・脂質代謝におけるFABP3の働きについて分子レベルでの検討を行った。

【方法】

骨格筋のモデルとしてマウス筋芽細胞であるC2C12細胞を用いた。C2C12細胞を筋管へと分化させた後、FABP3発現アデノウイルスを用いてFABP3を発現させた。また、コントロールとしてlacZ を発現させた。これらの細胞に対して代謝関連遺伝子の発現、代謝関連シグナル、糖取り込み等について検討した。

【結果】

筋管へと分化したC2C12細胞にFABP3を発現させ、リアルタイムPCRによって糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量を検討した結果、FABP3の発現は代謝関連遺伝子の発現に影響を与えなかった。糖取り込みについて検討したところ、FABP3の発現によってインスリン依存的な糖取り込みの上昇率には変化が見られなかったが、基底レベルでの糖取り込みは有意に上昇した。ウエスタンブロッティングによりシグナル経路を検討したところ、FABP3がAMPKを介してGLUT4の制御因子であるAS160を活性化し、グルコース取り込みを上昇させると考えらえた。また、パルミチン酸によって誘導されるインスリンシグナルの抑制はFABP3の発現によって回復した。これらのことから、FABP3が骨格筋における糖代謝やインスリンシグナルに関与していることが示唆された。現在、プロテオミクス解析により、FABP3がこれらの機能を発揮する上で重要と思われるターゲット分子の探索を行っている。

FABP3, energy metabolism, C2C12

講演番号：4A30a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ A校舎30会場

ホウ素要求性が低下したシロイヌナズナ変異株の単離

Isolation of *Arabidopsis thaliana* mutant with reduced requirement of boron

○三輪　京子[1,2]、藤原徹[3]（[1]北大・創成、[2]さきがけ・JST、[3]東大・農）
○Kyoko Miwa[1,2], Toru Fujiwara[3]（[1]Hokkaido Univ., [2]PRESTO, JST, [3]Univ. of Tokyo）

【目的】ホウ素(B)は植物の微量必須元素のひとつである。植物においてホウ酸は、細胞壁ペクチン質多糖ラムノガラクツロナナンIIの二分子間をエステル結合して架橋する役割があり、細胞の物理的強度維持や細胞接着を支えている。農業生産におけるホウ素欠乏症の発生は、日本を含む東アジア・東南アジアを中心に、世界80か国以上で130を超える作物で報告されている。植物のホウ素欠乏症状は葉の展開抑制、根の伸長阻害、稔実性の低下など成長点に観察され、農作物の収量および品質の低下を引き起こす。ホウ素は至適濃度範囲の狭い元素として知られ、ホウ素欠乏耐性を含めて、幅広いホウ素濃度の土壌に適応した作物品種の開発が望まれている。発表者はこれまで、ホウ酸トランスポーターBOR1の発現上昇が低ホウ素環境下でのシロイヌナズナの生育を改善することを報告した。しかしながら、この生育改善は根から地上部へのホウ素輸送を強化したものであり、環境中からのホウ素の収奪量は低下しないと考えられる。そこで、本研究では“真のホウ素欠乏耐性”付与を目指し、植物体のホウ素濃度が低い状態でも生育できるシロイヌナズナ変異株の単離を通じて、「ホウ素要求性を低下させる」新規遺伝子の同定を目指した。
【方法】シロイヌナズナホウ酸トランスポーターBOR1 は低ホウ素環境での根から地上部への効率的なホウ素輸送を担う。BOR1の機能欠損株であるシロイヌナズナ変異株*bor1-1*は、広い範囲の低ホウ素環境で地上部のホウ素濃度が著しく低下し、結果として地上部の生育が抑制される。本研究では、地上部ホウ素濃度が低下した*bor1-1*変異株を親株として、さらにEMSによる変異原処理を行い、「低ホウ素環境で地上部のホウ素濃度は低下したままであるが、地上部生育量が回復した」復帰変異株一株を単離した。
【結果】固形培地で生育させたところ、培地ホウ酸濃度0.3 μM という深刻な低ホウ素条件では、復帰変異株は*bor1-1* とほぼ同様に地上部の生育の抑制が観察された。培地ホウ酸濃度3～7 μMのマイルドな低ホウ素条件において、*bor1-1*は地上部の生育が抑制されたのに対して、復帰変異株では地上部の生育量がほぼ野生型株並みに回復した。30 μMのホウ酸を含む通常条件培地では*bor1-1*、復帰変異株ともに野生型株と生育に違いは認められず、正常に生育した。また、ロックウールを用いて水耕栽培した場合も、*bor1-1*が地上部ホウ素濃度低下による地上部生育の抑制と葉の委縮を示す低ホウ素条件下で、復帰変異株において地上部生育量の改善と正常な葉の展開が観察された。復帰変異株の生育改善が見られる低ホウ素条件下において、復帰変異株の地上部ホウ素濃度は*bor1-1*と同様のレベルに低下したままであることを予備的に明らかにしており、変異株は野生型株よりもホウ素の要求量が低下した変異株と考えられた。

boron, *Arabidopsis thaliana* mutant, transporter

講演番号：4A30a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ A校舎30会場

シロイヌナズナ低ホウ素馴化細胞の解析

Characterization of Arabidopsis cultured cells acclimated to low boron

○千葉　美恵、平井　優美[1]、三輪　京子（北大・創成、理研・植物センター[1]）
○Mie Chiba, Masami Yokota Hirai[1], Kyoko Miwa (CRIS・Hokudai, PSC・RIKEN[1])

【目的】植物の微量必須元素であるホウ素は、植物細胞壁ペクチン質多糖のラムノガラクツロナンII（RG-II）２分子を架橋し、細胞壁構造の安定化に寄与している。また、ホウ素は若い分裂組織での要求量が高く、古い組織から新しい組織へ再転流しにくいため、分裂組織に常に供給されることが必要である。そのため、植物が低ホウ素条件下におかれると、二量体化したRG-IIの割合が減少し、根の伸長阻害や葉の展開抑制といったホウ素欠乏症状が主に成長点で現れる。しかしながら、分裂組織におけるホウ素とRG-IIの架橋反応の分子機構やホウ素欠乏応答・耐性機構の詳細は明らかにされていない。そこで本研究では分裂組織での低ホウ素応答の解明を目指し、低ホウ素条件に馴化したシロイヌナズナ培養細胞を確立し、細胞壁や遺伝子発現への長期的なホウ素欠乏処理が及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】タバコ培養細胞BY-IIでは、急激な低ホウ素濃度処理は酸化ストレス障害を引き起こし、細胞死を誘導することが報告されている。我々は、シロイヌナズナ培養細胞（MM2d株）を用いて、培地ホウ素濃度100 μMの通常条件から段階的に培地ホウ素濃度を低下させることで、親株の細胞が継続的に増殖できない2 μMのホウ素欠乏条件において安定的に細胞増殖を示す株を取得した。100 μMで維持した親株、2 μMで維持した低ホウ素馴化細胞を対象に、経時的な細胞重量の測定、RG-II二量体の割合の測定、細胞壁構成糖の組成分析、元素分析を行うとともに、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。

【結果】細胞の湿重量から増殖曲線を調べたところ、馴化細胞（2 μM）は誘導期が長く、定常期の重量は親株（100 μM）の30%程度に低下していた。対数増殖期の細胞をPI染色したところ、親株（100 μM）では死細胞はほぼ認められなかったのに対し、馴化細胞（2 μM）は細胞塊のなかに多量の死細胞を含んでいた。さらに、RG-IIの二量体の割合を測定したところ、親株（100 μM）は常に95%以上を維持していたのに対し、馴化細胞（2 μM）では対数増殖期初期には70%を示したが、細胞重量の増加に伴って定常期には20%程度まで低下した。馴化細胞（2 μM）はRG-II二量体の形成が常に低下しているわけではなく、対数増殖期初期には2 μMという低いホウ素濃度条件下で効率的にホウ素をRG-II二量体化に利用していた。マイクロアレイ解析の結果、馴化細胞（2 μM）での輸送タンパク質、細胞壁合成酵素などの複数遺伝子の発現上昇が認められ、ホウ素欠乏応答・耐性への関与が示唆された。

Boron, Arabidopsis cultured cells, Cell walls

講演番号：4A30a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ A校舎30会場

シデロフォアによるトマトの３価鉄吸収への影響

Effect of siderophore on ferric iron absorption of tomato

○長田 武、大保 卓郎、三神 達也（摂南大・理工）
○Takeshi Nagata, Takuro Obo, Tatsuya Mikami (Setsunandai)

【目的】一般に植物は２価鉄を吸収できるが、３価鉄を吸収することができない。イネ科など一部の植物は３価鉄キレート形成能を示すシデロフォアを生合成し、３価鉄をキレート体として吸収することができる。しかし、*Solanum lycopersicum*（トマト）はシデロフォアを生合成することができないため、３価鉄を吸収できない。よって、トマトを栽培する際は土壌環境中の２価鉄含有量に配慮しなければならない。この問題を克服するため、我々は微生物由来のシデロフォアに着目した。即ち、我々の目的はトマト培養時にシデロフォアを添加することにより、３価鉄吸収の亢進を試みるものである。

【方法】本研究では*Pseudomonas fluorescens*由来のpyoverdine型シデロフォアを用いることとした。まず、本菌株を培養後、培養液中のシデロフォアを常法により固相法を用いて粗抽出した。粗抽出したシデロフォアを凍結乾燥し、その一部を用いてHPLCにより確認を行った。播種後２週間のトマト若苗を、シデロフォアおよび３価鉄を含む液体培地に移植し、26℃、16時間明期、8時間暗期の条件下にて２週間培養した。なお、対照としてシデロフォアを含まず３価鉄を含む液体培地を用いて培養した。培養後、葉、茎、根に切り分け、その乾燥重量を量り、硝酸、強熱下で灰化し、各組織に含まれる鉄量を原子吸光光度計により測定した。

【結果】シデロフォアおよび３価鉄を含む液体培地で培養させたトマトの葉の重量は、３価鉄のみを含む液体培地で培養させたトマトの重量と比較して増大していた。また同様に、葉の組織あたりの鉄量においても、シデロフォアを共存させることにより高い鉄量が観察された。シデロフォアを共存させない条件ではトマトが３価鉄を吸収することができず、鉄欠乏による生育障害が確認された。しかし、シデロフォアを共存させることによりトマトの生育が促進した。即ち、３価鉄がキレートされて鉄吸収が亢進し、鉄欠乏が改善した可能性が示唆された。

Ferric iron, Siderophore, *Solanum lycopersicum*

講演番号：4A30a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ A校舎30会場

植物オルガネラ膜輸送体蛋白質の完全インビトロ合成・再構成系による機能解析

Synthesis, reconstitution and functional analysis of plant organelle transporters by complete in vitro system

○野澤 彰、是枝 晋[1]、隆　一輝[2]、岡田 有右、藤本 竜治、坪井　敬文、戸澤 譲（愛媛大・無細胞セ、[1]埼玉大・分析セ、[2]埼玉大・理工研）

○ Akira Nozawa, Shin Kore-eda[1], Kazuki Takashi[2], Yusuke Okada, Ryoji Fujimoto, Takafumi Tsuboi, Yuzuru Tozawa (CSTRC, Ehime Univ., [1] Cent. of Sci., Saitama Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Eng., Saitama Univ.)

【目的】我々はコムギ無細胞蛋白質合成系を用いて機能的膜蛋白質を合成する系の確立により、これまでに、リポソーム添加条件で無細胞合成したシロイヌナズナ葉緑体内膜のリン酸輸送体AtPPT1が、精製蛋白質や酵母で発現させた蛋白質と同等以上の比活性を示すことを報告している。現在、この方法の適用によりさらに複数のオルガネラ輸送体蛋白質の機能解析を進めている。今回は、プラスチド局在型リン酸輸送体(pPT)蛋白質に属するアイスプラント(*Mesembryanthemum crystallinum*)のMcPPT1、McTPT1、McGPT1、McGPT2、シロイヌナズナのミトコンドリア内膜に局在するミトコンドリアキャリアー(MC)蛋白質に属するAtDTC、さらにユニークなTCA経路を有することで知られるマラリア原虫のDTC候補(PfDTC)について解析を行った。

【方法】リポソームを添加したコムギ無細胞蛋白質合成系を用いて、McPPT1、McTPT1、McGPT1、McGPT2、AtDTCおよびPfDTCを合成した。これらを、基質を内封したリポソームと混合し、凍結融解および超音波処理を行うことによりプロテオリポソームに再構成した。RI標識した輸送基質のプロテオリポソーム内への輸送量を測定することによりそれぞれの膜蛋白質の対向基質の選択性および基質輸送活性を測定した。

【結果】以前の実験結果より、リポソーム添加型コムギ無細胞合成系を用いて合成されたAtPPT1は合成中にリポソーム膜上に移行することが示されている。今回合成を試みた6種類の膜蛋白質についても、合成蛋白質の大部分がリポソーム膜上に移行することを確認した。基質特異性解析の結果、4種のプラスチド型リン酸輸送体はアミノ酸配列からの予測と一致してMcPPT1はホスホエノールピルビン酸、McTPT1はトリオースリン酸、McGPT1とMcGPT2はグルコース６−リン酸に対する高い輸送活性が検出された。また、AtDTCおよびPfDTCでは、対向基質としてオキサロ酢酸、２−オキソグルタル酸、リンゴ酸を選択した場合に２−オキソグルタル酸の交換輸送活性が顕著に高いことを確認し、マラリア原虫の直鎖状TCA経路を維持する上で重要な輸送体機能を明らかにした。以上より、無細胞蛋白質合成を基盤としたインビトロ再構成系がpPTやMCの機能解析に幅広く適用可能であることを示した。(Nozawa A, Fujimoto R, Matsuoka H, Tsuboi T, Tozawa Y. Cell-free protein synthesis, reconstitution and characterization of mitochondrial dicarboxylate-tricarboxylate carrier of *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Commun* 141:612-617, 2011)

cell-free protein synthesis, organelle transporters, proteoliposomes

講演番号：4A30a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ A校舎30会場

イオンチャネル蛋白質の完全インビトロ再構成系による機能解析

Reconstitution and functional analysis of ion channel based on complete in vitro system

○戸澤 譲、竹田 弘法、白井 理[1]、日ビ 隆雄[2]、野澤 彰（愛媛大・無細胞セ、[1]京大院農・応用生命、[2]福井県大・生物資源）

○Yuzuru Tozawa, Hironori Takeda, Osamu Shirai[1], Takao Hibi, Akira Nozawa (Ehime Univ, [1]Kyoto Univ, [2]Fukui Pref Univ)

【目的】膜輸送蛋白質は、細胞間および細胞内の物質循環を制御する重要な機能を担っており、薬剤標的あるいは代謝工学における重要な研究対象となっている。しかしながら、膜輸送蛋白質の調製は、一般的に複数の技術的な困難を伴うため、総じて機能解析の研究効率が低いというのが現状である。我々は、膜輸送蛋白質の効率的な機能解析技術の確立を図ることを目的として、とりわけ組換え法による合成・単離・精製が困難とみなされているイオンチャネル蛋白質を材料に実験を進めている。今回、コムギ無細胞蛋白質合成技術を応用した蛋白質合成、蛋白質精製、ならびに脂質二分子膜上への精製蛋白質の再構成系の確立に至る全行程を「完全インビトロ系で確立する」試みを行ったので報告する。

【方法】イオンチャネル蛋白質として、シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)由来のカリウムチャネルKAT1を材料とし、アミノ末端にヒスチジンタグを付加したKAT1蛋白質の無細胞合成を行った。続いて、可溶化合成を可能とする添加界面活性剤の種類および濃度条件の探索を進めた。同時に、アフィニティーカラムによる精製諸条件の至適化を図った。さらに、精製蛋白質について、平板膜法の導入によるカリウムイオン電流の測定系の構築を進め、様々な条件下でのイオン電流測定を行った。

【結果】従来のコムギ無細胞蛋白質合成系では、合成されたKAT1蛋白質のほとんどが不溶化してしまうことから、可溶化合成を可能とする添加剤として、有効な界面活性剤の種類および濃度条件の探索を進め、幾つかの界面活性剤の添加条件でのKAT1蛋白質の可溶化合成系を確立した。続いて、TALONカラムによる合成KAT1蛋白質の精製条件を至適化し、精製過程で初期の添加界面活性剤をDDMへ置換し、DDMミセルの状態でKAT1蛋白質を精製可能な系を構築した。引き続き、大豆由来のアゾレクチンをベースとする脂質二分子膜を利用することにより、精製KAT1を脂質平面膜上へ効率的に再構成する系を確立することにも成功し、電圧依存的なKAT1チャネルによるカリウムイオン電流の測定系を構築するに至った。再構成したKAT1のカリウムチャネル機能はセシウムイオンにより阻害を受けること、チャネルの開口にはsub openと予想される遷移状態が存在することも観察された。本解析系においては、パッチクランプ解析系で一般的に見られる経時的なチャネル電流の減衰が見られず、安定で再現性の良い電流測定が可能であった。現在、本系が種類の異なる他のチャネル蛋白質にも適用可能か否かについて、確認を進めている。

Cell-free protein synthesis, ion channel, planar lipid bilayer

講演番号：4A30a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ A校舎30会場

タイトル　植物膜電位依存性Kチャネルのリン酸化制御
Title　Analysis of the C-terminus Threonines conserved in voltage dependent K channels
中山 浩太、○松本 尚樹、浜本 晋、魚住 信之（東北大院工・バイオ工）
Kota Nakayama, ○Naoki Matsumoto, Shin Hamamoto, Nobuyuki Uozumi (Tohoku Univ.)

【背景･目的】葉の表皮に分布している気孔は一対の孔辺細胞からなる組織であり、光合成に必要な二酸化炭素の取り込みや水の蒸散を司っている。シロイヌナズナの孔辺細胞に発現する KAT1 は *Shaker* 型 K^+チャネルファミリーに属する膜電位依存性の K^+チャネルであり、気孔の開口制御に重要な役割を担っている。この KAT1 チャネル活性は膜電位だけでなく、生体内因子によっても制御されており、リン酸化酵素である SNF1-related protein kinase 2s (SnRK2s) ファミリーに属する SnRK2.6 が、ストレスに応答する植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)存在下で活性化し、KAT1 のチャネル活性の制御をしていることが知られている。我々はこれまでに、SnRK2.6 が KAT1 の C 末端、細胞質領域に位置する 306 番目のトレオニン(Thr^{306})をリン酸化することにより、その K^+チャネル活性を抑制していることを明らかにした。シロイヌナズナには *Shaker* 型 K^+チャネルとして 9 つの遺伝子が存在しており、それらの全てで KAT1 における Thr^{306}が保存されていることから、これらのチャネルも KAT1 と同様に、C 末端のリン酸化によりそのチャネル活性が制御されている可能性が示唆される。そこで本研究では、*Shaker* 型 K^+チャネルファミリーに属するチャネル(KAT1, KAT2, AKT1, AKT2, SKOR, GORK)の保存されている Thr について解析を行った。
【実験】KAT 1 の Thr^{306} を様々なアミノ酸に置換した変異チャネル(T306A, T306D, T306N, T306Q, T306S)および、同じく KAT2, AKT1, AKT2, SKOR, GORK について、KAT 1 の Thr^{306}に対応する、それぞれの Thr のアミノ酸(Ala, Asp)変異チャネルを作製し、アフリカツメガエルの卵母細胞(*Xenopus* oocyte)へ導入しボルテージクランプ法を用いてその K^+透過性を検討した。また、同様の変異チャネルを出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*)の K^+取り込み能欠損株(CY162)へ導入し、低濃度 K^+条件下における生育相補実験を行った。
【結果･考察】KAT1においては、ボルテージクランプ法および、生育相補実験について、非リン酸化を模した変異チャネルであるThr^{306}のAla置換チャネルでは野生株と比較して大きな差は見られなかったが、リン酸化を模した変異チャネルであるThr^{306}のAsp置換チャネルではそのK^+チャネル活性に欠損が見られた。これは前述したKAT1活性の制御機構モデルと一致している。また、KAT2においてボルテージクランプ法による測定の結果、保存されているThrをAla、またはAspに置換した変異チャネルでKAT1と同様の結果が得られた。このことより、KAT2に保存されているThrはリン酸化されることでチャネルの活性を制御している部位であることが示唆される。その他の*Shaker*型K^+チャネルでは、保存されているThrをAla、またはAspに置き換えた変異チャネルにおいて、そのK^+チャネル活性が大きく減少した。このことから、保存されているThrがチャネル活性調節に何らかの役割を担っていることが示唆された。

ion channel, kinase

講演番号：4A30a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ A校舎30会場

インベルターゼはプラスチドシグナリングを介した炭素・窒素代謝バランス制御に関与する

An invertase regulates carbon and nitrogen balance via plastid signaling

宮崎　望[1]、Daniel Padilla-Chacon[2]、北條真之[2]、大鳥久美[2]、丸田隆典[2,3]、○田茂井政宏[1,2]、重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]島根大・生資科・生命工）

Nozomi Miyazaki[1], Daniel Padilla-Chacon[2], Masayuki Hojo[2], Kumi Otori[2], Takanori Maruta[2,3], ○Masahiro Tamoi[1,2], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ, [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.)

【目的】高等植物の炭素（C）と窒素（N）の代謝はそれらの絶妙なバランス（C/Nバランス）により厳密に制御されている。最近、ショ糖を含む培地上でシードリングの緑化が抑制される変異株、*sicy-192*を単離し、本変異株はプラスチド型インベルターゼ（INV-E）の機能獲得型変異株であることを明らかにした。ショ糖添加培地上における*sicy-192*では、光合成系および窒素同化系遺伝子群の発現がそれぞれ抑制および誘導されていたことから、INV-EはC/Nバランス制御に関与することが示された。これまでに、核コードの光合成系遺伝子の一部の発現はプラスチド遺伝子発現（PGE）を発端としたプラスチドから核への逆行性シグナリング（プラスチドシグナリング）により制御されることが知られている。そこで、*sicy-192*におけるPGEやプラスチドシグナリングに関与する遺伝子群の発現について調べるとともに、プラスチドシグナリングのマスターレギュレーターであるGENOME UNCOUPLED1欠損株（*gun1-101*）と*sicy-192*の二重変異株を用いてプラスチドシグナリングを介したC/Nバランス制御機構を解析した。

【結果・考察】ショ糖添加培地上の*sicy-192*において、プラスチドコードRNAポリメラーゼ（PEP）の下流遺伝子の発現が特異的に抑制された。PGE阻害剤処理は光合成系遺伝子群の抑制および窒素同化系遺伝子群の誘導を引き起こしたが、この現象は*gun1-101*では緩和されていた。また、ショ糖添加培地上の*sicy-192*ではプラスチドシグナリングの下流で機能する転写因子群の発現が抑制されていた。さらに、ショ糖添加培地の*sicy-192*で見られた光合成系遺伝子群の発現抑制および窒素同化系遺伝子群の誘導は、*gun1-101*との二重変異株において部分的に回復していた。これらの事実は、INV-Eがプラスチドシグナリングを介したC/Nバランス制御に関与することを如実に示していた。一方、興味深いことに、*sicy-192*と比較して、二重変異株のショ糖感受性は顕著に促進されていた。したがって、プラスチドシグナリングを介したC/Nバランス変化は、*sicy-192*の緑化に重要であることが示唆された。

invertase, C/N balance, plastid signaling

講演番号：4A30a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ A校舎30会場

光合成機能強化植物を用いた炭素・窒素バランス制御機構の解明

Regulation of carbon/nitorogen balance in photosynthesis-elevated plants

○丸山俊樹[1]、大鳥久美[2]、Daniel Padilla-Chacon[2]、作山治美[2]、田茂井政宏[1,2]、重岡　成[1,2]([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ)

○Toshiki Maruyama[1]、Kumi Otori[2]、Daniel Padilla-Chacon[2]、Harumi Sakuyama[2]、Masahiro Tamoi[1,2]、Shigeru Sigeoka[1,2]([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.、[2]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ.)

【目的】これまでに我々は、ラン藻由来FBP/SBPaseを葉緑体で発現させることにより光合成能が上昇し、生育促進、収量増大が見られることを明らかにしてきた。これらの形質転換体では全炭素(C)と全窒素(N)のバランス（C/Nバランス）に変化はなく、CO_2固定能の増大に伴い窒素代謝系が促進されていると考えられる。そこで本研究では、光合成能強化に伴う窒素代謝系の促進によるC/Nバランス制御機構を分子レベルで解明することを目的として、シロイヌナズナ葉緑体でのFBP/SBPase発現による光合成能強化が窒素代謝産物および関連酵素遺伝子群の発現に及ぼす影響を生育段階別に検討した。

【結果】FBP/SBPaseを葉緑体で発現させたシロイヌナズナ(ApFS)は野生株より光合成活性が上昇し、8週齢における生重量は野生株の1.2～1.5倍に増加していた。2週齢ではカルビン回路中間体やデンプンおよびショ糖の増加、種々の遊離アミノ酸量の減少が見られたが、全C/Nバランスに有意な差は認められなかった。転写レベルでは、ショ糖合成酵素およびアスパラギン合成酵素*ASN1*の遺伝子発現量は増加していたが、カルビン回路に関連する酵素遺伝子の発現量に変化は認められなかった。また、糖シグナリングに関与する*SnRK1.1*、アスパラギン合成酵素*ASN1*、その制御因子*bZIP11*の発現量が変化していた。一方、5週齢のApFS株では野生株と比較してデンプン、ショ糖量およびグルタミンの増加が認められたが、全C/Nバランスに有意な差は認められなかった。さらにカルビン回路に関連する酵素遺伝子の発現量の減少やショ糖合成および窒素代謝に関連する酵素遺伝子の増加が認められた。これらの結果より、生育初期では光合成能の上昇により光合成代謝物量が増加し、生育の促進に伴って窒素がタンパク質合成などに用いられることから一時的に遊離アミノ酸が減少したと考えられる。このようなC/Nアンバランスがシグナルとなり、糖炭素代謝関連遺伝子の発現を抑制、窒素代謝系遺伝子を誘導することによって、C/Nバランスを維持していると考えられる。

photosynthesis,C/N balance, nitrogen metabolism

講演番号：4A30a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ A校舎30会場

強光ストレス耐性に関わるPsbP-like protein 1の分子機能解析

Functional analysis of PsbP-like protein 1 under high-light stress

松井　信太郎[1]、石原　靖子[1]、井戸　邦夫[1]、佐藤　文彦[1]、○伊福　健太郎[1,2]（[1]京大院・生命、[2]JSTさきがけ）

Shintaro Matsui[1], Seiko Ishihara[1], Kunio Ido[1], Fumihiko Sato[1], ○Kentaro Ifuku[1,2] ([1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [2]JST-PRESTO)

【目的】PsbP-like protein 1 (PPL1)は、緑色植物における光化学系II (photosystem II, PSII)酸素発生系の構成タンパク質であるPsbPのホモログ分子の一つである。これまでに我々のグループでは、PPL1が強光照射下においてPSII修復過程に関与する因子であることを報告した(Ishihara et al., Plant Physiol 145, 668-679, 2007)。しかしながら、PSII修復過程におけるPPL1の分子機能は明確ではなかった。

【方法】新たにPPL1の発現が抑制されたシロイヌナズナRNAi株（*ppl1i*株）を複数ライン作製し、その光合成機能をクロロフィル蛍光法や生化学的分析により評価した。

【結果】クロロフィル蛍光分析の結果、PPL1-RNAi株（*ppl1i*株）ではPPL1発現制御レベルに応じた強光感受性が示された。さらに通常の生育条件下においても、*ppl1i*株ではPSIIの最大量子収率(*Fv*/*Fm*値)の有意な低下が認められた。Blue-Native PAGE等を用いた生化学的解析の結果、*ppl1i*株では集光タンパク質LHCとPSIIコア複合体との超複合体が減少していた。この結果は、PPL1がPSIIの機能発現においてより構成的な役割を担っており、その分子機能が強光ストレス下において顕在化していることを示唆していた。野生型チラコイド膜を弱い界面活性剤で処理した後、膜タンパク質複合体をショ糖密度勾配遠心法により分離し、分画したサンプルをSDS-PAGE/Immunoblot により解析した。その結果、PPL1は比較的比重の重い画分で検出され、何らかの複合体と相互作用することが示唆された。しかしながら、PPL1とPSIIコア複合体との相互作用は明確ではなかった。現在、PSII-LHCII複合体形成におけるPPL1の役割と強光ストレス耐性との関わりについてさらに解析を進めている。

Arabidopsis, high-light stress, photosystem II

講演番号：4A30a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ A校舎30会場

イネヌクレオチドピロホスファターゼ／ホスホジエステラーゼのプラスチド局在に関する研究

Plastid Targeting of Nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase in Rise

○梅澤 幸歩[1]、金古 堅太郎[1]、甲州 努[1]、石本 卓也[2]、伊藤 紀美子[1]、林 八寿子[3]、豊岡 公徳[4]、三ツ井 敏明[2]（[1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大農・応生化、[3]新潟大理・自然環境、[4]理研・植物センター）

○Yukiho Umezawa[1], Kentaro Kaneko[1], Tsutomu Koshu[1], Takuya Ishimoto[2], Kimiko Itoh[1], Yasuko Hayashi[3], Kiminori Toyooka[4], Toshiaki Mitsui[2] ([1]Grad. Sch. Sci&Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Applied Biol. Chem., Niigata Univ., [3]Dept. Environmental Sci., Niigata Univ., [4]RIKEN Plant Schience Center)

【目的】我々は、イネにおける新規のデンプン集積抑制酵素であるヌクレオチドピロホスファターゼ／ホスホジエステラーゼ(Nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase：NPP)の遺伝子を発見・同定し、その機能解析を進めている。イネには*NPP*ファミリーが6種類存在し、デンプンの前駆体であるADP-グルコースなどの糖ヌクレオチドを分解するタイプと、ADPやUDPといったヌクレオチドを分解するタイプの2種類に分類された。また、NPP1、NPP2およびNPP6は*N*- 結合型糖鎖を有することが確認されている。一般的に*N*- 結合型糖鎖を有する糖タンパク質はER-ゴルジ体を経由した後、液胞に輸送、あるいは細胞外へと分泌される。しかし、NPP1については、NPP1-GFP融合タンパク質発現細胞の免疫電子顕微鏡観察および共焦点レーザー顕微鏡観察により、糖タンパク質であるにもかかわらず、プラスチドに局在化するという、新奇の輸送経路を通るということが明らかになった。NPP2、NPP6においても、同様にプラスチドに局在化する現象が見られた。さらにNPP1-GFP発現イネ細胞では、プラスチド表面にGFPのドット状のシグナルが観察され、NPPのプラスチドへの輸送、局在化にゴルジ体が関与している可能性が示唆された。さらに詳細な解析を行うため、*NPP1*高発現イネ細胞(UNP1)にトランスゴルジマーカーである*ST-GFP*を導入した細胞(UNP1/ST-GFP)の観察を行った結果、プラスチド内にST-GFPの蛍光が観察され、NPPは、トランスゴルジ膜とともにプラスチド内へ輸送されることが示唆された。これらを受け、より詳細な解析を行うため、透過型電子顕微鏡での観察を行った。
【方法】*NPP1*高発現イネ細胞(UNP1)にトランスゴルジマーカーである*ST-GFP*を導入した細胞(UNP1/ST-GFP)の透過型電子顕微鏡観察を行った。また、抗GFP抗体を用いて免疫電子顕微鏡観察を行い、プラスチド内部に観察された小胞がゴルジ膜由来のものであるか観察を行った。
【結果】透過型電子顕微鏡を用いた観察では、UNP1/ST-GFPにおいてWT細胞では確認されなかった小胞が観察された。さらに、免疫電子顕微鏡観察では、プラスチドに接近している小胞、プラスチド内部の小胞が金コロイドで標識された。この結果より、プラスチド局在糖タンパク質であるNPP1は、トランスゴルジ膜とともにプラスチド内へ輸送されることが示唆された。

Membrane traffic, Plastid, Electron microscope

講演番号：4A30a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ A校舎30会場

タイトル　シロイヌナズナ由来大腸菌TyrP相同蛋白質の機能解析
Title Analysis of the Arabidopsis homologue of TyrP from *Eschericia coli*.
Sattasuk Kwanchanok、清水　綾子、○秋田　充（愛媛大農・生資科）
Sattasuk Kwanchanok, Ayako Shimizu, ○Mitsuru Akita (Ehime Univ.)

【目的】芳香族アミノ酸は、植物の二次代謝産物合成の前駆物質として重要であり、葉緑体で合成される。しかし、合成後の芳香族アミノ酸がどのような輸送蛋白質を利用し、どのようなメカニズムで葉緑体外に移動するのかについては未解明である。そこで、われわれは、シロイヌナズナゲノム中から葉緑体局在芳香族アミノ酸トランスポーター候補遺伝子を見出し、その遺伝子産物の機能解析を行うこととした。
【方法及び結果】葉緑体における芳香族アミノ酸トランスポーターを同定するために、大腸菌チロシントランスポーター（TyrP）相同蛋白質をコードする遺伝子（At5g19500）をシロイヌナズナゲノム中に見出した。この遺伝子産物（At5g19500p）は、葉緑体移行シグナルと予測される領域をアミノ末端部に有しており、コンピューターによる局在予測は、葉緑体局在を示唆した。そこで、At5g19500pの機能解析の第一歩として、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系により獲得したAt5g19500pを用いた*in vitro*葉緑体蛋白質輸送実験を行った。At5g19500pは、葉緑体に輸送された結果、プロセシングされた。輸送実験に供した葉緑体を、さらに分画することで、プロセシングされたAt5g19500pは、内包膜に局在することを明らかにした。現在、*in vitro*葉緑体蛋白質輸送実験によりAt5g19500pの配向性の決定を試みている。また、5種の主要な芳香族アミノ酸トランスポーターを欠損した大腸菌変異株を作製し、変異株中でAt5g19500pを過剰発現することで、At5g19500pのアミノ酸輸送活性測定やアミノ酸特異性の決定を試みている。

amino acid transporter, chloroplast, cell-free protein synthesis

講演番号：4A30a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ A校舎30会場

BiFC法によるシロイヌナズナクラスリンサブユニット間の相互作用の解析

Analysis of interaction between clathrin subunits in Arabidopsis by BiFC Assay

○石川 翔太、山内 淳司[1]、松波 絵理香、地阪 光生、長屋 敦、横田 一成、中川 強[2]、西村 浩二[2]（島根大・生資、[1]国立成育医療セ研・薬剤治療、[2]島根大・総科研センター）

○Syouta Ishikawa, Junji Yamauchi[1], Mitsuo Jisaka, Tsutomu Nagaya, Kazushige Yokota, Tuyoshi Nakagawa[2], Kohji Nishimura[2] (Shimane Univ.·Fac.of Life and Env. Sci., [1]Dept. of Pharmacol., Natl. Inst. Child Hlth. Dev., [2] Shimane Univ.·Cen. for Integ. Res. in Sci.)

植物のクラスリン被覆小胞（CCV）は、トランスゴルジ網からの液胞タンパク質の輸送や、細胞膜からの細胞膜受容体タンパク質などのエンドサイトーシス輸送を担う。CCVの被覆タンパク質はクラスリンおよびアダプタータンパク質複合体から構成させており、アダプタータンパク質の種類により輸送経路の特異性が認められている。クラスリンはクラスリン重鎖（CHC）と軽鎖（CLC）の二つのサブユニットが結合した構造の三量体からなるトリスケリオンと呼ばれる三脚巴の構造を有する。CHCのアミノ酸配列は真核生物で広く保存されているが、CLCの保存性は比較的低く、このためCLCは生物種特異的な機能を持つことが考えられる。本研究では植物のCCVの機能の分子基盤を理解するために、シロイヌナズナクラスリン分子内のCHCとCLCの相互作用を詳細に解析した。相互作用を調べるために、簡便で感度の高い二分子蛍光相補性解析（BiFC）を用いた。BiFC法によりシロイヌナズナCLCはCHCと相互作用することが認められた。このことは酵母two-hybridアッセイとpull-down法を用いた解析でも確認された。CLCとCHC間の相互作用を担う領域を決定するために、両鎖の種々の領域について、BiFC法によりさらに詳細な相互作用を調べた。その結果、CLCは主に中央のCHCBD領域（82-144）で重鎖のカルボキシル末端側のHub領域（1086-1705）と相互作用することが示された。このことからシロイヌナズナのCHCとCLCは哺乳動物のクラスリンと同様な様式で相互作用をすることが示唆された。さらに変異導入解析によりCLCとCHCとの相互作用に関わるアミノ酸をCHCのHub領域とCLCのCHCBD領域のそれぞれで同定したので合わせて報告する。

Clathrin, Vesicle trafficking, BiFC

講演番号：4A30a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ A校舎30会場

シロイヌナズナキチン受容体の細胞内分子挙動の解析

Analysis of molecular behavior of chitin receptor in Arabidopsis cells

安川 大喜[1]、的場 由佳[1]、松波 絵理香[1]、石川 翔太[1]、地阪 光生[1]、長屋 敦[1]、横田 一成[1]、中川 強、○西村 浩二（島根大・総科研センター、[1]島根大・生資）
Daiki Yasukawa[1], Yuka Matoba[1], Erika Matsunami[1], Syouta Ishikawa[1], Mitsuo Jisaka[1], Tsutomu Nagaya[1], Kazushige Yokota[1], Tuyoshi Nakagawa, ○Kohji Nishimura (Shimane Univ.·Cen. for Integ. Res. in Sci., [1]Shimane Univ.·Fac.of Life and Env. Sci.)

シロイヌナズナキチン受容体（CERK1）は、病原菌の細胞壁に由来するエリシター分子としてキチンを認識し、植物病原菌に対する防御応答の信号伝達因子として機能していることが近年の研究から明らかになってきた。CERK1はRLK型の細胞膜受容体であり、キチンを認識する細胞外ドメインと細胞内信号伝達経路の活性化に関わる細胞質ドメインからなる。本研究ではsGFPと融合したCERK1タンパク質（CERK1-sGFP）を発現する形質転換シロイヌナズナの根を用いて、CERK1分子の細胞内挙動を共焦点レーザー蛍光顕微鏡により解析した。CERK1-sGFPは主に細胞膜に局在するが、細胞内の動的なドットとしても局在していた。リサイクリングエンドサイトーシスの阻害剤として知られるBrefeldin A処理を施した結果、CERK1-sGFPの細胞内のドットは、エンドサイトーシス追跡試薬であるFM4-64で染色されるBFA bodyの一部と共局在し、CERK1もエンドサイトーシスすることが示唆された。CERK1の細胞内輸送経路に関して、各種小胞輸送阻害剤を用いた解析結果を報告する。

Chitin, Chitin receptor, Vesicle trafficking

講演番号：4A31a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ A校舎31会場

シロイヌナズナGDP-L-ガラクトースホスホリラーゼ遺伝子の発現解析

Functional analysis of GDP-L-galactose phosphorylase gene in Arabidopsis

増澤 拓也、小口能里枝、丸田隆典、澤 嘉弘、重岡 成[2]、○石川 孝博（島根大・生資科・生命工、[2]近畿大・農・バイオ）

Takuya Masuzawa, Norie Oguchi, Takanori Maruta, Yoshihiro Sawa, Shigeru Shigeoka[1], ○Takahiro Ishikawa (Shimane Univ., [1]Kinki Univ.)

植物は細胞内にmMオーダーの高濃度でアスコルビン酸（AsA）を含んでおり、その生合成経路は動物とは異なりD-マンノース(D-Man)およびL-ガラクトース(L-Gal)を代謝中間体とするD-Man/L-Gal経路を主要に生合成される。GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼは、D-Man/L-Gal経路の中心的役割を担っており、シロイヌナズナには同酵素をコードする2つの相同遺伝子(*VTC2*, *VTC5*)が存在する（Plant J., 2007; BBB, 2008)。今回、植物AsA生合成調節機構の解明を目的に、*VTC2*および*VTC5*遺伝子の発現解析および同タンパク質の細胞内局在性について解析を行った。

定常条件下（12時間明暗、100 μmol/m²/s）で生育したシロイヌナズナ葉のAsA含量は日周変動を示した。*VTC2*および*VTC5*遺伝子の発現レベルを検討したところ、両遺伝子はAsAレベルの変動と相関して、光照射6時間までに一過的に発現上昇した。しかし、*VTC5*遺伝子の発現レベルは常に*VTC2*の1/100程度であった。*VTC2*と*VTC5*遺伝子の5’UTRを含め転写開始点から約1.5 kbpの配列をプロモーター領域として単離し、ルシフェラーゼ(LUC)遺伝子発現ベクターに導入後、シロイヌナズナに形質転換した。得られた形質転換体を用いてLUC活性によりプロモーター活性の評価を行った結果、*VTC2*および*VTC5*とも光応答性示し、遺伝子発現解析の結果と良く一致した。長ネギ表皮細胞およびシロイヌナズナ葉でVTC2およびVTC5とGFPとの融合タンパク質を一過的に発現させ、細胞内局在性を検討したところ、VTC2およびVTC5タンパク質は細胞質と核の両方に局在することが示された。

ascorbic acid, Arabidopsis, gene expression

講演番号：4A31a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ A校舎31会場

シロイヌナズナにおける新奇アスコルビン酸欠乏変異体の機能解析

Analysis of vitamin C-deficient Arabidopsis mutant

○原井 健司、丸田隆典、澤 嘉弘、重岡 成[2]、石川 孝博（島根大・生資科・生命工、[1]近畿大・農・バイオ）

○Kenji Harai, Takanori Maruta, Yoshihiro Sawa, Shigeru Shigeoka[1], Takahiro Ishikawa (Shimane Univ., [1]Kinki Univ.)

【目的】我々のグループではこれまでに、シロイヌナズナのビタミンC（AsA, アスコルビン酸）欠乏vtc変異体を用いた解析から、植物のAsA生合成はD-マンノース/L-ガラクトース（D-Man/L-Gal）経路が主要経路として機能していることを明らかにしている（Plant J., 2007）。*vtc*変異体は現在、５種類（*vtc1*-*vtc5*）が知られており、そのうち*vtc3*のみ原因遺伝子が未同定である。本研究では*VTC3*遺伝子の機能を明らかにするために、光条件下におけるAsAレベルおよびD-Man/L-Gal経路構成酵素遺伝子の発現レベルについて検討を行った。

【結果】100 μmol m^{-2} s^{-1}の光条件下、12時間/12時間の定常条件で生育させた*vtc3*変異体の葉中AsAレベルは、野生株と比較して約50%程度に低下していた。野生株の葉中AsAレベルは明暗周期に対して光応答性が見られるが、*vtc3*変異体ではこの光応答性が観察されなかったことから、VTC3はAsA生合成の光調節に関与していることが示唆された。明暗条件におけるD-Man/L-Gal経路関連酵素遺伝子の発現レベルを定量的PCRにより検討したところ、*vtc3*変異体と野生株の間で各遺伝子の発現レベルや発現パターンに顕著な違いは認められなかった。現在、光条件下における*vtc3*変異体と野生株の発現タンパク質について検討を進めている。

ascorbic acid, Arabidopsis, light regulation

講演番号：4A31a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ A校舎31会場

シロイヌナズナ HsfA4c を介した HsfA2 の発現制御機構の解明

Regulation mechanism of HsfA2 expression via HsfA4c

○林秀樹[1]、押川美穂[2]、野坂亮太[1]、西澤（横井）彩子[2]、薮田行哲[3]、重岡成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]鳥取大・農・生資環）

○Hideki Hayashi[1], Miho Oshikawa[2], Ryota Nosaka[1], Ayako Nishizawa-Yokoi[1], Yukinori Yabuta[3], Shigeru Shigeoka[1,2]（[1] Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ、[2] Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ 、[3] Fac. Agr., Tottori Univ.）

【目的】

シロイヌナズナに 21 種類存在する熱ショック転写因子 Hsf は、複雑なネットワークを形成し、種々の環境ストレスに応答している。その中でも HsfA2 は、種々の環境ストレス条件下において、分子シャペロンだけでなく、抗酸化酵素やショ糖合成酵素など様々な細胞防御に関連する遺伝子の発現を誘導することから、環境ストレス応答のキーレギュレーターであると考えられた。そこで HsfA2 の発現制御機構の解明を行った結果、HsfA2 は HsfA1d および HsfA1e により制御されていることが明らかとなった。しかしながら、KO-*HsfA1d/A1e* 二重変異株において、HsfA2 の強光および高温応答は完全に抑制されなかったことから、他の因子も HsfA2 の発現制御に関与している可能性が示唆された。そこで本研究では、HsfA2 発現の新規の制御因子を同定し、HsfA2 を介した Hsf シグナリングネットワークをより詳細に解析した。

【方法および結果】

HsfA2 の転写開始点から上流-188 bp のプロモーター領域にルシフェラーゼを連結したコンストラクトをレポーター、HsfA4c を過剰発現させるベクターをエフェクターとした一過的レポーターアッセイを行ったところ、HsfA2 のプロモーターの活性化が認められた。また KO-*HsfA4c* 遺伝子破壊株において、HsfA2 の強光および高温応答が野生株に比べ抑制された。以上のことから、HsfA4c は HsfA2 の発現に機能していることが示唆された。しかしながら、HsfA4c 過剰発現を用いて HsfA2 の強光および高温応答を解析したところ、HsfA2 の強光および高温応答は、野生株に比べ抑制された。また、その標的遺伝子である Hsp18.1-CI の強光および高温応答もまた抑制されていた。このことから、HsfA4c は HsfA2 の強光および高温応答に必要であるが、過剰な HsfA4c の発現は強光および高温応答にネガティブな影響を与える可能性が示唆された。現在、一過的レポーターアッセイにより、HsfA4c が HsfA2 の発現をネガティブに制御するためのシス配列を同定している。

heat shock transcription factor, stress response, Arabidopsis

講演番号:4A31a04
講演日時、会場:3月25日09:33～ A校舎31会場

シロイヌナズナGuanosine 3'-5'-bispyrophosphate (ppGpp) pyrophosphohydrolase (AtNUDX26)の機能解析

Functional analysis of Guanosine 3'-5'-bispyrophosphate (ppGpp) pyrophosphohydrolase (AtNUDX26) in Arabidopsis

○加藤貴大[1,]、伊藤大輔[1]、石川和也[2]、田茂井政宏[1,2]、吉村和也[3]、重岡　成[1,2]([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]中部大・応生・食栄)

○Takahiro Kato[1], Daisuke Ito[1], Kazuya Ishikawa[2], Masahiro Tamoi[1,2], Kazuya Yoshimura[3], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ、[2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ、[3] Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【目的】貧栄養条件下での原核微生物において、ppGppは主要なエネルギー消費過程であるタンパク質合成を阻害し、アミノ酸代謝関連遺伝子の制御を行う緊縮応答の制御因子として知られている。また、高等植物においても、ppGppは葉緑体型RNA Polymeraseの阻害に機能すること、種々の環境ストレスおよびホルモンに応答して生体内レベルが上昇すること、原核微生物のppGpp合成分解酵素 (RelA/SpoT) のホモログであるAtRSHsが葉緑体に局在していることが明らかになっており、本分子の植物細胞内における生理学的意義が注目されている。Nudix hydrolase (NUDX) はヌクレオシド2リン酸由来の基質を加水分解するタンパク質ファミリーの総称である。これまでに当研究室では、高等植物シロイヌナズナに存在する28種類のNUDX (AtNUDX1-27, AtDCP2) の分子特性や生理機能解析を行い、それらがNAD(P)HやADP-riboseの加水分解を介して生物的/非生物的ストレス応答の制御に機能することを明らかにしてきた。最近、高度光熱耐性菌において、ppGpp特異的なNUDX (ndx8) が存在し、緊縮応答時のppGppレベルの制御に重要な役割を示すことが明らかになった。そこで本研究では、ppGpp代謝に関与するAtNUDXの同定およびその生理機能解析を試みた。

【方法】アフィニティーカラムを用いて精製したHis-tag融合AtNUDXリコンビナントタンパク質のppGpp pyrophosphohydrolase活性を、HPLCを用いて測定した。mRNA発現レベルはReal-time RT-PCRにより解析した。

【結果】精製リコンビナントAtNUDXタンパク質 (AtNUDX1-27) を用いてppGpp pyrophosphohydrolase活性を測定した結果、細胞質局在型AtNUDX11, 25、ミトコンドリア局在型AtNUDX15および葉緑体局在型AtNUDX26にppGpp pyrophosphohydrolase活性が検出された。次に、1/2MS培地で2週間生育させた野生株に乾燥、塩 (250 mM NaCl) およびパラコート (25 μM) 処理を行い、AtNUDX11, 15, 25, 26およびAtRSHs遺伝子群の発現応答を解析した。その結果、乾燥ストレス条件下において、AtNUDX26およびAtRSHsの発現レベルの増加が認められた。これらの結果から、AtNUDX26は乾燥ストレス下における葉緑体内ppGppレベルの制御に機能していると考えられた。現在、AtNUDX26およびAtRSHsの遺伝子破壊株を用いた生理機能解析を行っている。

ppGpp, Nudix hydrolase, RelA/SpoT

講演番号：4A31a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ A校舎31会場

イネ細胞壁成分の蓄積を担うBC1の局在および炭水化物結合モジュールの解析

○今井 一貴、佐藤 かんな、伊藤 幸子、鈴木 瑠、武内 佐知、峯岸 和明、梶田 真也、片山 義博[1]（農工大・BASE、[1]日本大・生資）
○Kazuki Imai, Kanna Sato, Sachiko Ito, Ryu Suzuki, Sachi Takenouchi, Kazuaki Minegishi, Shinya Kajita, Yoshihiro Katayama[1] (Tokyo Univ. A&T, [1]Nihon Univ.)

【背景】
植物バイオマスの約60%以上を占める細胞壁は主に多糖類（セルロース・ヘミセルロース等）・芳香族化合物（リグニン等）などの様々な成分により構成されている。現在までに細胞壁成分合成酵素やそれを支配する転写因子の同定を中心に様々な研究が行われ、成分合成過程を制御している遺伝子の複雑なネットワークが明らかにされてきた。一方で合成された成分の分泌・輸送・蓄積の過程に関しては、それを担う遺伝子の機能同定が困難であることから解明が遅れている。これまで我々は細胞壁成分の分泌・輸送・蓄積の制御を解明するのに適した突然変異体の探索を行ってきた。イネ単因子劣性変異体である*bc1*変異体は植物特異的なGPI-anchored proteinを完全に欠損しており葉や茎が脆く折れやすい。以前に行った顕微鏡による詳細な組織観察の結果、節間の繊維細胞における細胞壁で芳香族化合物（リグニン）などの細胞壁成分からなる巨大構造物が異常に蓄積していることが明らかになった。現在我々は*BC1*がコードするGPI-anchored proteinが担う細胞壁成分の蓄積過程を解明することを目的とし、以下に示した方法によりBC1の機能解析を進めている。
【方法および結果】
BC1の局在性解析：BC1のN末端もしくはC末端領域にGFPを融合させたGFP融合BC1発現コンストラクトを作製し*bc1*変異体に形質転換した。導入遺伝子が発現していることを確認し、節間の組織観察を行った結果、C末端GFP融合BC1を発現させた組換えイネ節間では繊維細胞における細胞壁の表現型が部分的に復帰していることが確認された。以上によりC末端GFP融合BC1がBC1機能を保持していることが示唆されたため、現在は抗GFP抗体を用いてC末端GFP融合BC1組換えイネ節間の繊維細胞におけるGFP融合BC1の局在性を解析している。
BC1の炭水化物結合モジュール(CBM)機能解析：BC1のN末端領域には放線菌セルラーゼ/キシラナーゼの炭水化物結合モジュール(CBM)2a/2bと類似した配列が保持されている。CBM機能上重要なアミノ酸を置換変異させた変異$bc1^{CBM}$を導入した*bc1*変異体は節間の繊維細胞における細胞壁の表現形を完全には復帰させなかった。この結果によりCBM類似配列はBC1が担う細胞壁成分の蓄積過程における機能において重要な役割を果たすことが示された。現在はCBM類似構造を介しBC1が相互作用している多糖を特定する解析を行っている。これまでにGST融合CBM発現コンストラクト組換え大腸菌による発現系を構築し、得られた粗タンパク質溶液についてGST結合カラムによりGST融合CBMを精製した。今回はこれらタンパク質溶液を用いて、Affinity electrophoresis等により結合特異性をもつ細胞壁多糖の探索を行った結果について報告する。

Plant cellwall biosynthesis, GPI-anchored protein, Carbohydrate binding module

講演番号：4A31a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ A校舎31会場

タイトル　植物特異的ERF転写抑制因子のプロテアソームによる制御とその機能の解析
Title　Regulation of ERF transcriptional repressors by proteasome in plants

○小山知嗣[1]、新居遙[1,2]、北島佐紀人[2]、高木優[3]、佐藤文彦[1]
([1]京大院・生命科学、[2]京工繊大院・応用生物、[3]産総研・生物プロセス)
○Tomotsugu Koyama[1], Haruka Nii[1,2], Sakihito Kitajima[2], Masaru Ohme-Takagi[3], Fumihiko Sato[1]
([1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto University, [2]Dept. Appl. Biol., Kyoto Institute of Technology, [3]Bioproduction Res. Inst., AIST)

【目的】
一群の植物特異的なERF転写因子は、植物の環境応答に重要な役割を果たす。これらの中には、標的遺伝子の発現を抑制するリプレッサー型ERFと、活性化するアクティベーター型が存在する。リプレッサー型ERFは環境応答の制御に中心的な役割を果たすと考えられているが、その機能制御や生理学的機能についての知見は乏しい。これまでに、リプレッサー型ERFのモデルであるタバコNtERF3がユビキチン結合酵素NtUBC2と結合し、NtUBC2による活性制御を受けることが示唆されている（Koyama et al. 2003)。そこで、本発表では、NtERF3がプロテアソームによる制御を受けること、ならびに、その制御が環境応答の１つである細胞死誘導に関わることを報告する。
【方法および結果】
１、試験管内での各ERFタンパク質の安定性を評価するために、NtERF3タンパク質、あるいは、アクティベーター型ERFタンパク質を大腸菌に発現させ、精製した。それぞれの組換えタンパク質をタバコ培養細胞抽出液と混合し、それらの残存量を経時的にウエスタン解析することにより、タンパク質安定性を評価した。その結果、アクティベーター型ERFと比較して、NtERF3が速やかに分解され、極めて不安定なタンパク質であることが明らかになった。
２、植物体内におけるNtERF3タンパク質の安定性を評価するために、NtERF3遺伝子を発現する組換え植物を作成した。この形質転換体では、プロテアソーム阻害剤処理により、NtERF3の蓄積量が増加することが認められた。同様の結果が、シロイヌナズナのリプレッサー型ERFであるAtERF4およびAtERF8についても得られた。
３、NtERF3タンパク質の過剰な蓄積が植物に及ぼす影響を明らかにするために、不安定化領域を同定し、その領域を欠損した安定化NtERF3を発現するコンストラクトをシロイヌナズナに導入した。この安定化NtERF3植物は、コントロールよりも生育が著しく劣っていた。また、生育異常の原因を明らかにするために、トリパンブルー染色による細胞死の検出を行ったところ、安定化NtERF3植物では、細胞死による染色が認められた。この細胞死に活性酸素種が関与していることをdiamino benzidine (DAB) 染色により確かめた。さらに、安定化NtERF3植物において、細胞死応答のマーカー遺伝子が発現上昇することも認められた。
以上の結果により、NtERF3はプロテアソームにより制御され、その過剰蓄積は過酸化水素生成を伴った細胞死誘導を促進することが明らかになった。

plant, proteasome, transcriptional repressor

講演番号：4A31a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ A校舎31会場

花成を制御するbZIP転写因子FDのリン酸化による機能制御機構

Functional analysis of FD phosphorylation in flowering

○川本　望[1]、遠藤　求[1]、笹部　美知子[2]、町田　泰則[2]、荒木　崇[1]（[1]京大・院・生命、[2]名大・院・理）

○Nozomi KAWAMOTO[1], Motomu ENDO[1], Michiko SASABE[2], Yasunori MACHIDA[2], and Takashi ARAKI[1]（[1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.）

【目的】シロイヌナズナのbZIP型転写因子であるFDはFTと相互作用し、花芽形態形成に関わる*API*遺伝子の発現を制御する。これまでの解析からFDとFTはFDの282番目のスレオニン(T282)のリン酸化依存的に複合体を形成することが示唆されていた。我々はこれまでにFDのT282が実際にリン酸化を受け、FTとの複合体形成がリン酸化依存的であることを示した。そこで、FDのリン酸化により、複合体形成の制御を行うタンパク質キナーゼの同定を目的として、以下の解析を進めた。

【方法】リン酸化の証明およびタンパク質キナーゼの同定のために、精製したFDタンパク質、またはオリゴペプチドを基質に、*in vitro*およびin gel kinase assayを行った。また酵母ツーハイブリット法、BiFC法により相互作用を確認した。

【結果】FDが実際にリン酸化を受けることが*in vitro*およびin gel kinase assayにより明らかになった。加えて、分子量の異なる複数のタンパク質キナーゼによってリン酸化を受けることも明らかとなった。さらに、基質特異性、カルシウム要求性などの生化学的な解析から、カルシウム依存的な活性様式をもつタンパク質キナーゼであるCDPKがFDのT282をリン酸化していると考えられる結果を得た。リン酸化を受けるFDのT282に、リン酸化を模倣する変異を導入し、相互作用を確認したところ、酵母ツーハイブリット法、BiFC法いずれにおいても相互作用が確認できた。以上の解析から、FDとFTの相互作用はリン酸化依存的な相互作用であると結論づけた。イネにおいてはリン酸化タンパク質を認識して、結合する14-3-3タンパク質がOsFD1(FDホモログ)とHd3a(FTホモログ)の相互作用を仲介している。FTと相互作用する14-3-3タンパク質のFDとの相互作用能を調べたところ、FTと同様にFDのリン酸化依存的な相互作用を示したことから、シロイヌナズナにおいても14-3-3タンパク質によってFDとFTの相互作用が仲介されている可能性があると考えている。14-3-3タンパク質の介在については*in vitro* pull down法による検証を進めている。

また機能未知であるが、FDはこれまでにリン酸化が予測されていたT282以外のリン酸化部位を基質特異性に基づくリン酸化部位予測および、*in vitro* kinase assayにより同定した。

現在、これらリン酸化の機能解析とタンパク質キナーゼの同定を進めており、得られた結果について報告する。

flowering, FD, phosphorylation

講演番号:4A31a08
講演日時、会場:3月25日10:27～ A校舎31会場

植物形質転換用リサイクルベクターシステムの開発

Development of Recycle Vector System for plant transformation

○芝原 健太、加藤 晃[1]、立木 賢輔[1]、木村 哲哉[2]、中川 強 (島根大･総科センタ･遺伝子、[1]奈良先端･バイオサイエンス、[2]三重大院･生物資源)

○Kenta Shibahara, Ko Kato[1], Kensuke Tachiki[1], Tetsuya Kimura[2], Tsuyoshi Nakagawa, (Dep.Mol.Funct.Genomics.,Cent for Int.Res.Sci.Shimane Univ, [1]Grad.Schl.Biol.Sci.,Nara Inst.Sci.Tech, [2]Dept.Sust.Res.Sci.,Grad.Schl.Biores.,Mie Univ.)

【目的】近年、遺伝子発現やタンパク質複合体の細胞内機能、局在の研究のために複数種の遺伝子を簡便に効率良く植物へと導入し、安定発現させることが可能な遺伝子導入技術の開発が必要となった。我々はGatewayクローニングにおいてLRクロナーゼによる組み換え反応が正確かつ効率良く進行することに着目し、LR反応を繰り返して遺伝子を同一のベクターに順次クローニングする方法の開発を進めてきた。これまでにattL5-Pro-attR1-attR2-T_{NOS}-attR4-attR3-attL6の構造を持つpREDベクターとattL4-attR5-attR6-attL3の変換用ベクターを交互に用いてGatewayカセットのリサイクルを行うシステムを構築しており、現在までに本システムを利用して5つの発現ユニットを導入した。また、3つの発現ユニットを導入したクローンをタバコ培養細胞BY-2に導入し、発現解析を行い、レポーターが正常に発現していることを明らかにした。

今回は複数遺伝子の構築と植物での発現効率を調べた。プロモーターに35SプロモーターとNOSプロモーターの2種を、レポーターにG3GFP,mRFP,GUS,LUC,XYLの5種類を用いて検討を行った。また本システムでは複数遺伝子の安定発現を目指し、各遺伝子ユニットの間にHSPターミネーターやMD8 (matrix attachment region) が組み込まれており、これらおよびプロモーターについて比較検討をおこなったので報告する。

【方法･結果】本システムを利用して3つもしくは4つのレポーター遺伝子を組み込んだ発現クローンを構築し、アグロバクテリウムを介して安定的にタバコ培養細胞BY-2に導入した。得られたクローン導入BY-2において、蛍光タンパク質レポーターの顕鏡解析、GUSとLUCレポーターの定量化を行った。3つの発現ユニットを導入したクローン導入植物において、一つのクローン導入BY-2につき独立的な18ラインをすべて同条件で観察した。その結果、どの条件でもすべてのレポーターの発現が観察された。定量解析より、NOSプロモータータイプが35Sプロモータータイプより発現効率が高いという結果が得られた。その一方で、T_{HSP}とMD8における明らかな差異は見られなかった。これらの結果からNOSプロモーターがより適当であると結論付け、NOSプロモータータイプにおいてT_{HSP}とMD8の検討を行うことにした。また、4つの発現ユニットを導入したクローン導入BY-2においても同様に観察を行った。レポーターの強さは3つのものより弱くなったものの、すべてのレポーターにおいて発現が見られた。また、GUSとLUCの定量化を行い、その結果から、GUSにおいては明らかな差異は見られなかったが、LUCにおいてMD8の方が若干ではあったが発現量が多かった。

binary vector, Gateway cloning, matrix attachment region

講演番号：4A31a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ A校舎31会場

タイトル　フェオフィチナーゼ変異イネの老化とトコフェロール含量の解析
Title Analysis of senescence and tocopherol content of pheophytinase mutant rice.

○木村 映一、村田 和優[1]、木村 俊之、仲川 清隆[2]、宮澤 陽夫[2]
（東北農研、[1]富山農総技セ、[2]東北大）
○Eiichi Kimura, Kazumasa Murata[1], Toshiyuki Kimura, Kiyotaka Nakagawa[2], Teruo Miyazawa[2]
(NARCT, [1]Toyama Prefectural Agricultural, Forestry and Fisheries Research Center, [2]Tohoku Univ.)

【目的】老化による植物緑葉組織の黄変や枯死は、フェオフィチンの分解が引き金となっていることが近年明らかになった。それは、フェオフィチンの分解酵素であるフェオフィチナーゼが不活化された場合、葉の老化が野生型に比べて遅れ、緑色維持期間が延長されるというシロイヌナズナを用いた実験によって示された。これらの知見をふまえ、単子葉植物であるイネのフェオフィチナーゼ変異株の解析を行い、葉の老化の野生型等との差異の解析を行った。また、トコフェロールは、クロロフィルやフェオフィチンの分解産物である、フィトールを原料として生合成されることが知られているため、フェオフィチナーゼ変異株のトコフェロール合成量が野生型等と異なるかについても解析を行った。

【方法】ゲノムPCRによりフェオフィチナーゼ遺伝子変異株を選抜し、フェオフィチナーゼ活性を失ったイネの変異株について、ポット栽培を行った。さらにRT-PCRにより、実際にフェオフィチナーゼ遺伝子の発現変異の確認を行った。これらの変異体イネに関して、葉の老化を野生型等と比較すると共に、葉におけるトコフェロール含量の変化を、登熟期から黄熟期にかけてHPLC分析で定量し、野生型等と比較した。

【結果】野生型等と比べた場合の、フェオフィチナーゼ変異イネの葉の緑色維持期間について報告する。また、イネにおいては、葉の老化に伴いトコフェロールの含量が増えることが、これまでの我々の解析から明らかになっている。そのため、トコフェロール含量を葉の老化の指標として利用することで、葉の老化の度合いを解析することが可能である。フェオフィチナーゼ変異イネにおいては、葉でのトコフェロール蓄積時期が野生型等に比べて変化しているかについても、現在解析中のデータを報告する。今後はフェオフィチンが分解された際に生じるトコフェロールの原料であるフィトールの定量解析や、その他のトコフェロール生合成中間体の定量分析も行い、野生型等と比較した場合のフェオフィチナーゼ変異体の代謝産物について解析を行う。

Keyword1 tocopherol, Keyword2 vitamin E, Keyword3 rice

講演番号：4A31a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ A校舎31会場

トマト成熟制御因子RIN標的遺伝子のDNAマイクロアレイを用いた大規模同定

A large-scale identification of target genes of the tomato fruit-ripening regulator RIN by using DNA microarrays

○藤澤 雅樹、嶋 羊子、中野 年継、伊藤 康博（農研機構 食総研）
○Masaki Fujisawa, Yoko Shima, Toshitsugu Nakano, Yasuhiro Ito (Natl. Food Res. Inst., NARO)

【目的】果実の成熟は、複雑な遺伝的メカニズムにより制御されており、その多くが不明である。果実の成熟期に特異的に発現するトマトのMADS-box型転写因子RINは、その変異株の解析等から、成熟制御経路の最上位の因子であると考えられている。我々はこれまでに、RINが成熟における様々な現象（エチレン合成、細胞壁修飾、芳香成分合成、ストレス応答、転写制御）に関わる遺伝子を直接的に転写制御し、成熟をコントロールしていることを明らかにした。本研究では、成熟制御メカニズムの解明に向けて、RINが直接的に転写を制御している標的遺伝子の大規模な同定を、マイクロアレイを用いたRIN結合部位解析および遺伝子発現解析により試みた。
【方法】抗RIN抗体を用いたクロマチン免疫沈降法（ChIP）によるRIN標的遺伝子の同定を、トマト全予測遺伝子（約3万6千個）の5’上流2 kbの領域（プロモーター）に設計したプローブを搭載したカスタムアレイ（Roche NimbleGen）を用いて行った（ChIP-chip）。また、トマト野生株および*rin*変異株の成熟前・成熟期果実における遺伝子発現レベルの解析を、約1万8千個の遺伝子に対応するプローブを含むマイクロアレイ（Agilent）を用いて行った。
【結果】ChIP-chipにより、プロモーター領域にRIN結合部位を含む標的遺伝子を約1千個見出した。一方、遺伝子発現解析により、成熟前に比べ成熟期に発現レベルが2倍を超えて上昇するが、その上昇が*rin*変異株では認められないというRIN依存的な発現上昇を示す遺伝子を約1千個見出した。ChIP-chipおよび発現解析の結果を統合し、発現アレイデータが得られた標的遺伝子の内、成熟時に発現がRIN依存的に上昇している標的遺伝子を120個同定した。この中には*LeACS2*、*LeACS4*、*Cel2*等の既知のRIN標的遺伝子が含まれていたほか、カロテノイドやフラボノイドといった色素合成やクロロフィル分解、糖代謝に関わる遺伝子、NACやbHLH型転写因子等の遺伝子が含まれていた。
【考察】マイクロアレイを用いて得られたRIN結合部位情報および遺伝子発現情報の統合的な解析により、成熟時に「active」なRINの標的遺伝子を多数同定することに成功した。これによりRINが成熟において直接的に制御している現象がさらに明らかとなった。RINが標的とする転写因子には、さらに下位の標的遺伝子があると想定され、その機能を明らかにすることで、成熟制御経路の全容が解明できると期待される。なお、本研究は生研センターイノベーション創出事業の助成を受けたものである。

fruit ripening, MADS-box transcription factor RIN, ChIP-chip

講演番号：4A31a11
講演日時、会場：3月25日11:10～ A校舎31会場

タイトル　イチゴ花托におけるアントシアニン合成関連遺伝子の機能解析

Title　Functional analysis of genes involved in anthocyanin biosynthesis pathway in the strawberry

○宮脇 克行、角村 寧子[1]、浜岡宏和、三戸太郎、大内淑代、野地澄晴（徳島大工・生物工、[1]徳島大栄養・人間）

○Katsuyuki Miyawaki, Yasuko Kadomura[1], Hirokazu Hamaoka, Taro Mito, Hideyo Ohuchi, Sumihare Noji (Tokushimadaikou, [1]Tokushimadaieiyou)

【目的】アントシアニンは高等植物にみられる二次代謝産物であり、その合成には、*chalcone synthase*（*CHS*）や*flavonoid 3'-hydroxylase*（*F3'H*）などの初期合成遺伝子群と、*dihydroflavonol 4-reductase*（DFR）や*anthocyanidin reductase*（ANR）などの後期合成遺伝子群が関与し、光はそれらの遺伝子の発現を制御している。また、イチゴ花托の着色はUVで促進されることは報告されているが、青色光またはそれ以外の光質の役割はまだわかっていない。そこで、光によるイチゴ花托の着色メカニズムを遺伝子レベルで解明することを試みた。

【方法】イチゴ（さちのか）より、青色光受容体（*phot, cry*）、赤色光受容体（*phy*）の全長cDNAをクローニングした。さらに、花托の着色過程における光受容体遺伝子とアントシアニン合成関連遺伝子（*CHS, F3'H, MYB1, MYB10*）の発現レベルを定量的に解析し、RNAi法を用いた遺伝子ノックダウンによる機能解析を行った。また、着色する前の若いステージのイチゴの花托に３種のLED（青、緑、赤）をそれぞれ照射し、波長の違いによる着色促進効果を解析した。

【結果】花托の発生過程において、*F3'H*は前期（G1期）、*CHS*は後期（T-R）にそれぞれ高発現し、光受容体では*phot2*のみ後期、他はすべて前期に高発現していることがわかった。また、*CHS*ノックダウン花托は、その大部分の着色が抑制され、アントシアニン含量もコントロールの約40%まで有意に低下していることがわかったが、*F3'H*ノックダウン花托においてはあまり変化がなかった。さらに、緑または赤色LEDと比較して、青色LEDの照射によりアントシアニン含量が3倍以上増加することがわかった。以上の結果より、イチゴの花托において、光受容体（*phyA, phyB, cry1, cry2, phot1*）と*F3'H*は主に花托発生の前期、*phot2*と*CHS*は主に花托発生の後期のアントシアニン合成において重要な役割を果たしていることが示唆された。

Strawberry fruit, pigmentation, RNAi

講演番号：4A31a12
講演日時、会場：3月25日11:21～ A校舎31会場

チューリップの花弁特異的 *TgMYB1* プロモーター領域の解析

Analysis of tulip petal-specific *TgMYB1* promoter region

○荘司　和明（富山県農総技セ・農研）
○Kazuaki Shoji（Toyama pref. agric. for. and fish. res. ctr.）

【目的】「青いチューリップ」を作出するため、チューリップ（*Tulipa gesneriana*）の花底部で特異的に見られる青色発現の解析と育種への応用を試みている。これまで、花底部の青色発現はデルフィニジン色素・鉄イオン・フラボノールによる超分子複合体形成が主な原因であること（Shoji et al., *Plant Cell Physiol.* 48: 243-251, 2007）。また、この青色発現には液胞型鉄イオントランスポーター遺伝子（*TgVit1*）の花底部特異的な発現と鉄イオン貯蔵タンパク質をコードするフェリチン遺伝子（*TgFER1*）の発現抑制が関与することを明らかにしている（Shoji et al., *Plant Cell Physiol.* 51: 215-224, 2010）。

昨年度の本大会において、*TgVit1* を花弁全体で発現させた「青いチューリップ」を実現するため、花弁特異的に発現している *R2R3-MYB* 遺伝子（*TgMYB1*）をクローン化し、そのプロモーター領域の単離を報告した。今回、*TgMYB1* プロモーター領域において花弁特異的に遺伝子発現を誘導するシスエレメントの解析を行ったので報告する。

【方法】GFPマーカー遺伝子を持ち、約1.2 kbpの*TgMYB1*プロモーター領域と*TgVit1*を繋いだ遺伝子導入用ベクターをパーティクルガン法で‘紫水晶’花弁の紫色細胞に遺伝子導入すると、形質転換細胞は青色に変化する。この性質を利用することによりプロモーター活性の有無をリアルタイムで評価できる。そこで、このプロモーター領域を上流側から267, 462, 712, 923, 977, 1010, 1047 bpと順次削り、その時のプロモーター活性の有無を解析した。さらに、プロモーター活性が認められる最小断片内に inverse PCR法で20 bp ずつの部位特異的欠失領域を導入し、更なるシスエレメント配列の絞り込みを行った。

【結果】*TgMYB1* プロモーター領域を上流から 977 bp まで削ってもプロモーター活性は維持され、形質転換細胞は青色に変化することが明らかとなった。しかし、さらに 1013 bp および 1050 bp を削った場合はプロモーター活性が消失し細胞色に変化は認められなかった。プロモーター活性が認められた最小領域は TATA box の上流約 130 bp に相当し、この領域内に花弁特異性を決めるシスエレメントの存在が示唆された。そこで、この 130 bp 内に inverse PCR 法で 20 bp ずつ、合計 6 ヶ所に部位特異的欠失領域を導入しプロモーター活性を解析したところ、2 つの欠失領域がプロモーター活性に関与していることが示唆された。現在、さらに細かく欠失領域を設定しシスエレメント配列の解析を進めている。

tulip, transporter, promoter

講演番号：4A31a13
講演日時、会場：3月25日11:32～ A校舎31会場

液胞型鉄イオントランスポーター遺伝子の導入によるユリ花弁細胞の青色化

Blue color development of lily petal cells by introducing a vacuolar iron transporter gene

○丸山温子、山本将之、山田恭司、中島範行[1]、荘司和明[2]（富山大院・理工、[1]富山県大院・工、[2]富山農総技セ・農研）

○Atsuko Maruyama, Masayuki Yamamoto, Kyoji Yamada, Noriyuki Nakajima[1], Kazuaki Shoji[2] (Univ. of Toyama, [1]Toyama pref. univ., [2]Toyama pref. agric. for. and fish. res. ctr.)

【目的】近年、遺伝子組換えによる花色改変が進められている。ユリ(*Lilium* cv.) は切り花としての需要が高く、花色には赤、黄、橙、白色が存在するが青色は存在していない。荘司らはチューリップの花底部で見られる青色発現が鉄イオンとデルフィニジン色素による錯体形成が主な原因であること（Shoji et al., *Plant Cell Physiol.* 48: 243-251, 2007)。また、その青色発現には液胞型鉄イオントランスポーター遺伝子(*TgVit1*) 等が関与していることを報告している（Shoji et al., *Plant Cell Physiol.* 51: 215-224, 2010)。

今回、「青いユリ」の作出を目指して、赤色系のユリを材料に*TgVit1* を花弁細胞へ導入し、一過的発現による花弁細胞の花色変化を解析した。また、*TgVit1* をユリ花弁で特異的に発現させるため、ユリ花弁で発現している*R2R3-MYB* 転写因子の遺伝子とそのプロモーター領域の単離を試みたので報告する。

【方法】赤色系のユリ８品種、‘マンボ’、‘グランドパラディッソ’、‘スターファイター’、‘ダブルサプライズ’、‘フェルメール’、‘ソルボンヌ’、‘リド’、‘乙女の姿’ を材料に、各品種の開花直後の花弁にパーティクルガン法でGFPマーカー遺伝子をもつ*TgVit1* 発現ベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入後２日または３日後にGFP蛍光を示す形質転換細胞の色の変化を観察した。また、花弁で特異的に発現している*R2R3-MYB*をクローン化するため、RT-PCR法によるcDNAの単離を行った。さらに、その塩基配列情報を基にゲノムDNAを用いてStraight Walk法による遺伝子上流のプロモーター領域の単離を試みた。

【結果】*TgVit1* の導入により形質転換細胞が青色化した品種（‘マンボ’、‘スターファイター’、‘ダブルサプライズ’)、変色しなかった品種（‘ソルボンヌ’、‘リド’、‘乙女の姿’)、褐色化した品種（‘グランドパラディッソ’）または液胞内に不溶性の沈殿が見られた品種（‘フェルメール’）など様々な変化が認められた。また、青色化が見られた‘マンボ’を材料にRT-PCR法により*R2R3-MYB* の単離を行ったところ720 bpのcDNAクローンが得られた。さらに、その配列を基にRight Walk法により約2.8 kbpのプロモーター領域を単離した。このプロモーター領域に*TgVit1* を繋ぎマンボの花弁細胞に遺伝子導入した結果、遺伝子導入細胞は赤色から青色へと変化することから、単離したゲノムDNA領域におけるプロモーター活性が確認された。

以上の結果から、ユリにおいても液胞型鉄イオントランスポーター遺伝子の活用により花弁の青色化が可能であり、*R2R3-MYB* 遺伝子プロモーターの活用により「青いユリ」の作出が期待できると考えられる。

lily, transporter, blue color

講演番号：4A31a14
講演日時、会場：3月25日11:43～ A校舎31会場

カンキツ類果樹の葉と果実の表面構造の解析

Structural analysis of cuticular membrane of *Citrus* leaf and fruit

○井上　剛史、小川　一紀[1]、坂本　正弘、東　順一（京大院農・地域環境、[1]農研機構・果樹研）
○ Tsuyoshi Inoue, Kazunori Ogawa[1], Masahiro Sakamoto, Jun-ichi Azuma (Kyotodai, [1]Noukenkikou)

【目的】

植物の葉や果実の表面は外的環境からの保護層であるクチクラ膜に覆われている。クチクラ膜は、ワックスやクチンと呼ばれる成分から構成され、その組成は種によって異なることが知られている。クチクラ膜の主要構成成分であるクチンは、炭素数16－18からなる高級脂肪酸を含むポリエステルであり、組成によって物性が異なることが知られているが、詳細は未だ明らかにされていない点が多い。著者らはカンキツ果樹に関係するバイオマスの有効利用を進めつつある（Inoue et al. *Food chem.*, 2010, 123(2), 542-547)。今回は温州ミカンの葉及び果実表面のクチクラ層に注目し、その性質について分析した。

【方法】

青島温州ミカンの葉及びその果実から酵素法により表層のクチクラ膜を単離し、その化学的性質を分析した。また、クチクラ膜の非破壊構造分析を固体高分解能CP/MAS・^{13}C-NMR及びFT-IRにより行うとともに、その形態観察を低電圧（LV-）SEMにより行った。更に、クチンモノマー解析は$LiALH_4$分解とGC/MSにより行った。

【結果】

青島温州ミカンの葉の裏表両面及び果実のいずれもから極めて薄い半透明のクチクラ膜を単離することができた。果実クチクラ膜、葉の表面、裏面のクチクラ膜の厚さはそれぞれ8.3, 10.7, 7.7 μmであった。固体高分解能CP/MAS・^{13}C-NMR分析の結果、アルキル鎖に富むことが実証された。また、FT-IR分析の結果、アルキル鎖の他1730 cm^{-1}の吸収が顕著にみられ、ポリエステルとしてクチンの存在が認められた。葉の裏表及び果実のクチクラ膜はいずれも極めてよく似たスペクトルを示した。単離したクチクラ膜のLV-SEMによる観察の結果、葉の裏表及び果実の外側はいずれも滑らかな構造をしているが、内面はいずれも表層細胞の形態が保持されていることが分かった。更に、クチンのモノマー解析を行った結果、いずれのクチクラ膜についてもC-16タイプであり、それはトマト果実のものに近く、カキやリンゴ等の果実由来のクチクラ膜（C16、C18混合タイプ）と異なっていた。これらの化学的性質と力学的性質の関係についても言及する予定である。

Citrus unshiu L., cuticular membrane, cutin

講演番号：4A32a01
講演日時、会場：3月25日09:00～ A校舎32会場

統合失調症患者に見出された一塩基多型(SNP-7)由来のポリシアル酸転移酵素が産生するポリシアル酸構造と神経作用因子との相互作用解析

Impaired function of polysialic acid derived from the ST8SiaII/STX gene with single-nucleotide polymorphisms related with schizophrenia

○羽根 正弥、磯村 遼、北島 健、佐藤 ちひろ（名大・生物機能セ、名大院・生命農学）
○Masaya Hane, Ryo Isomura, Ken Kitajima, Chihiro Sato (BBC; Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】シアル酸 (Sia) がα2,8 結合で縮重合したポリシアル酸構造 (polySia) は、胎児期の脳において神経細胞接着分子 (NCAM) 上に一過的に発現する。また成体脳では、海馬や嗅球などの神経の再構築が行われている部位で確認されている。polySia の生合成には ST8SiaII/STX と ST8SiaIV/PST という 2 つのα2,8-ポリシアル酸転移酵素が関わっており、近年、ポリシアル酸合成酵素の一塩基多型 (SNPs) 解析の結果から、重篤な精神疾患の一つである統合失調症と ST8SiaII/STX の関連が注目されている。本研究では ST8SIaII/STX の SNP-7 に注目し、その酵素活性およびその反応産物である polySia-NCAM の構造及び機能解析を行うことを目的とした。
【方法】ヒト ST8SIaII/STX の野生型および SNP-7 変異体酵素を調製し、ポリシアル酸合成活性を調べた。酵素活性は CMP-[^{14}C]Neu5Ac と NCAM-Fc を基質として測定し、生成物はポリシアル酸特異的抗体を用いたウエスタンブロット法や DMB 標識 HPLC 法などを用いて詳細に解析した。
【結果】ST8SiaII/STX 変異体の酵素活性は野生型よりも著しく低下していることが示された。また、産物の polySia-NCAM 上の polySia 構造の質と量が変異体由来のものでは著しく損なわれていること、神経作用因子との相互作用も低下していることが明らかになった。

polysialic acid, polysialyltransferase, schizophrenia

講演番号：4A32a02
講演日時、会場：3月25日09:11～ A校舎32会場

ブタ精子におけるマイクロドメイン局在性糖タンパク質WGA-gpの生理機能

Biological function of a glycoprotein localized in the pig sperm microdomain, WGA-gp

○金澤　尊[1,2,3]、Estelle Garenaux[2]、Waraporn Kasekarn[2]、堀　和紀[1]、安江　博[4]、佐藤　ちひろ[1,2]、北島　健[1,2,3]（[1]名大院・生命農学、[2]名大・生物機能セ、[3]名大・GCOE、[4]農業生物資源研・家畜ゲノム）

○Takeru Kanazawa[1,2,3], Estelle Garenaux[2], Waraporn Kasekarn[2], Kazuki Hori[1], Hiroshi Yasue[4], Chihiro Sato[1,2], Ken Kitajima[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [2]BBC, Nagoya Univ., [3]GCOE, Nagoya Univ., [4]NIAS)

【目的】我々は世界に先駆けてウニの精子からマイクロドメインを単離して、その受精における重要性を証明した [1]。その過程で、マイクロドメインに存在し、特異な糖鎖構造を有する高度に糖鎖修飾された糖タンパク質flagellasialinを発見し[2]、その糖鎖部分が精子細胞内のカルシウムイオン濃度を調節することによって運動性に関与することを明らかにした[3,4]。flagellasialinのようにその糖鎖によって受精現象を制御する精子マイクロドメイン局在分子の有無を他の生物種において調べるため、ブタ精子を用いて探索した。その結果、WGAエピトープをもち、糖鎖に富む糖タンパク質を見出し、WGA-gpと命名した。今回はWGA-gpの精子における生理機能について明らかになったことを報告する。

【方法・結果】ブタ精子ライセートを陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、WGA-gpを単離・精製した。この分子に対するモノクローナル抗体を作成し、生殖組織及び細胞表面における局在を調べた。その結果、WGA-gpは精巣上体尾部において検出されること、また、受精能獲得過程において精子細胞表面上での分布が変化することが明らかになった。さらにスクロース密度勾配遠心法によりマイクロドメインを単離し、そこにWGA-gpを見出した。このことから、WGA-gpは精巣上体尾部で生合成、分泌された後、精子に取り込まれてマイクロドメインに局在化することがわかった。次に、ウニ精子flagellasialinは精子細胞内のカルシウムイオン調節に関与するため、WGA-gpにもカルシウム調節能があるかどうかを調べた。ブタ精子にWGA-gp抗体を添加したところ、受精能獲得の前後にかかわらず、細胞内カルシウムイオン濃度が激しく変化することが見出された。細胞内カルシウムイオン濃度は精子の運動性や受精能獲得など様々な現象に関与することが知られている。したがって、WGA-gpは精子の細胞内カルシウム調節機構に関与し、それを通じて精子の運動性などを調節することが示唆される。

【参考文献】

[1] Ohta et al. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **258**, 616–623
[2] Miyata et al. (2004) *Glycobiology*, **14**, 827-840
[3] Miyata et al (2006) *Glycobiology*, **16**, 1229-1241
[4] Kambara et al. (2011) *Cell Struct. Funct.*, **36**, 69-82

Sperm microdomain, Ca^{2+} oscillation, Capacitation

講演番号：4A32a03
講演日時、会場：3月25日09:22～ A校舎32会場

担子菌 *Flammulina velutipes* 由来エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ FV 遺伝子の酵母での発現と X 線結晶構造解析

Expression of the gene encoding endo-β-*N*-acetylglucosaminidase FV from basidiomycete in yeast and X-ray crystallography

○浜口　祐、海住宜広、篠原かな子、宮原郁子、田中里佳、Kuakarn Kursong[1]、Jarnee Kaurpiboon[2]、Tipaporn Limpaseni[1]、Piamsook Pongsawasdi[1]、伊藤和央（阪市大院・理、[1]チュラロンコン大・理、[2]タマサート大・医）

○ Tasuku Hamaguchi, Takahiro Kaizumi, Kanako Shinohara, Ikuko Miyahara, Rika Tanaka, Kuakarn Kursong[1], Jarnee Kaurpiboon[2], Tipaporn Limpaseni[1], Piamsook Pongsawasdi[1], Kazuo Ito（Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ., [1]Fac. of Sci. Chulalongkorn Univ., [2]Med. Sch. of Thamasart Univ.）

【目的】担子菌は広くエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼを発現している。本研究では、*F. velutipes* の産生する酵素（エンド FV）の遺伝子の酵母での発現系を構築し、精製した組換えエンド FV (r エンド FV)の酵素化学的性質を調べるとともに、その X 線結晶構造解析を行った。
【方法】発現系は pPICZαベクターおよび *Pichia pastoris* X-33 を用いて構築した。発現酵素の精製は、各種カラムクロマトグラフィーによって行った。r エンド FV の特異性は、各種蛍光標識糖アスパラギンおよび各種糖タンパク質を基質として用いて検討した。r エンド FV の結晶化は様々な条件下で行い、得られた結晶の X 線回折測定を行い、SAD 法によって位相を決定した。
【結果】メタノール誘導により、rエンドFV活性は*P. pastoris*培養液中に分泌された。また、精製したrエンドFVはSDS-PAGEにて単一であった。その分子量は34Kで、*F. velutipes*から精製したものと同様であった。さらに、各種蛍光標識糖アスパラギンに対して、ハイマンノース型＞ハイブリッド型の順に作用したが、コンプレックス型糖鎖には作用しなかった。また、蛍光標識糖アスパラギンに対する反応動力学的パラメーターは、*F. velutipes*から精製したものとほぼ同程度の値であった。さらに、RNaseBからも同程度の速度で糖鎖を遊離した。このとき、変性RNaseBに対する作用は未変性のものに比べ低下した。そして、他の糖タンパク質からもハイマンノース型糖鎖を遊離したが、その速度はRNaseBの場合よりも遅かった。また、コンプレックス型糖鎖を持つ糖タンパク質への作用は認められなかった。これらの結果から、*P. pastoris*で発現したrエンドFVの特異性は*F. velutipes*で発現しているものと同様と考えられた。そして、アグリコン部分の構造が小さいものに作用しやすいと考えられた。一方、rエンドFVの単結晶が得られた。X線結晶構造解析によって、分解能1.8Åの回折強度データが得られた。これをもとにモデルを構築したところ、rエンドFVの立体構造は対称性の高いTIM$(\beta/\alpha)_8$バレル構造をとることが明らかとなった。また、触媒中心のGluはループ構造中に位置していた。さらに一次構造上は相同性がほとんどないエンドHやエンドF_1と触媒中心近傍のアミノ酸側鎖の配向が同じであった。

Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase, *Flammulina velutipes,* three dimensional structure

講演番号：4A32a04
講演日時、会場：3月25日09:33～ A校舎32会場

担子菌*Flammulina velutipes*由来エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼFVのプロセシング酵素の精製とその同定

Purification and identification of an enzyme involved in the processing of endo-β-*N*-acetylglucosaminidase FV from basidiomycete *Flammulina velutipes*

○海住 宜広、浜口 祐、後藤 眞璃子、Kuakarun Krusong[1]、Jarunee Kaulpiboon[2]、Tipaporn Limpaseni[1]、Piamsook Pongsawasdi[1]、伊藤 和央（阪市大院・理、[1]チュラロンコン大･理、[2]タマサート大･医）

○Takahiro Kaizumi, Tasuku Hamaguchi, Mariko Goto, Kuakarun Krusong[1], Jarunee Kaulpiboon[2], Tipaporn Limpaseni[1], Piamsook Pongsawasdi[1], Kazuo Ito (Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ., [1]Fac. of Sci. Chulalongkorn Univ., [2]Med. Sch. of Thamasat Univ.)

【目的】我々は、エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼが多の担子菌に発現していることを見出し、*Flammulina velutipes*の産生する酵素(エンドFV)の遺伝子をクローニングし、*Aspergillus oryzae*での発現系を構築した。*A. oryzae*で発現したエンドFV(rエンドFV)の分子量は、ORFから予想されるものと同じ37,000であった。一方、*F. velutipes*子実体から得られたエンドFVの分子量は34,000であった。そして、rエンドFVは*F. velutipes*抽出液中において分子量34,000にプロセシングされることを発見した。本研究では、*F. velutipes*におけるエンドFVのプロセシングに関与する酵素(EPE)を精製するとともに、その性質を調べた。

【方法】EPEの活性測定は、精製したrエンドFVを基質とし、SDS-PAGEによって反応生成物を分離・定量して行った。そして、37℃において1分間に1 μmoleのrエンドFVをプロセシングする酵素量を1 単位とした。

【結果】EPEは、エンドFVと同様に*F. velutipes*子実体の菌糸部分に局在していた。また、*F. velutipes*の子実体形成前後を通じて、菌床部分に高発現し、子実体形成にともなって増加した。本酵素は、*F. velutipes*子実体から各種クロマトグラフィーによって精製した。精製酵素標品はSDS-PAGEおよびNative-PAGEにおいて単一であった。EPEの至適pHは8付近で、60℃付近で最大活性を示し、分子量はSDS-PAGEで約32,000であった。EPEは、各種プロテアーゼ阻害剤のうちEDTAや*O*-フェナントロリンで阻害され、Zn^{2+}の添加で活性が回復した。また、EPEの活性発現や安定性にCa^{2+}の共存が必要であった。さらに、アンチパインでも阻害された。EPEによってrエンドFVは、分子量36,000の中間体を経て分子量34,000となった。この過程で、rエンドFVのN末端領域は変化せず、C末端側がプロセシングされていると考えられた。また、このプロセシングによってrエンドFVの活性は、2～8倍上昇した。決定したEPEの部分アミノ酸配列の相同性検索から、EPEはZn^{2+}結合サイトモチーフをもつペプチダーゼファミリー M43Bに分類されるメタロプロテアーゼと考えられた。

endo-ß-*N*-acetylgulcosaminidase FV, *Flammurina velutipes*, processing enzyme

講演番号：4A32a05
講演日時、会場：3月25日09:44～ A校舎32会場

担子菌*Agaricus bisporus* 由来エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼABの遺伝子クローニングに関する研究

Cloning of the gene encoding endo-β-*N*-acetylglucosaminidase AB from basidiomycete *Agaricus bisporus*

○ 高橋　剛生、谷脇　聡、浜口　祐、岡　夕貴、Kuakarun Krusong[1], Jarunee Kaulpiboon[2], TipapornLimpaseni[1], Piamsook Pongsawasdi[1], 伊藤　和央（阪市大院・理、[1]チュラロンコン大・理、[2]タマサート大・医）

○ Go Takahashi, Satoshi Taniwaki, Tasuku Hamaguchi, Yuki Oka, Kuakarun Krusong[1], Jarunee Kaulpiboon[2], Tipaporn Limpaseni[1], Piamsook pongsawasdi[1], Kazuo Ito(Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ.,[1]Fac. of Sci. Chulalongkorn Univ., [2]Med. Sch. of Thamasat Univ.)

【目的】エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼは多くの担子菌に発現している。そのうち担子菌*Agaricus bisporus*の産生するエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ(エンドAB)の精製を行い、その性質を明らかにしてきた。本酵素は、担子菌*Flamulina velutipes*由来のエンドFVとはアスパラギン結合型糖鎖構造に対する特異性において異なっていた。本研究では、エンドABをコードする遺伝子のクローニングを行い、その塩基配列を明らかにするとともに本酵素の一次構造上の特徴を調べた。

【方法】エンドABの活性測定は、蛍光標識糖アスパラギンを基質とし、反応生成物をTLCによって分離し、蛍光デンシトメトリーによって定量した。精製したエンドABの部分アミノ酸配列を決定し、これをもとにプライマーを設計した。そして、*A. bisporus*のRNA画分からRT-PCRによってcDNAをクローニングした。

【結果】クローニングしたエンドABをコードするcDNAは、400以上の塩基から成る5'-UTRと2370塩基から成るORFおよび131塩基から成る3'-UTRから構成されていた。一方、エンドABのゲノムDNAには5ヶ所のイントロンが存在した。このORFは789アミノ酸から成るエンドABをコードしていた。精製酵素を用いて決定した部分アミノ酸配列はすべてこのORFがコードする一次構造中に存在した。精製したエンドABのSDS-PAGEでの分子量は約44,000であった。一方、ORFから推定されるエンドABの分子量は約87,000であった。このため、エンドABは翻訳後、プロセシングを受けている可能性が示唆された。また、エンドABの推定一次構造中には2ヶ所のアスパラギン結合型糖鎖付加部位が存在した。一方、GHファミリー18酵素に特徴的なキチナーゼ活性中心モチーフは存在しなかったが、GHファミリー85酵素に共通して見出されるアミノ酸配列領域が存在した。このため、*F. velutipes*の産生するエンドFVとは異なり、エンドABはGHファミリー85に属する酵素であることが明らかとなった。また、エンドABの推定一次構造は、担子菌*Postia placenta*の機能未知タンパク質や担子菌*Serpula lacrymans*のタンパク質と高い相同性があることが見出された。

endo-β-*N*-acetylglucosaminidase AB,*Agaricus bisporus*,GH family 85

講演番号：4A32a06
講演日時、会場：3月25日10:05～ A校舎32会場

糖タンパク質*N*-結合型糖鎖の付加状況の改善

Improvement of *N*-glycosylation state of glycoproteins

○高島　晶、天野純子（野口研・糖鎖生物）
○Shou Takashima, Junko Amano (The Noguchi Inst.)

【目的】糖タンパク質製剤などの生産においては、活性発現や安定化にかかわる機能性糖鎖をいかに効率よく付加させるかが重要な問題になる。しかし、各糖鎖付加部位の糖鎖付加効率は必ずしも 100%ではないため、糖鎖の付加状況が異なるタンパク質が混在すると、比活性や品質の低下をまねく恐れがある。本研究では、*N*-結合型糖鎖付加部位の周辺配列を改変した場合や、*N*-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列(NXS/T)を糖タンパク質に追加した場合に糖タンパク質の糖鎖付加状況がどのように変化するのかを検討してみた。

【方法】 *N*-結合型糖鎖付加部位の周辺配列を部位特異的変異導入法により改変した各変異体糖タンパク質や、*N*-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列を C 末端に追加連結した糖タンパク質を HEK293 細胞に生産させて、その糖鎖付加状況を解析した。なお糖タンパク質としてはヒト由来のリボヌクレアーゼ 1 (RNase 1)、アミラーゼ、インターロイキン-6 などを用いた。

【結果】糖タンパク質中に存在する各コンセンサス配列の X アミノ酸を他のアミノ酸に変えた場合、側鎖の小さいアミノ酸で糖鎖付加効率が向上する傾向があったが、その効果はアミノ酸の種類やコンセンサス配列の位置の違いによって異なっていた。NXS/T 配列で S/T を交換した場合、T から S への置換で糖鎖付加効率が減少し、S から T への置換で糖鎖付加効率が向上する傾向が認められたが、この場合も糖鎖付加部位ごとにその効果は異なっていた。またコンセンサス配列前後のアミノ酸を置換した場合でも糖鎖付加効率が大きく変動する場合や、あるコンセンサス配列への変異導入が別の糖鎖付加部位の糖鎖付加状況に影響を及ぼす場合も観察された。変異導入の効果は部位ごとに異なっていたため、糖鎖付加状況を改善するための一般則は見出せなかったが、糖鎖付加部位ごとに適当なアミノ酸置換を行えば、有用糖タンパク質の糖鎖付加状況を大きく改善することは可能になると考えられた。しかし、変異導入が糖タンパク質の機能喪失をまねく恐れもある。そこで *N*-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列を糖タンパク質の C 末端に追加連結してみたところ、この方法でも糖鎖付加状況が改善されるとともに、糖タンパク質によっては分泌促進効果が認められる場合もあった。両方法を併用すれば、糖タンパク質の機能を保持したまま、効率よく機能性糖鎖を付加できる可能性が考えられた。

N-glycosylation, glycosylation efficiency, consensus sequon

講演番号：4A32a07
講演日時、会場：3月25日10:16～ A校舎32会場

アドレナリンに誘導される細胞表面ヘパラン硫酸糖鎖構造の変化

Structural alterations of heparan sulfate on cell surface induced by adrenaline

○西田 光貴，永見 圭太郎[1]，金丸　義敬[2]，矢部　富雄[2]（岐阜大院・連農・生物資源，[1]岐阜大院・応生科・資源生命，[2]岐阜大・応生科・応用生命）

○Mitsutaka Nishida, Keitaro Nagami[1], Yoshihiro Kanamaru[2], Tomio Yabe[2] (Unit. Grad. Sch. of Agric. Sci., [1]Grad. Sch. of Appl. Biol. Sci., [2]Fact. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

【目的】ヘパラン硫酸（HS）糖鎖は，プロテオグリカンの糖鎖部分であるグリコサミノグリカンの一種として，細胞表面や細胞外マトリクスに普遍的に存在する。HSはその基本骨格が形成された後に，種々の酵素により硫酸基がランダムに付加されるため，多様な構造を形成する。HSはその多様な硫酸基修飾を介してタンパク質と相互作用し，生理機能を調節していることが近年明らかにされたが，細胞外刺激に応答して硫酸化構造が変化する際の分子内メカニズムは未だ解明されていない。当研究室ではこれまでに，生理活性物質や食品成分の刺激を受けて細胞表面HSの糖鎖構造が変化することを報告しており，糖鎖構造と生理機能の相関に注目している。本研究では，アドレナリン投与により神経成長因子の分泌が促進されることが知られるマウス線維芽細胞（L-M細胞）をモデルに用い，アドレナリンを投与した際の細胞表面HSの糖鎖構造変化を明らかにすることを目的とした。

【方法】アドレナリンを添加して24時間培養したL-M細胞から細胞表面HSを回収し，HS分解酵素を用いてHSを構成する二糖単位に分解することで，HPLCにより硫酸化構造の変化を解析した。またアドレナリン添加24時間後のL-M細胞からRNAを精製して，硫酸化構造の変化を引き起こす酵素群の発現をRT-PCRにより比較した。その上で最も多く発現する硫酸基転移酵素に注目し，アドレナリン添加の1.5時間，3時間，6時間後の発現量をReal Time RT-PCRにより解析し，アドレナリン添加後の発現量の変化を調査した。

【結果】アドレナリンをL-M細胞に添加すると，非硫酸化二糖の割合が減少し，6位硫酸化二糖の割合が有意に増加した。6位硫酸化二糖の変化を引き起こす3種類の硫酸基転移酵素の発現を比較すると，6-OST-1が最も多く発現していた。6-OST-1の発現量は，アドレナリン添加1.5時間後に有意に上昇し、その後減少してコントロールレベルに収束することが明らかとなった。アドレナリン添加に伴う6-OST-1の発現量は，投与するアドレナリン濃度に応じて有意に変化した。以上より，アドレナリンをL-M細胞に投与すると，投与1.5時間後に6-OST-1の発現量が有意に増加した結果，細胞表面HSの6位硫酸化が促進されることが明らかとなった。

heparan sulfate, adrenaline, L-M cell

講演番号：4A32a08
講演日時、会場：3月25日10:27～ A校舎32会場

糖基質との相互作用に伴う“フォールディングセンサー” UDP-Glc:Glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT) の構造変化に関する検討

Conformational Change of Folding Sensor Enzyme UDP-Glc:Glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT) by Interaction with Carbohydrate Substrates

○迫野昌文[1]、武田陽一[1]、八須匡和[1]、瀬古玲[1]、伊藤幸成[1,2] ([1] ERATO JST, [2]理研 基幹研)

○Masafumi Sakono, Yoichi Takeda, Masakazu Hachisu, Akira Seko and Yukishige Ito ([1] ERATO JST, [2]RIKEN, ASI)

【目的】小胞体における糖タンパク質の品質管理は、細胞の生命維持に極めて重要である。フォールディングセンサーとして知られるUGGTは、N結合型糖タンパク質の構造が天然状態にあるか変性しているかを区別する役割を果たしている。そして、結合した変性状態にある糖タンパク質の糖鎖にグルコースを転移し、レクチン様シャペロンとの複合化を促進することで変性タンパク質のリフォールディングを促すと考えられている。しかし、UGGTによる変性糖タンパク質の認識と相互作用の機構は十分に明らかにされていない。そこで、本研究では、UGGTの基質としてハイマンノースをコンジュゲートした蛍光化合物を用いて、UGGTの構造変化に関する検討を行った。

【方法】蛍光性化合物をコンジュゲートしたハイマンノースを作製し、UGGTの基質として用いた。Drosophila由来UGGTは、大腸菌を用いた大量発現により取得した。CDスペクトル測定は、日本分光製J-820により、0.1cmセルを用いて測定を行った。

【結果】UGGTの構造変化を、CDスペクトルを用いて測定した。基質のないUGGTは、αヘリックス性に富んだ構造を取ることが分かった。基質が存在すると、UGGTの二次構造は基質濃度に依存してベータシート型へと変化していくことが分かった。しかし、糖鎖が結合していない蛍光化合物ではこのような変化は示されなかった。また、糖鎖だけでも構造変化は観察されなかった。したがって、UGGTは糖鎖とアグリコンの両方を認識することで基質と相互作用し、二次構造を変化させることが明らかになった。このUGGTの二次構造の変化が、グルコース転移反応に重要な役割を果たしていると推察される。

CD spectrum, Glucosyltransferase, Protein quality control

講演番号：4A32a09
講演日時、会場：3月25日10:38～ A校舎32会場

*Aspergillus fumigatus*におけるlectinの認識糖鎖の特異性解析

Analysis of glycan binding specificity of lectins from *Aspergillus fumigatus*

○三浦あゆみ、酒井香奈江、五ノ井透（千葉大学真菌医学研究センター）
○Ayumi Miura, Kanae Sakai, Toru Gonoi (Medical Mycology Research Center, Chiba University)

【目的】

Aspergillus 属菌はヒトにとって身近な糸状菌である。環境中にも普遍的に存在しており、ヒトはその分生子を絶えず吸入している。*Aspergillus* 属菌の一部は病原性を持ち、免疫機能の低下したヒトにおけるアスペルギルス症の原因菌となっている。最新の我が国の病理剖検例における解析からアスペルギルス症が内蔵真菌症の中で最も発生頻度が高い死亡原因であることが明らかとなってきた。特に *A.fumigatus* はアスペルギルス症原因菌の大半を占めている。しかしながら、既存の抗真菌薬のみでは万全な治療ができず、より安全で強力な新規治療薬の開発が望まれている。

糖鎖は細胞と細胞がコミュニケーションをとる場で重要な役割を果たす。糖鎖には多くの情報が内在しており、からだの維持に必要なだけでなく、癌の転移やウイルス侵入など多くの病気にも関わっている。糖鎖を理解することで生命現象を明らかにしたり、新しい治療薬を作ろうという研究が、今まさに注目されている。Lectin は、多様な糖鎖の配列を認識する動物、植物、カビなどが産生するタンパクであり、自然免疫などにおいて重要な働きを示すことが明らかとなってきている。我々は、機能や性質が解明されていない *A. fumigatus* の lectin 様タンパクが感染においてどの様な役割を果すのかを解明する目的で、*A. fumigatus* の lectin 様タンパクを発現させ、糖鎖認識の特異性を解明することを目的として実験を行った。

【方法】

まずBROAD instituteの*A. fumigatus*ゲノム・データーベースを用いた検索から、9つのlectinと推定される遺伝子部分の配列情報を得た。これら９つの遺伝子産物のORFと予測される部分をプラスミド・ベクターのマルチプルクローニング・サイトに組み込み、大腸菌に発現させて、タンパクC端にGST-tagを持つ*A. fumigates*由来タンパクを発現させた。グルタチオン・カラムを用いて発現タンパクを精製し、GST-tagを切り離してその後の解析に用いた。

【結果】

遺伝子組換えにより、GST-tagが修飾された9種のタンパク質を作製することができた。この組換えタンパク質はDNAシーケンスにより*A.fumigatus* lectinの糖鎖を結合部位を構成するタンパクであることが同定された。高純度に精製され、GST-tagが除去された組換えタンパクは、糖鎖アレイで測定をするのに十分な量が得られた。糖鎖アレイの結果、調べたタンパクのうちの1つが、Fucose-specificなlectinであることが分かった。今後、このタンパクについてフロンタルアフィニティークロマトグラフィーにより結合の特異性等について更に詳しく解析を進めていく予定である。

Aspergillus fumigatus, Lectin, Glycan

講演番号：4A32a10
講演日時、会場：3月25日10:49～ A校舎32会場

レクチンプロファイリングによるブドウ球菌属表面糖鎖の識別と食品衛生試験への応用

Differentiation of the Staphylococcal Surface Polysaccharides by a lectin-profiling assay and Application for Food Hygiene Test.

○今村 幸治[1,3]、竹内 英明[1]、平山 真[2]、堀 貫治[2]（[1]株式会社グライエンス，[2]広島大・生物圏科学,[3]株式会社医学生物学研究所）

○Koji Imamura[1], Hideaki Takeuchi[1], Makoto Hirayama[2], Kanji Hori[2]（[1]Glyence Co., Ltd., [2]Hiroshima Univ., [3]MBL Co., Ltd.）

【目的】ブドウ球菌属に属する細菌はヒト等の皮膚や消化管に常在する菌で、その大部分は非病原性であり、皮膚等において常在細菌叢を形成して外部からの病原体の侵入を防ぐバリアの一端を担っている。一方、黄色ブドウ球菌はブドウ球菌の一種であるものの、食中毒や表皮感染症、敗血症等の致死的となるような感染症の原因菌であり、化膿した傷口のほか、健康な人の皮膚や鼻孔等環境に広く分布していて、食品への汚染の機会は極めて多い。食中毒等の原因菌である黄色ブドウ球菌と、病原体の侵入を防ぐバリアを形成するその他のブドウ球菌とを識別することは、食品衛生上及び医学上極めて重要であるため、簡便かつ迅速に判別する方法の確立が求められている。

ところで、細菌の表面は糖鎖で覆われており、宿主と細菌の相互作用や病原性、細胞間の相互作用、免疫に関わる重要な因子として機能している。また、細菌の表面糖鎖は菌によって異なることが知られている。従って、細菌の表面糖鎖を迅速に分析する事が出来れば、従来の選択分離培地を用いる培養法や増菌培養・分離培養を必要とする検査手法と比べてより簡便に細菌を検出、同定する事が可能であると考えられる。

【方法】本研究で新たに見出した海藻レクチンのほか、新規作製組換えレクチンを含む計139種類のレクチンをマイクロプレート上に固相し、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌等ブドウ球菌属の細菌やブドウ球菌属外の細菌との結合性を調べた。

レクチンと結合した菌は固定後、クリスタルバイオレットで染色し、溶出させた色素の吸光度を基に各菌のレクチンによる表面糖鎖プロファイルを作成した。

【結果】139種類のレクチンを用いた細菌の表面糖鎖プロファイルの結果、ブドウ球菌属内の菌種間において異なる結合性を示すレクチンが認められた。これらのレクチンを用いることで黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌等他のブドウ球菌属の細菌をレクチン単独で識別できることを見出した。また、ブドウ球菌属の細菌と属外の細菌もレクチンにより識別が可能であった。

また、食品汚染の一例として牛乳中の黄色ブドウ球菌の識別が可能か調べたところ、牛乳中の黄色ブドウ球菌と他のブドウ球菌の識別がレクチンにより可能である事が示された。

lectin, Staphylococcus, food-poisoning

シンポジウムプログラム

3 月 25 日（日）13 : 30〜16 : 30

4SY01　セルロソームとセルラーゼの新たな展開：“シュガー・プラットフォーム”の構築に向けたクロストリジウム

共　催　一般財団法人バイオインダストリー協会　新資源変換研究会
3 月 25 日（日）13 : 30〜16 : 30　A30 会場（A 校舎　4 階　401）
世話人：田丸　浩（三重大院・生資），植田充美（京大院農），鮫島正浩（東大院農）
座　長：田丸　浩（三重大院・生資），植田充美（京大院農），鮫島正浩（東大院農）

13 : 30　はじめに ……田丸　浩[1,2,3]（[1]三重大院・生資，[2]三重大・生命支セ，[3]三重大・新産業創成）
13 : 35　4SY01–1　セルロース系バイオマスの酵素糖化をどのようして効率化するか……°鮫島正浩（東大農）
14 : 10　4SY01–2　セルロソーム研究の基礎から応用：***Clostridium thermocellum***
……°小杉昭彦，森　　隆，PRAWITWONG Panida，DENG Lan（国際農研センター）
14 : 45　4SY01–3　**The cellulosomes of *Clostridium cellulolyticum*: from basics to applications**
……°Fierobe Henri-Pierre（CNRS, Marseille, France）
15 : 20　4SY01–4　セルロソーム研究の基礎と応用：***Clostridium cellulovorans***
……°田丸　浩[1,2,3]（[1]三重大院・生資，[2]三重大・生命支セ，[3]三重大・新産業創成）
15 : 55　4SY01–5　セルロソーム形成機構解明への新手法の展開……°植田充美[1,2]（[1]京大院農，[2]KISTIC）
16 : 25　おわりに ……植田充美[1,2]（[1]京大院農，[2]KISTIC）

4YS02　多様な生物に見られるユニークな代謝と酵素：機能・進化解析と応用への展望

3 月 25 日（日）13 : 30〜16 : 30　A31 会場（A 校舎　4 階　402）
世話人：小林達彦（筑波大・生命環境），西山　真（東大・生物工学セ）
座　長：小林達彦（筑波大・生命環境），西山　真（東大・生物工学セ），中山　亨（東北大・工）

13 : 30　はじめに …… 小林達彦（筑波大・生命環境）
13 : 35　4SY02–1　**3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸を前駆体とする放線菌二次代謝産物の生合成経路の解明**
……°大西康夫（東大院・農生科・応生工）
13 : 59　4SY02–2　微生物と酵素の潜在機能の開拓：探索と戦略 ……°小林達彦（筑波大・生命環境）
14 : 23　4SY02–3　ダイズのイソフラボングルコシルトランスフェラーゼの触媒機能とタンパク質間相互作用
……°中山　亨（東北大・院・工）
14 : 47　4SY02–4　細菌細胞膜における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能：局在化と膜タンパク質生合成における機能 ……°栗原達夫，川本　純，江崎信芳（京大化研）
15 : 11　4SY02–5　リジン・アルギニン生合成機構と進化の解明に向けて ……°西山　真（東大生物工学セ）
15 : 35　4SY02–6　アーキアの補酵素 A 生合成経路とそれから見えてくる代謝進化……°跡見晴幸，横大路裕介，冨田宏矢，石橋拓也，今中忠行[1]（京大院工，[1]立命館大・生命科学）
15 : 59　4SY02–7　コミュニティとして機能するためのインフラストラクチャー
……°有田正規[1,2]（[1]東大・理，[2]理研 PSC）
16 : 23　おわりに ……西山　真（東大生物工学セ）

4YS03　トランスポーター研究からの微生物物質生産の効率化に向けた新たな挑戦

3 月 25 日（日）13 : 30〜16 : 30　A32 会場（A 校舎　4 階　403）
世話人：阿部敬悦（東北大院・農），米山　裕（東北大院・工），七谷　圭（東北大院・農）
座　長：阿部敬悦（東北大院・農），米山　裕（東北大院・工），七谷　圭（東北大院・農）

13 : 30　4SY03–1　システイン/シスチンのシャトルシステムによる大腸菌の新しい酸化ストレス防御機構
……°大津巌生，高木博史（奈良先端大・バイオ）
14 : 00　4SY03–2　大腸菌の新規 L-アラニン排出輸送体の同定と機能解析 ……°米山　裕，堀　初弘（東北大院・農）
14 : 30　4SY03–3　産業微生物由来アスパラギン酸：アラニン交換輸送体（**AAEx**）ファミリーの構造・機能と産業応用
……°七谷　圭[1]，福井啓太[2]，阿部敬悦[3,4]（[1]東北大院工・バイオ，[2]味の素ライフサイエンス研，[3]東北大院農・生物産業創成，[4]東北大・未来研）
15 : 00　4SY03–4　コリネ型細菌における糖取り込み機構 **PTS** の遺伝子発現制御
……°田中裕也，乾　将行，湯川英明（RITE）
15 : 30　4SY03–5　コリネ型アミノ酸生産菌がもつ潜在的なグルコース輸送バイパス…°池田正人（信州大農・応生科）
16 : 00　4SY03–6　***Corynebacterium glutamicum*** のグルタミン酸排出チャネルの発見とその有用物質生産へのインパクト……°川崎　寿，和地正明[1]（東電大院，[1]東工大院）

4YS04　接合伝達の温故知新：メカニズム・応用への新展開

3 月 25 日（日）13:30〜16:30　A04 会場（A 校舎　4 階　404）
世話人：片岡正和（信州大・工），津田雅孝（東北大院・生命科学）
座　長：片岡正和（信州大・工），津田雅孝（東北大院・生命科学）

はじめに……片岡正和（信州大・工）
13:30　4SY04–1　プラスミド **R64** の接合伝達開始起点における **DNA** 伝達開始・終結機構
……°古屋伸久（首都大・生命）
13:55　4SY04–2　細菌の接合機構による真核生物の形質転換
……°鈴木克周，守口和基，山本真司，清川一矢，田中克幸（広島大院・理）
14:20　4SY04–3　枯草菌の接合伝達プラスミドと接合伝達様式の特異性
……°金子真也，板谷光泰[1]（東工大　生命理工，[1]慶應大　先端生命研）
14:45　4SY04–4　放線菌における接合伝達のしくみと合成生物学への応用可能性……°片岡正和（信州大・工）
15:10　4SY04–5　バクテリア接合伝達のゲノム操作への可能性……°森　浩禎（奈良先端大）
15:35　4SY04–6　プラスミドの接合伝達が宿主細胞機能へ及ぼすインパクト
……°野尻秀昭（東大・生物生産工学研究センター）
16:00　4SY04–7　環境汚染物質分解能を担うプラスミドの水平伝達……°津田雅孝，永田裕二，大坪嘉行（東北大）
おわりに……津田雅孝（東北大院・生命科学）

4YS05　健康と長寿に貢献する酵母研究

3 月 25 日（日）13:30〜16:35　A05 会場（A 校舎　3 階　301）
世話人：川向　誠（島根大・生資），平田　大（広島大院・先端研），饗場浩文（名古屋大・生命農学）
座　長：川向　誠（島根大・生資），平田　大（広島大院・先端研），饗場浩文（名古屋大・生命農学），戒能智宏（島根大・生資）

13:30　はじめに……川向　誠（島根大・生資）
13:35　4SY05–1　不均衡変異導入法を利用した新規生理活性物質探索の試み**-Cyclosporin** 類縁体を例に**-**
……°釘宮理恵，笠原　堅　（(株)ネオ・モルガン研究所）
14:00　4SY05–2　酵母細胞を見て薬剤標的が分かる？……°大矢禎一（東大・新領域）
14:25　4SY05–3　リボソーム **RNA** 遺伝子と細胞老化……°小林武彦[1,2]，坂季美子[1]，ガンレイオーステン[1,3]，井手　聖[1]（[1]国立遺伝研，[2]総研大，[3]マッセイ大）
14:50　4SY05–4　出芽酵母の Ca^{2+} シグナルによる寿命制御……°水沼正樹，椿山諒平，久米一規，宮川都吉，平田　大（広島大院・先端研）
15:15　4SY05–5　分裂酵母を用いた経時寿命延長因子の解析……°饗場浩文（名古屋大・生命農学）
15:40　4SY05–6　分裂酵母のミトコンドリア機能と細胞寿命……°川向　誠（島根大・生資）
16:05　4SY05–7　タンパク質アセチル化による分裂酵母の代謝と寿命制御
……°吉田　稔，前田和宏，松山晃久（理研基幹研）
16:30　おわりに……平田　大（広島大院・先端研）

4SY06　**Non-conventional** 酵母で元気が出る「もの作り」

共　催　新産業酵母研究会
3 月 25 日（日）13:30〜16:50　A06 会場（A 校舎　3 階　302）
世話人：北本宏子（農環研），正木和夫（酒類研）
座　長：北本宏子（農環研），正木和夫（酒類研），廣塚元彦（不二製油）

13:30　4SY06–1　「**Non-conventional yeasts** から次世代微生物産業へ」……°高木正道（新潟薬科大）
13:50　4SY06–2　なぜ新たな酵母 ***Kluyveromyces marxianus*** に魅力を感じるか―***Saccharomyces*** との優劣比較―
……°赤田倫治（山口大・医系）
14:20　4SY06–3　酵母 ***Lipomyces*** による油脂大量生産の可能性
……°長沼孝文，正木和夫[1]，家藤治幸[1]（山梨大・院医工・生命，[1]酒総研）
14:50　4SY06–4　とても多様な日本の酵母……°高島昌子，大熊盛也（理研 BRC-JCM）
15:20　4SY06–5　***Yarrowia lipolytica*** における疎水性化合物代謝とその制御
……°福田良一，太田明徳（東大院農生科・応生工）
15:50　4SY06–6　***Kluyveromyces lactis*** の **β-**ガラクトシダーゼの開発……°塩田一磨（合同酒精　酵医研）
16:20　4SY06–7　植物酵母が生み出す天然系保湿剤の開発とその利用……°北川　優（東洋紡）

4SY07　醸造微生物の生存戦略メカニズム～新しく見えてきたその素顔とは

3 月 25 日（日）13:30～16:30　A08 会場（A 校舎　3 階　303）
世話人：丸山潤一（東大院農生科・応生工），北垣浩志（佐賀大・農）
座　長：丸山潤一（東大院農生科・応生工），北垣浩志（佐賀大・農）

13:30　はじめに……丸山潤一（東大院農生科・応生工）
13:35　4SY07–1　麹菌研究から発見したペルオキシソームの新規機能……°丸山潤一（東大院農生科・応生工）
14:05　4SY07–2　麹菌の菌糸が密集して塊を作るメカニズム～新規の転写因子が制御することを発見
……°金　鋒杰，小山泰二（公益財団法人野田産業科学研究所）
14:35　4SY07–3　『働き者』の清酒酵母―高発酵性原因遺伝子の解析―……°渡辺大輔，下飯　仁（酒類研）
15:05　4SY07–4　醸造関連ストレスによる酵母の翻訳抑制と **mRNP granules** 形成
……°井澤真吾（京都工繊大・工芸科・応生）
15:35　4SY07–5　発酵呼吸転換における酵母ミトコンドリアの新機能……°北垣浩志（佐賀大・農）
16:05　おわりに……北垣浩志（佐賀大・農）

4SY08　特殊環境下における微生物の潜在能力とその応用/**Potential capacity of microorganisms under various environmental conditions**

共　催　（独）農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター
3 月 25 日（日）13:30～16:50　A07 会場（A 校舎　3 階　306）
世話人：高木博文（奈良先端大・バイオ），岩橋　均（岐阜大・応生科）
座　長：高木博文（奈良先端大・バイオ），岩橋　均（岐阜大・応生科）

13:30　**Opening Remarks**……Hiroshi TAKAGI（Nara Institute of Science and Technology）
13:40　4SY08–1　**The Pup-proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis***
……°Kristin BURNS, Heran DARWIN（NYU School of Medicine）
14:10　4SY08–2　**Analysis of radioresistant bacterium and its application**
……°Issay NARUMI（QuBS, JAEA）
14:40　4SY08–3　**The physiological role of nitric oxide found in yeast and its application**
……°Hiroshi TAKAGI, Akira NISHIMURA, Yu SASANO
（Nara Institute of Science and Technology）
15:10　4SY08–4　**Application of yeast environmental stress response to environmental risk assessment**
……°Hitoshi IWAHASHI（Gifu University）
15:40　4SY08–5　**Microbial Plastic Factory: metabolic-enzyme engineering**
……John Masani NDUKO, Ken'ichiro MATSUMOTO, °Seiichi TAGUCHI
（Hokkaido University）
16:10　4SY08–6　**Antibacterial and antivirulence drugs targeting bacterial signal transduction**
……°Ryutaro UTSUMI, Masayuki IGARASHI[1]
（Grad. Sch. Agricul. Kinki UNiv., [1]MCRF）
16:40　**Closing Remarks**……Hitoshi IWAHASHI（Gifu University）

4SY09　天然物ケミカルバイオロジー

3 月 25 日（日）13:30～16:30　B18 会場（B 校舎　5 階　514）
世話人：上田　実（東北大院理），入江一浩（京大院農），西川俊夫（名大院生農）
座　長：平竹　潤（京大化研），浅見忠男（東大院農生科），夏目雅裕（農工大院・農），戸嶋浩明（茨城大農），山下まり（東北大院農），渡邉秀典（東大院農生科）

13:00　はじめに……西川俊夫（名大院生命農学）
13:05　4SY09–1　標的決定による化合物ツールの設計……°上杉志成（京大・iCeMS）
13:45　4SY09–2　がん細胞遊走のケミカルバイオロジー……°井本正哉（慶大・理工）
14:15　4SY09–3　**F**-アクチン-アクチン結合蛋白質間相互作用を阻害する天然化合物……°臼井健郎（筑波大生命環境）
14:45　4SY09–4　天然発がんプロモーターの骨格を利用した新規抗がん剤リードの開発
……°入江一浩，柳田　亮[1]，中川　優[2]（京大院農，[1]香川大農，[2]理研基幹研）
15:15　4SY09–5　イオンチャネル阻害剤の創製を目指した海産天然毒の化学合成……°西川俊夫（名大院生命農学）
15:45　4SY09–6　新規抗がん剤ハラヴェン（エリブリンメシル酸塩）の創製とプロセス開発研究
……°千葉博之，田上克也（エーザイ株式会社 原薬研究部）
16:25　おわりに……入江一浩（京大院農）

4SY10　生合成マシナリーを用いた生物活性天然物の生産

共　催　新学術領域研究「生合成マシナリー：生物活性物質構造多様性創出システムの解明と制御」
3 月 25 日（日）13:30〜16:30　B19 会場（B 校舎　4 階　420）
世話人：及川英秋（北大院・理），池田治生（北里大・生命研），五味勝也（東北大院・農）
座　長：及川英秋（北大院・理），池田治生（北里大・生命研），五味勝也（東北大院・農）

13:30　はじめに …… 及川英秋（北大院・理）

13:35　4SY10–1　**lig4 破壊株 *Chaetomium globosum* による天然物生合成機構の網羅的解析法の構築**
…… ○渡辺賢二（静岡県立大学 薬学部）

14:00　4SY10–2　**糸状菌 *Phomopsis amygdali* が生産するフシコクシン生合成マシナリーの全容解明**
……野池基義，小野裕介，加藤修雄[1]，○大利　徹（北大院・工，[1]阪大産研）

14:25　4SY10–3　**マクロラクタム抗生物質ビセニスタチンの生合成マシナリーの精密解析** ……○江口　正（東工大）

14:50　4SY10–4　**糸状菌を宿主とした効率的な二次代謝化合物生合成遺伝子発現系の開発** ….○五味勝也（東北大院農）

15:15　4SY10–5　**生合成マシナリー構築のための汎用宿主の開発**……小松　護，○池田治生（北里大・生命研）

15:30　4SY10–6　**イソキノリンアルカロイドの微生物発酵生産の可能性**
……○佐藤文彦，南　博道[1]（京大院・生命，[1]石川県立大・生物資源工学研）

15:55　4SY10–7　**メタボロミクスによる植物成分生合成のゲノムマイニング：キノリチジンアルカロイド生合成の初発酵素遺伝子の同定** ……○斉藤和季[1,2]，ブンスパソムヌク[1]，山崎真巳[1,3]
（[1]千葉大・院薬，[2]理研・植物科学研究セ，[3]CREST/JST）

4SY11　マイコトキシンのリスク評価，生産と制御および分析

3 月 25 日（日）13:30〜16:30　C01 会場（C 校舎　5 階　501）
世話人：長田裕之（理研基幹研），木村　真（名大院生農），作田庄平（東大院農生科）
座　長：長田裕之（理研基幹研），木村　真（名大院生農），作田庄平（東大院農生科）

13:30　4SY11–1　**マイトコキシンのリスク評価**……○小西良子，吉成知也（国立衛研）

14:00　4SY11–2　**フモニシンの分析とリスク** ……○久城真代　((独)農研機構）

14:30　4SY11–3　**赤かび病菌のトリコテセン系かび毒の後期生合成機構** ……○前田一行[1,3]，富永直樹[2,3]，兵藤壮一郎[2,3]，大里修一[1]，鎌倉高志[2]，米山勝美[1]，吉田　稔[3]，木村　真[3,4]
（[1]明大・農，[2]東理大・理工，[3]理研・基幹研，[4]名大・生命農）

15:00　4SY11–4　**赤かび病抵抗性植物の作出によるカビ毒低減化の試み** ……○西内　巧（金沢大学際セ）

15:30　4SY11–5　**シクロピアゾン酸生合成機構と麹菌のセーフガード**……○加藤直樹，徳岡昌文[1]，篠原靖智[1]，小山泰二[1]，長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー，[1]野田産研）

16:00　4SY11–6　**アフラトキシン生産阻害物質の作用機構**……○吉成知也，作田庄平[1]，長澤寛道[1]，小西良子（国立衛研，[1]東大院・農生科）

4SY12　環境・ゲノム損傷への対処マシナリーとしてのエピゲノム

3 月 25 日（日）13:30〜16:30　C23 会場（C 校舎　5 階　502）
世話人：加藤茂明（東大・分生研），原田昌彦（東北大院農・応生科）
座　長：加藤茂明（東大・分生研），原田昌彦（東北大院農・応生科）

13:30　4SY12–1　**クロマチン・細胞核の構造とエピゲノム制御：アクチンファミリーからのアプローチ**
…… 尾間由佳子，北村大志，高橋裕一朗，日下部将之，小西辰紀，中山景樹，島田健士[1]，GASSER SUSAN[1]，○原田昌彦
（東北大院農・応生科，[1]Friedrich Miescher Inst.）

14:05　4SY12–2　**放射線誘発核内フォーカス形成のエピゲノム制御**
……○田代　聡，井倉　毅[1]（広大原医研，[1]京大放生研）

14:40　4SY12–3　**DNA メチル化とシロイヌナズナ転移因子の動態**……○角谷徹仁（遺伝研）

15:15　4SY12–4　**出芽酵母の飢餓応答とエピジェネティクス制御**……○湯川格史，今村優子，土屋英子（広島大院先端物質・分子生命）

15:50　4SY12–5　**ゲノム情報発現制御とエピゲノム制御の分子機構** ….○加藤茂明（東京大学・分子細胞生物学研究所）

4SY13　植物を巡る機能性低分子の動態 Transport of functional small molecules in plants

3 月 25 日（日）13:30〜17:00　C09 会場（C 校舎　5 階　503）
世話人：矢崎一史（京大・生存研），士反伸和（神薬大・生薬）
座　長：矢崎一史（京大・生存研），士反伸和（神薬大・生薬）

13:30　4SY13–1　**Raiding the SWEET shop - how pathogens gain access to the plants nutrient resources**
……Li Qing Chen，Xiao Qing Qu，I Lin，Davide Sosso，Frank White[1]，Alexander Jones，Sue Rhee，Maria Sardi，Sam Parsa，Erika Valle，°Wolf B. Frommer（Carnegie Institution，[1]Kansas State University）

14:05　4SY13–2　**Long-distance control of nodulation** ……°Masayoshi Kawaguchi（NIBB）

14:40　4SY13–3　**Plant-specific ALMT transporter family regulates multiple physiological functions**
……°Takayuki Sasaki，Izumi Mori，Takuya Furuichi[1]，Yoshiyuki Murata[2]，Yoko Yamamoto（Ins. Plant Sci. Resources, Okayama Univ.，[1]EcoTopia Science Ins.，Nagoya Univ.，[2]Grad. School Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.）

15:15　4SY13–4　**Molecular diversity of zinc transporters in plants** …… Miki Kawachi，Sayaka Kogawa，Yoichiro Fukao[1]，Ute Kraemer[2]，Natsuki Tanaka，°Masayoshi Maeshima（Nagoya Univ.，[1]NAIST，[2]Ruhr-Univ. Bochum）

15:50　4SY13–5　**Strigolactone function and action**…°Shinjiro Yamaguchi[1,2]（[1]Tohoku Univ.，[2]RIKEN PSC）

16:25　4SY13–6　**Membrane transporters involved in translocation of nicotine in *Nicotiana tabacum***
……Nobukazu Shitan[1,2]，Shota Minami[1]，Masahiko Morita[2]，Shingo Ito[2]，Alain Goossens[3]，Dirk Inzé[3]，°Kazufumi Yazaki[2]（[1]Kobe Pharm. Univ.，[2]RISH, Kyoto Univ.，[3]Ghent Univ.）

4SY14　無細胞タンパク質合成系が可能にする多彩な生命科学研究

3 月 25 日（日）13:30〜16:30　C10 会場（C 校舎　5 階　504）
世話人：内海俊彦（山口大院・医），魚住信之（東北大院・工），戸澤　譲（愛媛大・無細胞セ）
座　長：内海俊彦（山口大院・医），魚住信之（東北大院・工），戸澤　譲（愛媛大・無細胞セ）

13:30　4SY14–1　無細胞タンパク質合成系を用いた脂質修飾タンパク質の網羅的探索法の確立とその応用
……°内海俊彦（山口大院・医）

14:00　4SY14–2　無細胞膜組込み系を用いた Tail-anchor 型膜タンパク質とマルチスパン膜タンパク質の解析
……佐藤陽子，相澤圭師，三島枝里子，江連　徹[1]，安藤英治[1]，阪口雅郎[2]，°魚住信之（東北大・院工，[1](株)島津製作所，[2]兵庫県大・院生命理）

14:30　4SY14–3　**PURE system** でバイオシステムを作る……°上田卓也（東大）

15:00　4SY14–4　無細胞タンパク質合成系を用いたライブラリー構築技術の開発と応用
……°中野秀雄，兒島孝明（名古屋大・生命農）

15:30　4SY14–5　無細胞タンパク質合成系を利用した膜輸送体の機能解析……°戸澤　譲（愛媛大）

16:00　4SY14–6　コムギ無細胞タンパク質合成法の開発とその応用 ……°遠藤弥重太（愛媛大）

4SY15　ケミカルセンシングによる生命恒常性維持のフロンティア―生物種を超えたシグナルの発生から個体間の交信に至る原理―

3 月 25 日（日）13:30〜16:40　C20 会場（C 校舎　5 階　507）
世話人：松田一彦（近畿大院・農・応生科），中村元直（東大院・医・分生）
座　長：松田一彦（近畿大院・農・応生科），中村元直（東大院・医・分生），松井健二（山口大院・医・応生科），山根久和（東大・生物工学セ），高林純示（京大・生態セ），東原和成（東大院・農生科・応生化）

13:30　はじめに ……松田一彦（近畿大院・農・応生化）

13:35　4SY15–1　ピレトリンとボラタイルセンシングによる植物恒常性の維持 ….°松田一彦（近畿大院・農・応生化）

14:05　4SY15–2　揮発性オキシリピンによる植物の生態系での生存戦略 ……°松井健二（山口大院・医・応生科）

14:35　4SY15–3　イネの防御応答におけるジャスモン酸の生理機能
……清水崇史，宮本皓司，岡田憲典，°山根久和（東大・生物工学セ）

15:05　4SY15–4　植物揮発性物質が駆動する生態系生物間相互作用ネットワーク……°高林純示（京大・生態セ）

15:35　4SY15–5　嗅覚受容体のナチュラルリガンドとして包皮腺由来の長鎖不飽和アルコールの同定
……°東原和成（東大院・農生科・応生化）

16:05　4SY15–6　脂質メディエーターとその受容体研究の創薬に向けた新展開
……°中村元直，清水孝雄（東大院・医・分生）

16:35　おわりに …… 中村元直（東大院・医・分生）

4SY16　ミクロからマクロの複合系を鳥瞰する先端技術

共　催　よこはまバイオマス研究会
3 月 25 日（日）13:30〜16:30　C21 会場（C 校舎　4 階　401）
世話人：菊地　淳（理研），石田亘広（豊田中研）
座　長：菊地　淳（理研），石田亘広（豊田中研）

13:30　4SY16–1　単離操作を経ない生体分子群および微生物叢複合系解析がもたらすインパクト
……°菊地　淳[1,2,3,4]（[1]理研 PSC，[2]理研 BMEP，[3]名大院生命農，[4]横市院生命）
13:45　4SY16–2　次世代シーケンサーによる **small RNA** の解析と水圏複合微生物系への展開…°木村浩之（静岡大）
14:10　4SY16–3　海洋の菌様原生生物，ラビリンチュラ類とウイルスのモニタリング技術による新たな水圏生態系の認識……°本多大輔，上田真由美[1]，高尾祥丈[2]，長崎慶三[3]（甲南大・理工，[1]甲南大院・自然科学，[2]福井県大・海洋生物資源，[3]瀬戸内水研）
14:35　4SY16–4　水圏生態系における物質生産様式をプロファイル化する〜特に藻類・プロティスト複合系に着目して〜……°横山亜紀子（筑波大・生命環境）
15:00　4SY16–5　環境メタゲノミクス……°黒川　顕（東工大・生命理工）
15:25　4SY16–6　微生物生態系の成立様式を電子の流れで理解する
……°春田　伸，大滝宏代，諸星　聖，松浦克美（首都大・理）
15:50　4SY16–7　複合微生物叢のデータマイニング技術……°山澤　哲[1,2]，伊達康博[3,2]，菊地　淳[3,2,4,5]（[1]鹿島技研，[2]横市院生命，[3]理研 PSC，[4]理研 BMEP，[5]名大院生命農）
16:15　4SY16–8　環境微生物叢の解析技術進展への期待……°石田亘広，光川典宏（(株)豊田中央研究所）

4SY17　昆虫の生命維持における分子制御機構のゲノムデコード

3 月 25 日（日）13:30〜16:30　C24 会場（C 校舎　4 階　404）
世話人：武山健一（東大・分生研），永田晋治（東大院農生科・応生科）
座　長：武山健一（東大・分生研），永田晋治（東大院農生科・応生科）

13:30　4SY17–1　昆虫の摂食行動を作るペプチドホルモン群による調節機構…°永田晋治（東大院・農生科・応生化）
14:00　4SY17–2　多糸染色体から理解するクロマチン構造調節を介したゲノムデコード　−新規ヒストンシャペロン ***Drosophila*** **DEK** によるエクダイソン受容体転写機構の解明−
……°沢津橋俊，武山健一[1]，加藤茂明[1]（群馬大・生調研，[1]東大・分生研）
14:30　4SY17–3　クロマチン構造調節を担う新規メゾスケール複合体の解析……°藤山沙理，沢津橋俊，伊藤(上田)紗弥，鈴木(松浦)絵里子，木村周平，武山健一，加藤茂明（東大分生研）
15:00　4SY17–4　ミツバチの女王蜂分化誘導因子ロイヤラクチンの発見……°鎌倉昌樹（富山県大工・生物工）
15:30　4SY17–5　昆虫の生命維持機構を利用した新奇害虫防除法の開発
……°新美輝幸，佐藤　豊，吉岡博文，柳沼利信（名大）
16:00　4SY17–6　シロアリの繁殖分化制御機構を探る：女王決定に関わる遺伝的要因とフェロモン
……°松浦健二（岡山大院環境・昆虫生態）

4SY18　革新的技術による膜タンパク質・酵素の構造機能解析/**Innovative methods in the structural and functional analysis of enzymes and membrane transport proteins**

3 月 25 日（日）13:30〜16:50　C26 会場（C 校舎　4 階　412）
世話人：木村泰久（京大院農），保川　清（京大院農）
座　長：木村泰久（京大院農），保川　清（京大院農）

13:30　**Opening Remarks**…… Yasuhisa Kimura, Kiyoshi Yasukawa（Kyoto Univ.）
13:35　4SY18–1　**X-Ray Crystallography of a Multidrug Exporter-type ABC Transporter**
……°Hiroaki Kato[1,2]（[1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ., [2]RIKEN/SPring-8）
14:00　4SY18–2　**Structural analysis and functional implications from projection structures of membrane proteins**……°Kaoru Mitsuoka（AIST）
14:25　4SY18–3　**Mechanism of ABC Transporters in Adaptive Immunity and Virus Escape**
……°Robert Tampé（Univ. Frankfurt）
15:10　4SY18–4　**Structural studies of human G-protein coupled receptors**……°So Iwata（Kyoto Univ.）
15:35　4SY18–5　**Toward understanding a unifying principle of protein folding and aggregation**
……°Yuji Goto（Institute for Protein Research, Osaka University）
16:00　4SY18–6　**Effect of cold-stress inducible chaperonin on specific substrates in hyperthermophile**
……°Shinsuke Fujiwara（Dept.Biosci., Kwansei-Gakuin Univ.）
16:25　4SY18–7　**Unique maturation mechanism of Tk-subtilisin from a hyperthermophilic archaeon**
……°Shigenori Kanaya（Dep. of Mat. and Life Sci., Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ.）

4SY19　ゲノムを知って作る：ゲノムはどこに向かうのか？

3 月 25 日（日）13:30〜16:30　C27 会場（C 校舎　3 階　305）
世話人：板谷光泰（慶應大先端生命研），吉川博文（東京農大応生科・バイオ，東京農大ゲノム解析セ）
座　長：板谷光泰（慶應大先端生命研），吉川博文（東京農大応生科・バイオ，東京農大ゲノム解析セ）

13:30　4SY19–1　**微生物ゲノム塩基組成の深遠さ**……°西田洋巳（東大院農生科）
14:00　4SY19–2　**ゲノム合成のシナリオ**……°板谷光泰（慶應大先端生命研）
14:30　4SY19–3　**合成生物学の申し子「シアノバチルス 1 号」のゲノム機能解析**
……°吉川博文[1,2]，渡辺　智[1]，志波　優[2]，西田洋巳[3]，板谷光泰[4]
（[1]東京農大応生科・バイオ，[2]東京農大ゲノム解析セ，[3]東大院農生科，[4]慶応・先端生命研）
15:00　4SY19–4　**合成ゲノムベクターを用いたマウス遺伝子改変**
…… 岩田哲郎[1]，金子真也[1]，°廣田順二[2,1]（[1]東工大院・生命理工，[2]東工大・バイオセンター）
15:30　4SY19–5　**新しい育種技術「不均衡変異導入法」におけるゲノムワイドな変異スペクトル解析**
……°笠原　堅[1]，志波　優[2]，田中(福島)早苗[1]，堀内貴之[1]，越智幸三[3]，吉川博文[2,4]
（[1](株)ネオ・モルガン研究所，[2]東農大・ゲノム解析セ，
[3]広工大・情報，[4]東農大・応生科 バイオ）
16:00　4SY19–6　**分裂酵母の染色体改変技術を利用した異種タンパク質生産法の開発**……°竹川　薫（九大・院・農）

4SY20　生物資源は誰のもの？〜名古屋議定書からわかること〜

共　催　(一財)バイオインダストリー協会
3 月 25 日（日）13:30〜16:30　C28 会場（C 校舎　3 階　310）
世話人：鶴海泰久（NITE バイオテクノロジーセンター），乙黒美彩（NITE バイオテクノロジーセンター）
座　長：鶴海泰久（NITE バイオテクノロジーセンター），乙黒美彩（NITE バイオテクノロジーセンター），
安藤勝彦（NITE バイオテクノロジーセンター）

13:30　**はじめに**……乙黒美彩（NITE バイオテクノロジーセンター）
13:35　4SY20–1　**名古屋議定書の概略とその影響**……°磯崎博司（上智大院）
14:15　4SY20–2　**二国間協力による海外生物資源へのアクセス**……°鶴海泰久（NITE バイオテクノロジーセンター）
14:45　4SY20–3　**ベトナムにおける発酵食品からの微生物の探索**
……°加戸久生，脇田義久，高橋寿洋，執行達朗（サッポロビール価値創造フロンティア研究所）
15:15　4SY20–4　**醗酵創薬における熱帯微生物の活用について**
……°村松秀行（アステラスリサーチテクノロジー・醗酵）
15:45　**総合討論**……安藤勝彦（NITE バイオテクノロジーセンター）
16:15　**おわりに**……乙黒美彩（NITE バイオテクノロジーセンター）

4SY21　ゲノムスケールの数理モデリングに基づく代謝システムの理解とデザイン

共　催　JST・CREST
3 月 25 日（日）13:30〜16:30　J11 会場（J 校舎　5 階　525）
世話人：平井優美（理研 PSC，JST・CREST），松田史生（神戸大・自然科学）
座　長：平井優美（理研 PSC，JST・CREST），松田史生（神戸大・自然科学），古澤　力（阪大院・情報，理研・生命システム研究セ）

13:30　**はじめに**……平井優美（理研 PSC，JST・CREST）
13:35　4SY21–1　**植物代謝データに基づいたシステムバイオロジー基盤技術の開発：植物代謝大規模シミュレーションに向けて**……°金谷重彦[1,2,3]（[1]NAIST・情報，[2]理研 PSC，[3]CREST）
14:10　4SY21–2　**フラックスバランス解析にもとづく代謝シミュレーション**
……°松田史生，近藤昭彦[1]（神戸大・自然科学，[1]神戸大・工）
14:45　4SY21–3　**同位体標識を用いた代謝フラックス解析とその応用**
……°古澤　力[1,2]（[1]阪大院・情報，[2]理研・生命システム研究センター）
15:20　4SY21–4　**バイオケミカルシステム理論をベースにした代謝反応解析**
……°白石文秀，宇野陽美[1]（九大院農院・生機科，[1]九大院生資環・生機科）
15:55　4SY21–5　**ネットワークから捉える代謝システムの形成と適応**……°竹本和広[1,2]（[1]JST さきがけ，[2]東大院理）

4SY22　食品機能学と薬理学：接点と相違点から学ぶ次のアプローチ

共　催　日本フードファクター学会
3 月 25 日（日）13:30〜17:00　J12 会場（J 校舎　4 階　420）
世話人：村上　明（京大院農・食品生物科），立花宏文（九大院農院・生命機能科）
座　長：村上　明（京大院農・食品生物科），立花宏文（九大院農院・生命機能科），候　徳興（鹿大農・生資科），
　　中山　勉（静県大食品栄養），寺尾純二（徳大院・HBS)

13:30　4SY22–1　“ものとり”・“ものづくり”を基盤としたケミカルバイオロジー研究……°掛谷秀昭（京大・院薬）
14:12　4SY22–2　サリドマイド催奇性の謎を解明……°半田　宏[1,2]（[1]東工大ソリューション研究機構，[2]院生命理工）
14:54　4SY22–3　レドックス修飾タンパク質の構造と機能……°内田浩二（名大院生命農・応用分子生命科
15:36　4SY22–4　フードファクターセンシング：機能性食品因子の生体感知システム……°立花宏文（九大院・農院
16:18　4SY22–5　生体タンパク質との相互作用を介したケミカルトレーニング
……°村上　明，大西康太，大倉伸哉，中畑恵利奈，松本晋也[1]
（京大院大・農・食品生物，[1]京女大・家政・食物栄養）

4SY23　天然変性領域を介した相互作用に基づくタンパク質応用化学の新展開

3 月 25 日（日）13:30〜16:30　J13 会場（J 校舎　3 階　320）
世話人：石野良純（九大院・農），木岡紀幸（京大院・農）
座　長：石野良純（九大院・農），木岡紀幸（京大院・農）

13:30　はじめに……石野良純，木岡紀幸（九大院・農，京大院・農）
13:36　4SY23–1　天然変性タンパク質のゲノム規模解析　—生命情報学からのアプローチ……°福地佐斗志（前工大）
14:04　4SY23–2　天然変性領域を介した蛋白質間相互作用と細胞外環境の感知……°木岡紀幸（京大院・農）
14:32　4SY23–3　植物のストレス適応に関与する天然変性蛋白質……°原　正和（静岡大・農）
15:00　4SY23–4　DNA 複製フォーク進行停止の修復関連タンパク質に存在する天然変性領域について
……°石野良純（九大院・農）
15:28　4SY23–5　相同 DNA 組換反応における天然変性タンパク質の機能　……°柴田武彦[1,2]，新井直人[3]，
草野好司[4]，新宮良宣[1]，香川　亘[5]，胡桃坂仁志[5]，伊藤　隆[6]，美川　務[1]
（[1]理研・基幹研，[2]横浜市立大・生体超分子システム科学，[3]日大・生物資源，
[4]京都工繊大・遺伝資源キュレーター教育研究センター，
[5]早大・理工学術院，[6]首都大・理工）
15:56　4SY23–6　天然変性（ID）領域を介する蛋白間相互作用を標的とする創薬
……°中野洋文[1,2]，小路弘行[2]（[1]北里大・生命研，[2]PRISM BioLab）
16:24　総合討論・まとめ……石野良純，木岡紀幸（九大院・農，京大院・農）

4SY24　ポリアミンが調節する生命現象と健康長寿社会へのポリアミンの応用

3 月 25 日（日）13:30〜16:30　J14 会場（J 校舎　3 階　301）
世話人：鈴木秀之（京工繊大），辨野義己（理研）
座　長：鈴木秀之（京工繊大），辨野義己（理研）

13:30　はじめに……鈴木秀之（京工繊大工科・応生）
13:30　4SY24–1　モデル生物としての大腸菌のポリアミン代謝
……°鈴木秀之[1]，栗原　新[2,3,1]（[1]京工繊大工科・応生，[2]エモリー大・医，[3]学振・海外特研）
13:45　4SY24–2　細菌における細胞外シグナルとしてのポリアミンとそのトランスポーター
……°栗原　新[1,2,3,4]，鈴木秀之[2]，ラザーフィリップエヌ[3]，辨野義己[1]（[1]理研・辨野研，
[2]京都工繊大・工芸，[3]エモリー大・医，[4]日本学術振興会 海外特別研究員）
14:15　4SY24–3　トランスグルタミナーゼが触媒するタンパク質のポリアミン修飾による生理機能の調節
……°人見清隆（名大院生命農学応用分子生命科）
14:45　4SY24–4　ビフィズス菌の共生戦略……°片山高嶺，芦田　久[1]，熊谷英彦，山本憲二
（石川県大・資源研，[1]京大院・生命）
15:15　4SY24–5　腸管内ポリアミン濃度コントロールによる寿命伸長効果……°松本光晴（協同乳業・技術開発）
15:45　4SY24–6　食物中のポリアミンと長寿……°早田邦康（自治医科大学さいたま医療センター）
16:15　まとめ，総合討論……辨野義己（理研）

4SY25　先端食品評価技術：先端オミクス解析と異分野融合による食品の機能性から安全・安心の評価まで

共　催　フードサイエンスフォーラム，日本生物工学会超臨界流体バイオテクノロジー研究部会
3 月 25 日（日）13:30〜17:00　J15 会場（J 校舎　3 階　302）
世話人：榊原陽一（宮崎大農・応生科），馬場健史（阪大院工・生命先端）
座　長：榊原陽一（宮崎大農・応生科），馬場健史（阪大院工・生命先端），福崎英一郎（阪大院工・生命先端），
　　水光正仁（宮崎大農・応生科）

13:30　4SY25–1　超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析の食品総合評価への応用
……°馬場健史（阪大院・工・生命先端）
14:05　4SY25–2　残留農薬検査へのオミクス解析技術の導入……°安藤　孝（宮崎県総合農業試験場）
14:40　4SY25–3　食品の安全性評価用バイオセンシングシステムの開発
……°今石浩正，森垣憲一，後藤達志，森　大気（神戸大学・遺伝子実験セ）
15:15　4SY25–4　感性ナノバイオセンサ……°都甲　潔（九大院・シス情）
15:50　4SY25–5　プロテオーム解析による食品の機能性評価……°榊原陽一（宮崎大農・応生科）
16:25　4SY25–6　食の機能/安全性における酸化ストレス制御機能の重要性
……°加藤陽二，大澤俊彦[1]（兵庫県大，[1]愛知学院大）

4SY26　食品の機能性を時間生物学的視点から考える

共　催　日本フードファクター学会
3 月 25 日（日）13:30〜16:30　J16 会場（J 校舎　2 階　201）
世話人：下位香代子（静岡県大院・生活健康），小堀真珠子（農研機構・食総研）
座　長：下位香代子（静岡県大院・生活健康），小堀真珠子（農研機構・食総研）

13:30　4SY26–1　食品の機能性に時間生物学的視点が必要か？
13:45　4SY26–2　……°下位香代子[1,2]（[1]静岡県大・環境研，[2]静岡県大院・生活健康）
14:20　4SY26–3　マウス体内時計と食・栄養の相互作用……°柴田重信（早稲田大・理工）
14:55　4SY26–4　時間薬理学：薬と食事のタイミング……°大戸茂弘，小柳　悟，松永直哉（九大院・薬・薬剤）
15:30　4SY26–5　食を介した生体リズムの積極的な制御を目指して……°大石勝隆[1,2]
（[1](独)産総研・バイオメディカル・生物時計，[2]東大・新領域・メディカルゲノム）
16:00　4SY26–6　機能性食品成分と生体イベントのクロノコミュニケーション
……°榊原啓之[1,2]，青島良輝[2]，下位香代子[1,2]（[1]静岡県大・環境研，[2]静岡県大院・生活健康）
時計遺伝子を調節する食品因子……°小堀真珠子，大池秀明（食総研）

4SY27　メタボリックシグナルと健康科学

3 月 25 日（日）13:30〜16:30　J35 会場（J 校舎　2 階　224）
世話人：河田照雄（京大院・農），佐藤隆一郎（東大院・農生科），井上善晴（京大院・農）
座　長：河田照雄（京大院・農），佐藤隆一郎（東大院・農生科），井上善晴（京大院・農）

13:30　4SY27–1　解糖系代謝物による **TORC2** 活性化機構〜酵母を用いる糖尿病研究の可能性〜
……野村　亘，°井上善晴（京大院・農・応生科）
14:05　4SY27–2　イソプレノイドによるエネルギー代謝調節機構
……後藤　剛[1,2]，高橋信之[1,2]，°河田照雄[1,2]（[1]京大院・農，[2]京大・生理化学ユニット）
14:40　4SY27–3　胆汁酸代謝調節によるメタボリックシンドロームへのアプローチ
……°渡辺光博（慶應大・医・腎内代）
15:15　4SY27–4　メタボリックシグナルとしてのステロール……°佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）
15:50　4SY27–5　**Biological activities and utilizations of shikonins, red pigments in *Lithospermum erythrorhizon***……°Ma Seung-Jin（Mokpo National Univ）

講演番号：4SY01-1
講演日時、会場：3月25日13:35～ A校舎30会場

セルロース系バイオマスの酵素糖化をどのようして効率化するか

How to improve enzymatic saccharification of cellulosic biomass

○鮫島正浩（東大・農）
○Masahiro Samejima (Todai)

セルロース系バイオマスをバイオエタノール等の有用物質に変換していくためのバイオリファイナリーにおいては、それを構成するセルロースやヘミセルロースなどの多糖成分の単糖化、すなわち、酵素糖化プロセスの効率化が非常に重要な課題であり、それに基づく酵素コスト削減が大きな目標となっている[1)]。本講演では、この課題を解決していくために必要な幾つかの戦略について説明させていただきたく思っている。

セルロース系バイオマスの酵素糖化の効率化を考えて行く上で、まず考えなければならないことはその植物起源と前処理方法の組み合わせである。この場合、対称とするセルロース系バイオマスを構成するセルロース、ヘミセルロースならびにリグニンがお互いにどのような結合様式や位置関係において存在しているかを理解しておくことが必要である。これにより、酵素糖化に必要な酵素の選択やプロセスの設計などは大きく変わってくるはずである。

次に考えなければならないことは、酵素糖化の効率化ということがそもそも何を目標にしているかということである。そこには、酵素糖化によって得られてくる生成物の収量、すなわちグルコースやキシロースなどの収量を向上させることと、糖化速度を向上させることの2通りの目標がある。また、両者の関連性についても整理しておく必要がある。これまでの研究では、収量を上げることについては多くの注意が払われているが、そもそも酵素が触媒であることを考えると、速度の向上についても十分に配慮をすべきである。最近の私たちの研究では、セルラーゼが結晶性セルロースを加水分解する速度は決して遅くないことが示されており、その原因はむしろ基質側の構造的な制約に起因することが明らかとなっている[2), 3)]。一方、バイオマス中のセルロースの酵素糖化を効率化するためには、ヘミセルロースの分解を促進することについてもポイントである。このような観点に基づく酵素の選択と組み合わせは、酵素糖化の効率化のみならず、酵素生産の効率化を考えて行くためにも重要である。

さらに、酵素コスト削減のためには、酵素糖化の効率化や酵素生産のだけではなく、酵素の回収と再利用についても考慮する必要があり、このことも酵素の選択やプロセスの設計にとっても意味を持っている。以上のように、酵素糖化の効率化、酵素生産の効率化、さらに酵素の回収と再利用という３つの観点を組み合わせた戦略を持つことで、酵素コストの大幅削減という目標達成のための道筋が見えてくる。

〔参考文献〕1）鮫島正浩：エネルギー学会誌，90，10-16（2011），2）五十嵐圭日子，鮫島正浩：化学と生物，47，323-328(2009),3) K. Igarashi, et al.：Science, 333, 1279 -1282 (2011)

Cellulose, Cellulase, Biomass

講演番号：4SY01-2
講演日時、会場：3月25日14:10～ A校舎30会場

セルロソーム研究の基礎から応用：*Clostridium thermocellum*

The cellulosomes of *Clostridium thermocellum*: from basics to applications

○小杉　昭彦、森　隆、Prawitwong Panida、Deng Lan（国際農研センター）
○Akihiko Kosugi, Yutaka Mori, Panida Prawitwong, Lan Deng (JIRCAS)

好熱嫌気性細菌*C. thermocellum*のセルロース分解能に関する研究は古く、1899年MacFaydenとBlaxallによって高温下でセルロースを完全分解できる細菌の発見までさかのぼる。高温環境で高速かつ強力なセルロース分解能は多くの研究者の注目を集めたが、本格的にセルロソームの機能及び構造学的研究が始まったのは1970年代後半からである。アメリカ、イスラエルの研究グループを中心に、*C. thermocellum*の強力なセルロース分解能が2M~3.5MDaの巨大な酵素複合体によることが見出され、この酵素複合体はセルロソームと命名された。セルロソームは９個のコヘシンと呼ばれる酵素サブユニットレセプターをもつ骨格タンパク質を核として種々の酵素サブユニットが規則的に配列された基本構造により構成される。

*C. thermocellum*のセルロソームは実用上、以下の5つの特徴を強調できる。①結晶性セルロースに対する高い分解力、②骨格タンパク質を介した酵素サブユニット集積システムによる多種類の酵素触媒機能、③骨格タンパク質及び多種の酵素サブユニットが有する多様な糖質結合能、④高い安定性、⑤高温（55℃～65℃）での糖化による低い汚染リスク。このように*C. thermocellum*のセルロソームは糸状菌*T. reesei*酵素とは異なる特徴を有しているが、特に②、③、④は酵素の再利用を可能にする特質である。すなわち*T. reesei*酵素のように、分解に必要な酵素がバラバラの状態で存在するのではなくワンセットで存在し、セルロース系バイオマスの糖化に必要な多種類の酵素群がひとつのセットとして基質に結合しアタックする。理論的には分解に必要な酵素群を反応終了後、新たに加える基質にまとめて吸着、回収し、再度利用することができる。しかも、安定性に優れているために長期間連続使用できるはずであり、糖化コストの低減化が期待できる。私たちはこれまでセルロソームの再利用システム構築を目指して、既存菌株よりも高活性を有する*C. thermocellum*菌株のスクリーニング、セルロソームの糖化能力を高めるβ-グルコシダーゼの選定、セルロソームとβ-グルコシダーゼを併用した再利用システムの構築を行い、稲わら等のセルロース系バイオマスの糖化の効率化を可能にした。講演ではセルロソームの再利用システムを中心とした糖化技術を紹介すると共に、その研究過程で発見した新属新種の好熱好アルカリ嫌気性セルロース分解細菌（*Amorocellulobacter alkalithermophilum*）のセルロソームの特徴や、今後の*C. thermocellum*のセルロソームの実用的利用へ向けた戦略についても述べたい。

Clostridium thermocellum, Cellulosome, Cellulose

講演番号：4SY01-3
講演日時、会場：3月25日14:45～ A校舎30会場

セルロソーム研究の基礎と応用：*Clostridium cellulolyticum*

The cellulosomes of *Clostridium cellulolyticum*: from basics to applications

○Henri-Pierre Fierobe (フランス CNRS・マルセイユ)
○Henri-Pierre Fierobe (CNRS, Marseille, France)

C. cellulolyticum はグラム陽性の絶対嫌気性菌であり、菌体外に効率的にセルロースを分解する巨大な酵素複合体“セルロソーム”を産生する。*C. cellulolyticum* にはタイプⅠのコヘシン（cohesin）−ドックリン（dockerin）ドッキング・システムが存在し、骨格タンパク質は CipC と呼ばれる酵素活性を有さない唯一１種類の最もシンプルなセルロソームを形成する。ドックリンを保有するセルロソーム性タンパク質はゲノム上に 62 個存在し、セルラーゼ 19 個、ヘミセルラーゼとペクチナーゼ 34 個、プロテアーゼ１個、機能未知タンパク質８個が見つかっている。様々な不溶性基質（純結晶性セルロース、キシランあるいは藁）を含む培地で培養した精製セルロソームをプロテオーム解析した結果、CipC を含む 29 個のセルロソーム構成成分が基質の違いに拘らず存在し、また 21 個は基質特異的に発現しており、他の 12 個のタンパク質は検出不可能であった。最も重要なセルロソーム遺伝子クラスター（*cip-cel*）には、上記の骨格タンパク質 CipC の他に、セルロース分解に最も重要なセルラーゼ Cel48F と Cel9E がコードされている。数年前に、我々は骨格タンパク質 *cipC* 遺伝子の 3’側に塩基挿入変異を行った *C. cellulolyticum* 変異体を単離した。この変異体は結晶性セルロースを基質とした場合に全く生育しなかったことから、*cip-cel* 遺伝子クラスターはセルロース分解に重要なセルラーゼ遺伝子をコードしていることが判明した。これまでに *C. cellulolyticum* 由来の６種類のエセルラーゼについて、それらの性質を解析した。エンド型セルラーゼ（Cel5A、Cel8C、Cel9G、Cel9M）あるいはセルラーゼエンドプロセッシブ型セルラーゼ（Cel48F、Cel9E）の性質を示したが、それらすべての酵素は結晶性セルロースに対して特異的な活性を示した。一方、同じ酵素で作製したセルロソームは結晶性セルロースに対して 100 倍以上の酵素活性を示した。これらの結果は、骨格タンパク質 CipC への酵素複合体の形成が結晶性セルロースに対する活性を向上させていることを示唆した。そこで、*C. cellulolyticum*、*Ruminococcus flavefaciens*、*C. thermocellum* からそれぞれ互いに異なるコヘシンおよび天然の *C. cellulolyticum* 由来のセルロソーム性セルラーゼのドックリンを *C. thermocellum* あるいは *R. flavefaciens* のものに入れ換えて、ハイブリッド化したミニセルロソームを構築し、骨格タンパク質における「CBM の効果」と「酵素の相乗効果（GH9 と GH48）」を見出すことができた。

Clostridium cellulolyticum, cellulosome, hybrid minicellulosome

講演番号：4SY01-4
講演日時、会場：3月25日15:20～ A校舎30会場

セルロソーム研究の基礎と応用：*Clostridium cellulovorans*

The cellulosomes of *Clostridium cellulvorans*: from basics to applications

○田丸 浩[1,2,3] ([1]三重大院・生資、[2]三重大・生命支セ、[3]三重大・新産業創成)
○Yutaka Tamaru[1,2,3] ([1]Mie Univ.Grad. Bioresour., [2] Mie Univ. LSRC, [3]Mie Univ. ITII)

C. cellulovorans は 1984 年に UCLA の Sleat らによって wood chip から単離されたグラム陽性の絶対嫌気性中温菌であり、*C. cellulolyticum* と同様にタイプ I の cohesin–dockerin から成るセルロソームが存在する。2010 年に報告した *C. cellulovorans* のゲノム解析[1)]の結果、*C. cellulolyticum* および *C. thermocellum* に比べて約 1 Mb 以上もゲノムサイズが大きかった。一方、セルロソーム関連遺伝子の総数は他の 2 種と比べて最も少なかったが、セルロソームを形成しないノンセルロローム（noncellulosome）の総数は最も多かった[2)]。さらに、骨格タンパク質は既知の CbpA と HbpA に加えて、新規に CbpB と CbpC（CBM3A、SLH ドメイン、cohesin ドメインを各 1 個保有）が発見され、ゲノム上でクラスターを形成していた。さらに興味深いことに、キシランを基質とした培地でのみ CbpB と CbpC が発現していたことから、キシロースで遺伝子発現が誘導・制御されることが示唆された[3)]。種々の不溶性基質（結晶性セルロース、キシラン、稲ワラ、バガス）を含む培地で培養した精製セルロソームをプロテオーム解析した結果、各基質によってセルロソーム構成成分が異なることが明らかになった。したがって、*C. cellulovorans* を各種の実バイオマスで培養し、その構成タンパク質をプロテオーム解析することで、効率的なバイオマス分解に最適な“糖化用酵素カクテル”を提供できるかも知れない。

最後に、*C. cellulovorans* の驚異的なバイオマス分解能を実証するために、ABE 発酵菌で中温菌の *C. acetobutylicum* を組み合わせた共培養系を試みている。すなわち、*C. cellulovorans* が実バイオマスを分解して得られた C５・C6 糖から直接 *C. acetobutylicum* が ABE 発酵できれば、有効なバイオブタノール生産系になると期待できる。そこで、*C. cellulovorans* を結晶性セルロース培養した後に、*C. acetobutylicum* を投入してアルコール発酵能を調べた。この共培養の結果、セルロース利用性が全く無い *C. acetobutylicum* は *C. cellulovorans* がセルロースから分解されたグルコースを利用することで、エタノールおよびブタノールを産生していた。

〔参考文献〕1) Y. Tamaru et al., J. Bacteriol., 192, 901-902 (2010), 2), Y. Tamaru et al., Microb. Biotechnol., 4, 64-73 (2011), 3) H. Miyake et al., unpublished.

Clostridium cellulovorans, cellulosome, noncellulosome

講演番号：4SY01-5
講演日時、会場：3月25日15:55～ A校舎30会場

セルロソーム形成機構解明への新手法の展開

Development of a novel method for analysis of cellulosome formation

○植田充美（京大院農・応用生命、京都バイオ計測センター）
○Mitsuyoshi Ueda (Kyoto Univ., Div. Appl. Life Sci., KISTIC - KIST-BIC)

我々は世界に先駆けて、中温完全嫌気性菌である *Clostridium cellulovorans* の全ゲノム配列の完全解析を行った。[1] その結果、この微生物のもつ酵素複合体「セルロソーム」は、これまでの報告の「セルロソーム」のなかでも最も進化したもので、非常に効率良くセルロース質ソフトバイオマスを完全分解する能力をもつことを示唆してきた。

セルロソームは、足場タンパク質に多数の酵素を集積することで複合体を形成し、構成酵素の最適な組み合わせをとり効率的な分解を実現しており、その機構は非常に興味深い。近年、バイオマスの効率的な分解性を示すこの酵素超複合体「セルロソーム」のモデルは、バイオマスの次世代の前処理法として注目されているが、その分解機構は不明な点が多い。

そこで、多種類のバイオマスを非常に効率的に分解できるセルロソームを生産する *C. cellulovorans* のフォーカスドプロテオーム解析により、効率的な分解機構の解析を行った。セロビオースや種々のセルロースを基質として *C. cellulovorans* を嫌気条件下で定常期まで培養した培養液からセルロソームを精製した後、我々の開発してきた wide pore モノリスカラムを用いた高性能 HPLC によってセルロソームタンパク質を分離し、MS/MS により網羅的に同定した。[2]

その結果、基質条件に関わらず恒常的に生産されている基本的なタンパク質群と可変的に生産されているタンパク質群があることが明らかになった。このことから、*C. cellulovorans* は、炭素源としてのバイオマス環境をセンシングしていることが示唆された。さらに、基質変化に応じたセルロソーム構成酵素プロファイルを調査することにより、この酵素超複合体「セルロソーム」は、これまで考えられているような単純で静的な酵素超複合体ではなく、セルロソーム構成の酵素群を動的に変化させることで環境適応できる巧妙で動的な酵素超複合体であることが示唆された。[3]

1）Tamaru Y. *et al.*, *J. Bacteriol.*, 192, 901-902 (2010)
2）Morisaka H. *et al.*, *J. Sep. Sci.*, 32, 2747-2751 (2009)
3）Matsui K. *et al.*, submitted.

Cellulosome, *Clostridium cellulovorans,* Proteome analysis

講演番号：4SY02-1
講演日時、会場：3月25日13:35～ A校舎31会場

3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸を前駆体とする放線菌二次代謝産物の生合成経路の解明

Elucidation of b iosynthetic pathways for secondary metabolites derived from 3-amino-4-hydroxybenzoic acid in *Streptomyces*

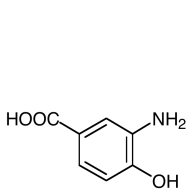
○大西 康夫（東大院・農生科・応生工）
○Yasuo Ohnishi (The University of Tokyo)

演者の研究グループでは、*Streptomyces griseus*が生産する黄色色素grixazone A (GX-A) の全生合成経路を明らかにしたこと[1-3]を契機に、3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸 (3,4-AHBA) を前駆体として合成される放線菌二次代謝産物の生合成経路に関して研究を行ってきた。本講演では、*Streptomyces murayamaensis*が生産する4-ヒドロキシ-3-ニトロソベンズアミド (4,3-HNBAm) および*Streptomyces* sp. WK-5344が生産するFerroverdin A (FV-A) [4]の生合成経路について発表する。いずれの経路においても、GX-A生合成経路と同様に、3,4-AHBAは2つの酵素 (GriIホモログ、GriHホモログ) によって合成される。その後、3,4-AHBAを修飾する一連の酵素群に違いがあるわけだが、両化合物およびGX-Aの生合成遺伝子クラスターには、高い相同性を示すタンパク質が数多くコードされており、二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの“生い立ち”を考える上で非常に興味深く、その進化についても考察したい。

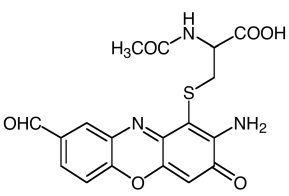
4,3-HNBAmやFV-Aなどのパラ位置換オルトニトロソフェノール化合物は、放線菌から多数単離されている。天然化合物のニトロソ基の生合成に関わる酵素は、これまで全く知られていなかったため、本研究でチロシナーゼファミリーの銅酵素 (NspFおよびFevF) がニトロソ基の生合成に関与していることを示した意義は大きい。

4,3-HNBAm生合成においては、3,4-AHBAのカルボキシル基がアミドに変換された後、NspFによるアミノ基のニトロソ基への酸化が起こる[5,6]。FV-A生合成では、3,4-AHBAのカルボキシル基にビニルフェノールがエステル結合した後、FevFによるニトロソ化反応が起こる。一方、GX生合成では、3,4-AHBAのカルボキシル基がアルデヒド基に還元された後、ニトロソ化合物ではなく、キノンイミンが生成される。この酸化に関わる酵素GriFは、NspFおよびFevFと約70%の相同性を有しており、これらの酸化酵素の触媒反応の違いは非常に興味深い。

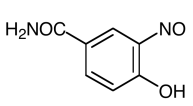
1) Suzuki H. et al. ***J. Biol. Chem.*** 281, 36944 (2006), 2) Suzuki H. et al. ***J. Biol. Chem.*** 281, 824 (2006), 3) Suzuki H. et al. ***J. Antibiot.*** 60, 380 (2007), 4) Tomoda H. et al. ***J. Antibiot.*** 52, 1101 (1999), 5) Noguchi A. et al. ***Nat. Chem. Biol.*** 6, 641 (2010), Noguchi A. et al. ***J. Antibiot.*** 64, 93 (2011)



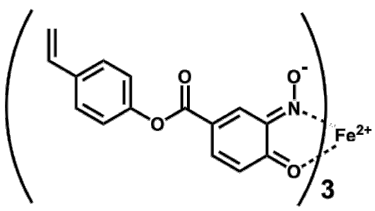
3,4-AHBA



GX-A



4,3-HNBAm



FV-A

Streptomyces, biosynthesis, oxidase

講演番号：4SY02-2
講演日時、会場：3月25日13:59～ A校舎31会場

微生物と酵素の潜在機能の開拓：探索と戦略

Pioneering of potential of microbial and enzyme functions: Screening and strategy

○ 小林 達彦（筑波大・生命環境）
○ Michihiko Kobayashi (Univ. Tsukuba)

生命活動において、実質的に重要な代謝機能を担っているのはタンパク質・酵素である。すべての酵素は、触媒する反応様式に基づいて、Oxidoreductase, Transferase, Hydrolase, Lyase, Isomerase, Ligaseの６種類に大きく分類され得る。さらに、酵素それぞれに対し、国際生化学・分子生物学連合（NC-IUBMB）によってEC番号が付与され細分化されている。このように、すべての酵素は細かく分類され、その役割が規定されているが、実際は、そのような専門的役割にとどまっている訳ではない。すなわち、本来の反応以外の反応を触媒する場合がある。また、酵素の発現に関しても、特に誘導酵素においては、本来の生理的誘導基質に限らず、それとは異なる化合物を認識し誘導発現機構が稼働する場合もある。

微生物にはまだまだ多くの未知なる現象が存在し、微生物および酵素が持つ多様な潜在機能を探索・開発することは、有用物質を生産する上で重要である。本講演では、我々がこれまで研究してきた酵素のユニークな特性や思いもしない現象を取り上げ、特に、以下の５点を中心に概説する。

（１） 誘導酵素は、どのような条件下で、どれくらいの量、菌体内に生成させることが可能か？
（２） どのような分子機構で、酵素は誘導的に生成されるのか？
（３） 構造遺伝子の転写・翻訳後、さらにどのような翻訳後修飾過程を経るのか？
（４） 酵素のアミノ酸配列をもとに相同性検索を行うことで、どのようなことが見えるのか？
（５） 酵素の反応触媒機構や構造をもとに、未知の基質や反応生成物を推定することができるのか？

さらに、様々な結合様式の酵素の発現と機能に関する基礎的知見を基に、微生物および酵素の新機能開発の今後の方向性についても考察したい。

関連発表論文：

PNAS**,** 90, 247 [1993]; ***PNAS*****,** 92, 714 [1995]; ***PNAS*****,** 93, 4267 [1996]; ***PNAS*****,** 93, 10572 [1996]; ***JBC*****,** 271, 15796 [1996]; ***PNAS*****,** 94, 36 [1997]; ***PNAS*****,** 94, 11986 [1997]; ***PNAS*****,** 95, 12787 [1998]; ***Nature Biotechnol.*****,** 16, 733 [1998]; ***JBC*****,** 276, 23480 [2001]; ***JBC*****,** 277, 45860 [2002]; ***JBC*****,** 278, 29600 [2003]; ***PNAS*****,** 101, 14031 [2004]; ***PNAS*****,** 101, 13726 [2004]; ***JBC*****,** 279, 47619 [2004]; ***JBC*****,** 280, 8660 [2005]; ***PNAS*****,** 103, 564 [2006]; ***JBC*****,** 283, 11312 [2008]; ***PNAS*****,** 105, 14849 [2008]; ***JBC*****,** 284, 14930 [2009]; ***Biochemistry*****,** 49, 9638 [2010]; ***JBC*****,** 285, 34793 [2010]; ***PNAS*****,** 108, 6615 [2011]

Enzyme, Catalysis, Microorganism

講演番号：4SY02-3
講演日時、会場：3月25日14:23～ A校舎31会場

ダイズのイソフラボングルコシルトランスフェラーゼの触媒機能とタンパク質間相互作用
Isoflavone 7-*O*-glucosyltransferase of soybean: its catalytic strategy and protein-protein interaction

○中山　亨（東北大・院・工）
○Toru Nakayama (Grad. Sch. Engin., Tohoku Univ.)

【緒言】　イソフラボンはダイズなどのマメ科植物に特異的に含まれるフラボノイドで，ダイズではその 7 位のマロニルグルコース配糖体が液胞に蓄積している．イソフラボンはダイズにおける植物–微生物間相互作用に重要な役割を果たすばかりでなく，ヒトにおいては骨粗鬆症予防効果やがん予防効果などの有益な生理活性を示す．これらの生理活性はもっぱらアグリコンの形で発揮されるため，イソフラボンの配糖体化はその生理活性制御の重要な鍵を握っているといえる．しかしながら，この重要な修飾反応を司る酵素（イソフラボン 7-*O*-グルコシルトランスフェラーゼ，GmIF7GT）の実体は明らかでなかった．われわれは，ダイズ実生の根から GmIF7GT を均一状態に精製し，cDNA クローニングと機能解析を行った．

【グリコシルトランスフェラーゼの触媒機構と GmIF7GT】　精製酵素は N 末端の 49 残基を欠失しており，系統的に近縁なグリコシルトランスフェラーゼ（GT）群に高度に保存される触媒重要 His 残基を欠いているにもかかわらず，強い酵素活性を示した（k_{cat}, 0.7 s^{-1}）．GmIF7GT の全長 cDNA を用いて部位特異的変異解析を行い同酵素の触媒重要残基を検索したところ，近縁な GT 群に高度に保存されている触媒重要残基（His15，Asp125）を Ala に置換した GmIF7GT 変異体は，野生型のそれぞれ 17 および 87%の活性を示した．一方，同酵素の Glu392Ala 変異体の活性はほぼ完全に消失し，Glu392Asp 変異体は野生型の 390%の活性を示した．これらの結果は，GmIF7GT が他の多くの GT とは異なる戦略で触媒作用を発現していることを示唆している．

【メタボロン形成】　フラボノイドの生合成酵素群は小胞体膜上で代謝複合体（メタボロン）を形成し，メタボライトチャネリングを可能とすることにより代謝の円滑化を図っていると考えられている．メタボロン形成はモデル植物シロイヌナズナで検証されているが，実用植物で調べられた例はほとんどない．GmIF7GTを含むダイズイソフラボン生合成酵素系のメタボロン形成の可能性についてもあわせて考察する．

Glycosyltransferases, Reaction mechansm, Metabolon

講演番号：4SY02-4
講演日時、会場：3月25日14:47～ A校舎31会場

細菌細胞膜における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能：局在化と膜タンパク質生合成における機能

Physiological roles of phospholipids containing polyunsaturated fatty acids in bacterial cell membrane: subcellular localization and involvement in biosynthesis of membrane proteins

○栗原 達夫、川本 純、江崎 信芳（京大化研）
○Tatsuo Kurihara, Jun Kawamoto, Nobuyoshi Esaki (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

生体膜は主として脂質とタンパク質から構成されている。生体膜において脂質は膜タンパク質と相互作用し、それらの生合成や機能発現を介助していると考えられる。生体膜が細胞と外界の間の物質交換やシグナル伝達において正しく機能したり、細胞のダイナミックな形態変化を生み出したりする仕組みを理解するためには、これらの構成成分が膜内でどのように組織化され相互作用しているかを明らかにする必要がある。生体膜における脂質とタンパク質の相互作用を明らかにすることは、膜局在性の酵素の生合成や機能発現のメカニズムを理解し、応用開発を目指す上でも重要であると考えられる。我々は機能性脂肪酸として注目される高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生体膜における機能解析を行ってきた。本講演では、膜タンパク質のフォールディングにおける高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能や、高度不飽和脂肪酸含有リン脂質が細菌細胞膜に形成するマイクロドメインに関する我々の研究成果を紹介する。

南極海水から分離された低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は高度不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を生産する。EPA はホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルグリセロールのアシル鎖として細胞膜に存在する。本菌の EPA 生合成酵素遺伝子を破壊し、EPA 欠損株を作製したところ、一部の膜タンパク質の生産量が減少した。主要な外膜タンパク質である Omp74 については、そのフォールディング状態に異常が生じた。Omp74 のリポソーム膜への組み込み過程を *in vitro* で解析した結果、Omp74 のフォールディングが EPA 含有リン脂質によって促進されることが示された。EPA 含有リン脂質が膜タンパク質のフォールディングを介助するケミカルシャペロンとしての機能をもつことが示唆された。

一方、EPA 含有リン脂質の細胞内局在性について蛍光標識プローブを用いて解析した。EPA をアシル鎖として含み、蛍光発色団を極性頭部に結合させた蛍光リン脂質プローブを細胞に添加した実験では、加水分解によって EPA と蛍光発色団が解離して局在性を調べることができなかった。そこで、加水分解を受けないエーテル結合によって EPA がグリセロール骨格に結合した蛍光リン脂質プローブを化学合成した。このプローブを用いて局在性を調べたところ、EPA に依存してリン脂質が細胞分裂部位に集積することが示された。我々が先に行った遺伝子破壊実験では EPA 欠損が細胞分裂阻害を引き起こすことが示されている。EPA 含有リン脂質が、細胞分裂を司る膜タンパク質と相互作用して細胞分裂に寄与している可能性や、細胞分裂部位のように、きわめて曲率の高い膜構造の形成に EPA 含有リン脂質が寄与している可能性が考えられる。

polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid, membrane microdomain

講演番号：4SY02-5
講演日時、会場：3月25日15:11～ A校舎31会場

リジン・アルギニン生合成機構と進化の解明に向けて

Key to elucidate mechanisms and evolution of lysine and arginine biosyntheses

○西山　真（東大生物工学セ）
○Makoto Nishiyama (Biotechnology Research Center, The University of Tokyo)

リジン生合成系には、アスパラギン酸からジアミノピメリン酸(DAP)を経るものと、αケトグルタル酸からαアミノアジピン酸(AAA)を経るものが知られていた。私の研究グループでは、好熱菌においてAAAを経由する新たなタイプのリジン生合成系を見出した。その系の前半部分はカビなどでみられるものと同様であるが、AAAからリジンへの変換はカビものもとは異なり、アルギニン生合成系の前半部分に相当するグルタミン酸からオルニチンまでの生合成に類似した反応系で構成されている。アルギニン生合成では、グルタミン酸の側鎖のカルボキシル基は、リン酸化の後、還元されセミアルデヒドとなるが、これがグルタミン酸自身のアミノ基と容易に分子内環化してしまうため、生合成の効率を落としてしまう。そのため、グルタミン酸のアミノ基はまずアセチル基で保護した後に、側鎖のカルボキシル基をリン酸化することで生合成が開始する。私たちが見出したリジン生合成系もアルギニン生合成と類似した反応によって進行するため、AAA のアミノ基を保護する必要がある。リジン生合成では、AAAのアミノ基はアセチル基の代わりにLysWと名付けた低分子量タンパク質によって保護され、付加されたタンパク質が以降の生合成酵素によく認識されるためのキャリアタンパク質として働くとてもユニークなものである。

これと同様なリジン生合成系の分布を探索する過程で、古細菌の一部がリジン生合成だけでなく、アルギニン生合成においてもキャリアタンパク質を介するシステムを用いていることを見出した。さらに一部の古細菌のリジン・アルギニン生合成では、Dual functionalな活性を持つ単一の酵素がLysWに付加されたAAA、グルタミン酸の両方を基質とすることも明らかとなっている。これらの結果、および系統解析などから、リジンおよびアルギニン生合成系は基質特異性が寛容な共通の祖先から進化したものと推測され、両生合成系は進化におけるパッチワーク仮説を支持する典型的な実例ということができる。上述したように、リジン生合成系として知られるDAP経路とAAA経路は類似した反応を行う酵素ホモログを互いに含まないことから、両者は起源が異なるものと考えられていた。しかし、DAP経路のリジン生合成酵素のいくつかは、AAAを経由するリジン生合成系、アルギニン生合成系を構成する酵素のホモログであり、DAPを経るリジン生合成系もまたAAAを経由するリジン生合成系、アルギニン生合成系と祖先を共通にすることが推測される。本シンポジウムでは、ユニークなリジン、アルギニン生合成系を構成する酵素の構造と機能を示しながら紹介すると共に、同生合成系を始め関連代謝系の進化などについて議論したい。

Common ancestor, Amino acid biosynthesis, Evolution

講演番号：4SY02-6
講演日時、会場：3月25日15:35～ A校舎31会場

アーキアの補酵素A生合成経路とそれから見えてくる代謝進化

Coenzyme A biosynthesis in the Archaea

○跡見晴幸、横大路裕介、冨田宏矢、石橋拓也、今中忠行[1]（京大院・工、[1]立命館大・生命科学）
○Haruyuki Atomi, Yuusuke Yokooji, Hiroya Tomita, Takuya Ishibashi, Tadayuki Imanaka[1] (Kyoto Univ., [1]Ritsumeikan Univ.)

超好熱菌は一般に80℃以上の至適生育温度を示す微生物として定義され、その大部分がドメインアーキアに属する。超好熱菌は16S ribosomal RNAに基づいた全生物の進化系統樹において根に最も近い位置を占めており、現存する生物の中では原始生命体に最も近い生物群として捉えられている。我々は超好熱性アーキアの一種*Thermococcus kodakarensis*を対象とし、様々な代謝経路の解析を進めており、これらの機構をより“進化した”生物のものと比較することにより個々の代謝経路が辿ってきた進化経路についての知見を得ようとしている。本発表ではアーキアの補酵素A生合成経路に関する研究成果を報告する。

補酵素A（Coenzyme A, CoA）は全生物に存在し、細胞内の有機酸とチオエステル結合を形成することにより、多様な分解・生合成機構に関与する。Acetyl-CoA, succinyl-CoA, malonyl-CoA, hydroxymethylglutaryl-CoAなどのCoA化合物は糖や脂肪酸の分解と合成、イソプレノイド化合物の合成など様々な代謝経路の重要な中間体である。真核生物やバクテリアにおけるCoA生合成経路は、valineを出発原料として共通の9段階の反応からなる。特にpantoateから4’-phosphopantothenate（PPan）への変換はpantothenate synthetase（PS）およびpantothenate kinase（PanK）の2つの酵素によって触媒される。これら9段階の反応を触媒する酵素のホモログを探索したところ、興味深いことに多くのアーキアのゲノム上にPS、PanKのホモログ遺伝子が存在しないことが判明した。比較ゲノム的アプローチで研究を進めた結果、アーキアではpantoate kinase（PoK）およびphosphopantothenate synthetase（PPS）という2つの新規酵素が上記の変換を担っていることが明らかとなった。従来知られていた真核生物やバクテリアでの経路においては、まずpantoateとβ-alanineとの縮合反応によりpantothenateが生成し、続いてpantothenateのリン酸化反応によりPPanが生成する。これに対しアーキアでは、PoKがまずpantoateのリン酸化を触媒して4-phosphopantoateを生成し、その後PPSによりβ-alanineとの縮合反応が進行しPPanが得られる。このように真核生物・バクテリアとアーキアの経路では縮合反応とリン酸化反応の順番が逆である。この事実から細菌、真核生物やアーキアが進化上分岐する前にはCoA生合成経路が確立していなかったことが示唆される。ここではアーキア固有の酵素PoK, PPSの機能特性について報告するとともに、進化の初期段階においてCoAの代わりに利用されたチオール基含有化合物について考察してみたい。

coenzyme A, Archaea, hyperthermophile

講演番号：4SY02-7
講演日時、会場：3月25日15:59～ A校舎31会場

コミュニティとして機能するためのインフラストラクチャー

Infrastructure to function as a community

○有田　正規（東大・理、理研・PSC）
○Masanori Arita (Univ Tokyo, RIKEN PSC)

【目的】従来のバイオインフォマティクスでは生物学者に代わって正解を予測するプログラムや列挙するためのデータベースが幅を利かせてきた。このままでは誤った方向に向かうのではないか。正解を導出するのに必要な原理や実態を探るのが生物学のはずで、既知の原理に基づいて列挙する作業は博物学である。大量情報が入手可能になった現在、ゲノム博物学は全盛期を迎えつつある。いま重要なのは、原理に迫るために全体像を把握する技術および積極的に意見の集約を図る技術である。
【方法】Wikiを用いてデータの集約をおこなうサイト http://metabolomics.jp/ を構築している。このサイトでは表示内容をページに記載されたデータをプログラム処理した結果とみなす。各ページには細切れになったデータの断片が記録してあり、それらを検索・集計した結果がユーザに提示される仕組みである。本方式は文字列に対して力を発揮し、文字データの集計や統計結果を少ないコストで維持管理してきた。しかし学術データの多くは数値を扱う。そこで数値データの処理関数を増やし、化学構造の組成式や質量数に関する機能の拡充を試みた。
【結果】組成式をもとに質量や代謝物部分構造を処理する機能を追加した。これをもとに植物培養プロトコルにおける培地組成の比較や、マススペクトルのフラグメント比較等が可能になり、数値データも（比較的）楽に処理できるようになった。例えば遺伝子発現量のような定量計測結果を大量に蓄積し、統計処理後のまとめを眺める仕組みを構築できる。しかし基本は文字列として記述、格納されているため効率は悪いと言わざるを得ない。将来的にはWiki中に、データとして直接数値を書き込む仕組みを導入したい。これらの結果は全て上記ウェブサイトから閲覧できる。

Database, Wiki, Knowledge Representation

講演番号：4SY03-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ A校舎32会場

システイン/シスチンのシャトルシステムによる大腸菌の新しい酸化ストレス防御機構

A novel oxidative stress defense mechanism of *Escherichia coli* by cysteine/cystine shuttle system

○大津 巌生、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Iwao Ohtsu, Hiroshi Takagi（Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.）

大腸菌の細胞質には遊離のシステイン（Cys）がほとんど検出されないにも関わらず、細胞質からペリプラズムへ Cys を輸送する複数の内膜トランスポーター（YdeD, YfiK, Bcr）などが存在しており、その生理的意義に興味が持たれていた。最近、我々は大腸菌において Cys トランスポーターYdeD によって細胞質からペリプラズムへ排出された Cys が、過酸化水素を非酵素的に水へと還元し、その後自身は酸化型であるシスチン（CySS）に変換され、再度 CySS 結合タンパク質 FliY 依存的に細胞質へ取り込まれるという、ユニークな酸化ストレス防御機構 Cys/CySS シャトルシステム を提唱した（*J. Biol. Chem.* 2010）。しかしながら、CySS を実際に取り込むインポーターはこれまでに同定されていない。本研究では、大腸菌における CySS 取り込み系の全容を明らかにしたので報告する。

大腸菌の CySS 取り込み経路は 2 つしか存在しない。1 つは ABC（ATP binding cassette）トランスポーターであり、3 種のタンパク質（ペリプラズムに存在する CySS 結合タンパク質 FliY、3 回膜貫通タンパク質 YecS、ATPase 活性を持つ膜表在性タンパク質 YecC）から構成されていることを見出した。アイソトープラベルされた CySS（[^{14}C]-CySS）取り込み実験から、この FliY-YecSC 輸送系は、CySS 高親和性（*Km*=106 nM）であることが判明した。また FliY-YecSC 輸送系のホモログは、バクテリアに広く保存されていた。一方、残りの CySS 取り込み系は 11 回膜貫通タンパク質 YdjN であり、腸内細菌にのみそのホモログが存在していた。この YdjN 輸送系は、CySS 低親和性（*Km*=1060 nM）であり、グルコース非依存的な CySS 取り込みであること、Walker モチーフが存在しないことなどから、H^+あるいは Na^+の電気化学的ポテンシャルによる輸送であると予想している。これら 2 つの CySS 取り込み経路を破壊した Δ*yecS*Δ*ydjN* 二重欠損株は、[^{14}C]-CySS が細胞内に取り込まれないこと、CySS を唯一の硫黄源としたとき生育できないことから、YecS と YdjN タンパク質は大腸菌の生育に必須である。さらに、硫酸を唯一の硫黄源としたとき、野生株と比較して Δ*yecS*Δ*ydjN* 二重欠損株は過酸化水素に感受性を示した。また CySS 取り込みに関与する *fliY*, *yecS*, *yecC*, *ydjN* 遺伝子は、CySS というよりはむしろ過酸化水素によって転写が誘導されていた。

以上の結果から、無機硫酸から生合成された Cys は、Cys トランスポーターYdeD によりペリプラズムに排出され過酸化水素を消去する。その後自身は酸化型の CySS となり、再び細胞質へと取り込まれる。本研究で明らかにした 2 つの異なるタイプの CySS インポーターは Cys トランスポーターYdeD と協調して酸化ストレス防御に重要な役割をしていることが強く示唆された。

Cystine importer, Cysteine transporter, Oxidative defense

講演番号：4SY03-2
講演日時、会場：3月25日14:00～ A校舎32会場

大腸菌の新規L-アラニン排出輸送体の同定と機能解析

Identification and characterization of the novel L-alanine exporter YgaW in *Escherichia coli*

○米山 裕、堀 初弘（東北大院・農）
○Hiroshi Yoneyama, Hatsuhiro Hori (Tohoku Univ)

【目的】細胞膜は小さな疎水性分子を除きほぼすべての物質に対し透過障壁として働くため、膜を介する基質の選択的な輸送は細胞生理の恒常性を保つ上で必須な機能である。この膜輸送は、細胞内への物質(栄養物)の取り込みと、代謝産物の排出の二方向性があり、その重要性と研究の容易さから各種基質の取り込み輸送に関する多くの研究がこれまでなされ、アミノ酸や糖などの栄養物質の取り込み輸送体が数多く同定されてきた。一方、排出輸送に関してはグルタミン酸発酵に代表される各種アミノ酸発酵において、産物が培地中に著量蓄積する現象が以前より知られていたが、これらの一次代謝産物の排出メカニズムは長らく謎であった。ところが、1996年にL-リジン(L-Lys)排出輸送体(LysE)が同定されて以降、これまで10種を超えるアミノ酸排出輸送体が同定され、アミノ酸発酵の生産効率のさらなる向上に向けた応用研究に関心が持たれている。しかしながら、L-アラニン(L-Ala)を排出する二次輸送体は知られていなかった。我々は、この課題に伝統的な遺伝学の手法を用いて挑戦し初めて大腸菌のL-Ala排出輸送体の同定に成功したので、その生理的意義も含めて議論したい。
【方法】LysE欠損*C. glutamicum*変異株をL-Lysを含むジペプチドLys-Ala存在下で培養すると、過剰のL-Lysを細胞内に蓄積しその生育が抑制される現象が知られていた。L-Ala排出能欠損変異株も細胞内に著量のL-Alaを蓄積すると生育抑制を来すとの仮説に基づき、このペプチドフィーディング法を用いAla-Ala存在下で生育できない大腸菌変異株をランダムに選択した。次に分離したAla-Ala高感受性変異株を宿主としたショットガンクローングを行い、Ala-Ala存在下で生育可能な相補クローンを選択することによってL–Ala排出輸送体をコードする遺伝子を取得した。
【結果】L-Ala排出能欠損変異株を分離するためにペプチドフィーディング法を用いた場合、ピルビン酸からのL-Ala生成反応とL-Ala/D-Ala間のラセミ化反応のために、培地に添加したAla-Ala由来のL-Alaが細胞内に蓄積しない可能性が懸念された。そこで、我々が最近同定したL-Ala合成に関与する３つのアミノトランスフェラーゼ遺伝子(*yfbQ*, *yfdZ*, *avtA*)と、２つのアラニンラセマーゼ遺伝子(*alr*, *dadX*)を破壊したL-Ala/D-Ala要求変異株を作製し、この変異株をNTG処理してAla-AlaおよびD-Ala添加最少培地で生育できない変異株を分離した。この変異株は、Ala-Ala存在下で細胞内に著量のL-Alaを蓄積し、逆に細胞外L-Alaレベルは親株のそれより低下していたことからL-Ala排出能欠損変異株であることが判明した。次に、このAla-Ala添加培地での生育を相補する遺伝子を探索した結果、新規な２つの遺伝子(*ygaW*, *ytfF*)と既知の２つの遺伝子(*yeaS*, *yddG*)が得られた。これらの相補遺伝子を導入したL-Ala排出能欠損変異株のAla-Ala存在下での細胞内L-Alaレベルを調べた結果、*ygaW*遺伝子を導入した形質転換体の細胞内L-Alaレベルが最も低下しており、YgaWが大腸菌の主要なL-Ala排出輸送体であると考えられた。

exporter, L-alanine, *Escherichia coli*

講演番号：4SY03-3
講演日時、会場：3月25日14:30～ A校舎32会場

産業微生物由来アスパラギン酸：アラニン交換輸送体(AAEx)ファミリーの構造・機能と産業応用

Structure, function and application of Aspartate: Alanine Exchanger (AAEx) family transporters from industrial microorganisms

○七谷 圭[1]、福井 啓太[2]、阿部 敬悦[3,4]（[1]東北大院工・バイオ、[2]味の素ライフサイエンス研、[3]東北大院農・生物産業創成、[4]東北大・未来研）

○KEI NANATANI[1], KEITA FUKUI[2], KEIETSU ABE[3,4] ([1]Dept. of Biomol. Eng., Grad. Sch. of Eng., Tohoku Univ., [2]Ferm. & Biotech. Lab., Ajinomoto Co., Inc, [3]Dept. of Molecul. and Cell Biol., Grad. Sch. of Agri., Tohoku Univ., [4]Microbial Genomics Lab., NICHe, Tohoku Univ.)

【目的】醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* から単離されたアスパラギン酸：アラニン交換輸送体（AspT）は，菌体外のアスパラギン酸を取り込み，アスパラギン酸の脱炭酸反応によって生じたアラニンを菌体外に排出する．アスパラギン酸/アラニン交換とアスパラギン酸の脱炭酸により，細胞内のアルカリ化と細胞膜を介して細胞内負（細胞外正）の膜電位の形成が起こり，形成された proton motive force（pmf）を細胞膜に存在する F_1Fo-ATPase が ATP に変換することでエネルギーが生成する[(1,2)]．AspT は，Aspartate:Alanine Exchanger (AAEx) Family (TC# 2.A.81) と呼ばれる独自のファミリーを形成している．近年，*Corynebacterium glutamicum* の AAEx ファミリーに属する輸送体（SucE1）が，コハク酸発酵においてコハク酸の排出を担うことが明らかにされ，AAEx ファミリー輸送体の基質はアスパラギン酸やアラニンに留まらないことが分かってきた．本シンポジウムでは，AspT の構造[(3, 4)]と基質認識[(5)]に関わる最近の研究と SucE1 機能に関する研究[(6)]を紹介し，AAEx ファミリーに属する輸送体の基質の多様性と産業応用へ向けた可能性を展望する．

【方法】AspT および SucE1 を *Escherichia coli*, *C. glutamicum* を用いて発現させる系を構築した。形質転換体を培養，破砕した後，超遠心分離によって膜画分を分離し，界面活性剤に *n*-dodecyl-β-D-maltoside (DDM) を用いて膜たんぱく質を可溶化した．アフィニティーカラムを用いて AspT-$(His)_6$, SucE1-$(His)_6$ の精製を行った．次に，*E. coli* 由来リン脂質を用いて，精製タンパク質をリポソームに再構成し，プロテオリポソームを作製した．プロテオリポソーム内への基質の取り込みを調べ，AspT および SucE1 の機能と反応動力学的な解析を行った．

【結果・考察】 AspT の基質候補化合物を用いた輸送阻害解析により，システイン，セリンを初めとする幅広い化合物が AspT の基質となることが示唆された．また，基質化合物の構造比較から，AspT の基質となるには炭素骨格数が 3 から 5 で，α 位もしくは β 位にアミノ基を有することが必要であることが示唆された[(5)]．また，SucE1 は，コハク酸に対して非常に高い Km 値を持つことから，SucE1 がコハク酸の排出輸送体であることに起因すると推定された[(6)]．

【参考文献】1) Abe K. *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.*, 2) Abe K. *et al.* (2002) *J. Bacteriol.*, 3) Nanatani *et al.* (2007) *J. Bacteriol.*, 4) Nanatani *et al.* (2009) *J. Bacteriol.*, 5) Sasahara A. *et al.* (2011) *J. Biol. Chem.*, 6) Fukui. K. *et al.* (2011) *J. Biotechnol.*

industrial microorganism, transporter, liposome

講演番号：4SY03-4
講演日時、会場：3月25日15:00～ A校舎32会場

コリネ型細菌における糖取り込み機構PTSの遺伝子発現制御

Regulation of PTS gene expression in *Corynebacterium glutamicum*.

○田中裕也、乾　将行、湯川英明（RITE）
○Yuya Tanaka, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa (RITE)

*Corynebacterium glutamicum*は、長年アミノ酸などの生産に利用されてきた有用工業微生物である。我々は、代謝改変した*C. glutamicum*によるバイオマスからのバイオ燃料、有用化学品生産の研究開発に取り組んでいる。ホスホエノールピルビン酸-糖リン酸基転移機構(PTS)は、多くの微生物と同様、*C. glutamicum*においてもグルコースなどの糖の主要取り込み経路である。我々は効率的な有用物質生産のための糖利用最適化を目的として、糖取り込み系の発現制御、特に*pts*遺伝子の発現制御機構の解明に取り組んでいる。

大腸菌、枯草菌における*pts*遺伝子の発現はグルコースが最も誘導効率が高いのに対して、*C. glutamicum*ではフルクトースによりほぼ全ての*pts*遺伝子発現が最も上昇した。フルクトースによって*pts*の転写を包括的に制御する因子の存在が想定されたため、プロモーターDNAアフィニティ精製を行い転写因子SugRを見いだした。*sugR*遺伝子破壊株では*pts*遺伝子は恒常的に発現した。さらに精製SugRが*pts*遺伝子プロモーター領域に結合し、その結合はフルクトース-１リン酸などの糖リン酸により阻害された。以上の結果から、フルクトース、グルコースによる*pts*遺伝子の発現誘導は、SugRによる抑制が糖リン酸蓄積により解除されるためと示された。その後のマイクロアレイ解析から、SugRは*pts*を含め20以上の代謝経路遺伝子発現を制御するグローバル転写因子であることが明らかとなった。

C. glutamicum R株は、他の*C. glutamicum* が持たないβ-グルコシド利用能を有する。β-グルコシド利用能は２つの*bgl*遺伝子、*bgl*-PTS1、*bgl*-PTS2に由来し、さらにポイントミューテーション導入によりバイオマス利用に有利なセロビオース利用も可能となる。この2つの*bgl*-PTS遺伝子の発現はβ-グルコシドにより誘導されるが、*sugR*遺伝子破壊株でも発現が上昇しないことより、別の転写制御機構の存在が考えらえた。*bgl*-PTS遺伝子の下流には転写アンチターミネーター*bglG*遺伝子が存在する。そこで*bglG*遺伝子を破壊したところ、β-グルコシドによる発現誘導が見られなくなった。この結果は、*bgl*-PTS遺伝子の発現が転写アンチターミネーションによって行われていることを示している。

2つの*bgl*-PTS遺伝子発現を比較すると、β-グルコシドとグルコースが共存する条件で*bgl*-PTS1遺伝子は強いグルコース抑制を受けるのに対して、*bgl*-PTS2遺伝子はグルコース抑制が弱かった。*bglG*翻訳開始コドンの違いに注目し、*bglG1*、*bglG2*遺伝子の翻訳開始コドンを入れ替えると、グルコース抑制効果も入れ替わった。以上の結果よりグルコース抑制効果の違いは、*bglG1*、*bglG2*遺伝子の翻訳効率の違いに由来することを示した。また*bgl*-PTS2プロモーターは、グルコース存在下でのβ-グルコシド誘導プロモーターとして有用物質生産に応用可能である。本発表では、その他の転写因子を含めた*pts*遺伝子群の発現制御メカニズムの概要を紹介する。

Keyword C. glutamicum, PTS, transcriptional regulation

講演番号：4SY03-5
講演日時、会場：3月25日15:30～ A校舎32会場

コリネ型アミノ酸生産菌がもつ潜在的なグルコース輸送バイパス

PTS-independent glucose uptake route in *C. glutamicum*

○ 池田 正人（信州大農・応生科）
○ Masato IKEDA (Shinshu Univ.)

Corynebacterium glutamicum（以下、コリネ菌）ではPTS以外のグルコース輸送系は知られていない。従って、同菌を用いるアミノ酸発酵はPTSに依存してきたといっても過言ではない。しかし、ごく最近、我々は本菌種には潜在的にPTSとは別のグルコース輸送系が、しかも複数存在することを見出した。このいわゆるグルコース輸送バイパスは、発酵生産菌としてのコリネ菌の潜在力を引き出すターゲットとなりうる。本シポジウムでは、現在までに特定できた同バイパス輸送体について、その実体、ならびにPTSに代えて同バイパスを発現する菌株の育種技術と同育種の意義について述べる。

本研究のきっかけは、ある目的で造成していたPTSの破壊株からグルコース寒天培地で生育するサプレッサー株が低頻度ながら出現する現象に出くわしたことである。その代表株SPH2はグルコースでは生育するものの、フクルトースやスクロースでは生育しないことや、コリネ菌が感受性を示す2-デオキシグルコースに耐性を示すことから、グルコースに基質特異性を持ち、かつ2-デオキシグルコースに耐性のバイパス輸送系がコリネ菌に潜んでいることが示唆された。

大腸菌では*galP* にコードされるガラクトースパーミアーゼがグルコースを取り込むことが知られている。コリネ菌には同輸送体は存在しないが、ホモログ検索で、2種の候補遺伝子*iolT1* および*iolT2* が見出された。ともにイノシトール輸送体遺伝子である。両遺伝子を各々、PTS破壊株内で構成発現させると、いずれもグルコースを代謝して生育できるようになったことから、両遺伝子産物ともグルコースの取り込み活性を有していることが検証された。さらに、遺伝子破壊実験で、前述のサプレッサー株SPH2のグルコース取り込みが*iolT1* に担われていることも明らかになった。

では、SPH2株で*iolT1* を発現させるサプレッサー変異は何であろうか。SPH2株のトランスクリプトーム解析で、*iolT1* のみならず、*iol* 遺伝子クラスター内の多くの遺伝子が高発現していることがわかった。*iol* 遺伝子群の発現を調節している何らかのレギュレーターの変異と推定されたので、同クラスター領域に存在する3つのレギュレーター様遺伝子をシーケンスしたところ、その内の１つCgl0157遺伝子に１塩基の欠失変異を見出した。同変異をPTS破壊株に導入すると確かにグルコース培地で生育するようになり、さらに*iolT1* を破壊すると再び生育能は失われた。

以上を踏まえれば、PTSとCgl0157の2つの機能を破壊すれば、PTSに代えてバイパスルートを発現するコリネ菌を育種できる。この方法をリジン生産菌に適用してバイパスでグルコースを代謝するリジン生産菌を育種した。このバイパス発現株はPTS株より発酵がやや遅延するもののリジン発酵収率は有意に向上し、物質生産におけるバイパス利用の有用性が示唆された。

Corynebacterium glutamicum, glucose uptake bypass, phosphotransferase system

講演番号：4SY03-6
講演日時、会場：3月25日16:00～ A校舎32会場

*Corynebacterium glutamicum*のグルタミン酸排出チャネルの発見とその有用物質生産へのインパクト

Discovery of the exporter of L-glutamic acid in *Corynebacterium glutamicum* and its impact on designing cell factories for producing valuable chemicals

○川崎　寿、和地 正明[1]（東電大院・工・物質工、[1]東工大院・生命理工・生物プロセス）
○Hisashi Kawasaki, Masaaki Wachi[1] (Tokyo Denki University, [1]Tokyo Institute of Technology)

有用物質を効率的に生産する微生物の設計・構築において、これまでの取り組みの中心は細胞内の代謝改変であった。しかしながら、近年、基質の細胞内への取り込みや生合成産物の細胞外への排出に対する重要性の認識が高まってきている。さらに、遺伝子探索や解析技術の向上により、これらの解析が可能になり、有用物質生産微生物育種への活用も始まっている。

グルタミン酸生産に用いられている微生物である *Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸の細胞外への排出機構も長い間不明であった。2007 年に *C. glutamicum* の NCgl1221 遺伝子の変異がグルタミン酸生産を誘導することが報告された。NCgl1221 遺伝子破壊株はグルタミン酸生産誘導条件においてもグルタミン酸をほとんど生産しないこと、NCgl1221 遺伝子産物は膜張力依存性チャネルと高い相同性を有することなどから、NCgl1221 遺伝子産物はグルタミン酸の排出担体である可能性が考えられた。しかしながら、その機能は解析の困難さから明らかとなっていなかった。

我々は、微生物の輸送系を解析する方法として、電気生理学の手法（パッチクランプ法）を微生物細胞に適用するシステムの開発に取り組んできた。パッチクランプ法は膜を横切るイオンの輸送を電流として測定する方法で、リアルタイム性、定量性が高く、膜内外の電位差や物質組成、膜張力などを変化させることが可能な優れた輸送系解析法である。しかし、微生物への適用は非常に限られていた。

我々はこのシステムを用いて、NCgl1221 遺伝子産物が膜張力依存性チャネル活性を有すること、さらにグルタミン酸が NCgl1221 遺伝子産物を介してエネルギー非依存的に生体膜を通過することを明らかにした。

NCgl1221 遺伝子産物は大腸菌などが有するホモログに比べ C 末側に長い機能未知のドメインを持つことから、この C 末ドメインがグルタミン酸排出に関与するか解析を行った。C 末ドメインを様々な長さで欠失させた NCgl1221 変異体を構築し、*C. glutamicum* の野生株、NCgl1221 欠損株で発現させ、グルタミン酸生産能の変化を調べた。C 末ドメインを大腸菌のホモログと相同な長さまで欠失させた変異体が、NCgl1221 欠損株のグルタミン酸生産能を回復させたことから、C 末ドメインはグルタミン酸排出に必須ではないことが判明した。

また、*C. glutamicum*のグルタミン酸生産を誘導する変異型NCgl1221を大腸菌野生型株にて発現させると、少量ではあるもののグルタミン酸の生産が観察された。このことは合成生物学の視点からも有用物質生産の観点からも非常に興味深い。

Corynebacterium glutamicum, channel, export

講演番号：4SY04-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ A校舎04会場

プラスミド R64 の接合伝達開始起点における DNA 伝達開始・終結機構

The mechanism of initiation and termination of DNA transfer in conjugative plasmid R64.

○古屋 伸久（首都大・生命）
○Nobuhisa Furuya (Tokyo Metropolitan Univ.)

細菌のプラスミドの多くは、接合によりプラスミド保有菌から非保有菌へ伝達することによって自己の集団を拡大させるとともに、多くは種の壁を超えて宿主を広げてゆき、遺伝子の水平伝播に多大な影響をもたらしていると考えられる。

演者らは、腸内細菌群を宿主とする不和合成群 I1 のプラスミドである R64 の接合伝達遺伝子群を通じて、接合における DNA 伝達開始・終結の機構を解析してきた。R64 や ColIb をはじめとする IncI 型プラスミドは部位特異的組替えによって線毛のタイプを変換し、液体培地中での接合における相手方の受容菌接着の特異性を多様化するユニークな機構を持ち、接合伝達遺伝子群について詳細な研究が成されてきている。DNA 伝達に関わる tra 遺伝子群はレジオネラ菌の病原性に関わるエフェクター分子の分泌に必要なIV型分泌系遺伝子群との相同性を示している。DNA 伝達に cis に必要な伝達開始点 oriT は、約 54 kbの接合伝達領域の一端に存在し、100 bp 足らずの領域に oriT として機能する配列情報が含まれている。多くのプラスミドや conjugative transposon の接合伝達の際には、それぞれが持つ tra に特異的ニックが導入され、ローリングサークル型の複製を伴った一本鎖 DNA の伝達が起こるとされている。R64 の oriT として同定された配列は、その近傍にコードされるリラクセース/ニッケースタンパク NikB と DNA 結合タンパク NikA が oriT において開始複合体リラクソソームを形成すると考えられた。

oriT は、ＤＮＡ伝達の開始点であると同時に終結が起こる終結点でもある。開始と終結に必要な情報を区別するために、ベクタープラスミド上に２個の oriT を順向きに挿入し、R64 との細胞内共存による接合実験を行い、それぞれの機能に必要な領域を調べた。その結果、開始に必要な領域は、ニック導入部位とその 8 bp 上流の NikA 結合配列を含む 40 bp 弱であるのに対し、終結には、ニック部位を含む *oriT* 領域ほぼ全域が必要であったが、NikA 結合配列の存在は必要で無かった。ニック部位の上流には NikA 結合配列とオーバーラップする 17 bp の逆向き反復配列が存在し、さらにその下流には 8 bp の逆向き反復配列が位置する。NikA の結合配列は 17 bp 配列のニック部位側にあるのに対して、もう一方の 17 bp 配列は１塩基置換があり NikA の結合能が無い。従って、NikA のターゲット配列への結合は、DNA 伝達の開始に必要である一方で、伝達の終結時には必要でないと考えられた。接合時に起こるローリングサークル型の DNA 伝達において、終結時点での上流領域は伝達の最後尾にあたり、二本鎖 DNA の解離によって逆向き反復配列による一本鎖ヘアピンループ構造の形成が起こると考えられる。この構造が NikB リラクセースにより認識され、ニック部位で切断された伝達鎖 DNA の再結合が促進されることが強く示唆される。

plasmid, conjugation, *oriT*

講演番号：4SY04-2
講演日時、会場：3月25日13:55～ A校舎04会場

細菌の接合機構による真核生物の形質転換

Transformation of eukaryotes by bacterial conjugation systems

○鈴木克周、守口和基、山本真司、清川一矢、田中克幸（広島大院・理）
○SUZUKI Katsunori, MORIGUCHI Kazuki, YAMAMOTO Shinji, KIYOKAWA Kazuya, TANAKA Katsuyuki (Hiroshima University)

アグロバクテリアが植物を形質転換する現象は細菌が真核生物を形質転換し植民地化する興味深い現象である。この現象の仕組みを利用した形質転換手法は植物の形質転換に広く活用されているだけでなく、真菌類への適用例が多い。アグロバクテリアの T-DNA 伝達を直接的に担っている *vir* 遺伝子群はグラム陰性細菌の接合系から生まれたと考えられている。細菌間の接合伝達系は多数知られているが、この能力を利用した真核生物の形質転換実験例は僅かである。大腸菌から酵母菌数種、大腸菌から動物細胞等の事例が報告されている他に、最近、猫引掻き病菌のエフェクタータンパク質輸送遺伝子を用いてヒト細胞の形質転換が行われた。輸送される DNA の形態は T-DNA 伝達が RB から LB までであるのに対して、接合系による伝達ではプラスミド全体が輸送される。植物細胞に輸送された T-DNA は同時にアグロバクテリアから輸送された複数のタンパク質によって効率的に核に入り染色体に組み込まれるが、接合系によるプラスミド伝達では検討を要する。豊富な細菌種と接合伝達系を資源と考え、輸送される DNA の形態や細菌毎の特徴を生かした活用を期待できる。本講演では、事例を概観すると共に、我々が行っている大腸菌ならびにアグロバクテリアによる形質転換について紹介する。また、自然界で生じることが明確になっている細菌による真核生物の形質転換は現在のところアグロバクテリアによるもののみであるが、より広く生じている可能性について考察したい。

Trans-kingdom conjugal DNA transfer, Bacteria, Eukarya

講演番号：4SY04-3
講演日時、会場：3月25日14:20～ A校舎04会場

枯草菌の接合伝達プラスミドと接合伝達様式の特異性

Conjugation system dependent on pLS20 in *Bacillus subtilis* strains.

○金子 真也[1]、板谷 光泰[2]（[1]東工大・生命理工、[2]慶應大・先端生命研）

○Shinya KANEKO[1], Mitsuhiro ITAYA[2], ([1]Dept. Life Sci., Tokyo Tech., [2]Inst. Adv. Biosci. Keio Univ)

枯草菌の接合伝達に関わるプラスミドとして、納豆菌由来の pLS20 が単離されている(1)。65kb のサイズを持つこのプラスミドはタイプ IV の接合伝達能を有し、自身の接合伝達だけでなく、*mob* 遺伝子と *oriT* 配列を有する他の小型プラスミド(*Staphylococcus* 由来の pUB110 や納豆菌由来の pLS30)の接合伝達にも関与することが明らかとなっている(2-4)。

我々は pLS20 に抗生物質マーカーを組み込んだ pLS20*cat* を構築し、枯草菌 168*trpC2* 株由来の菌株間における pLS20*cat* 依存の接合伝達能を詳細に解析した(3-5)。レシピエントとなる枯草菌株はゲノム中に別の抗生物質マーカーが組み込まれており、これらの抗生物質耐性で選択することで接合伝達効率をモニターすることができる。その結果、pLS20*cat* 依存性の接合伝達効率はドナー株とレシピエント株双方の growth 状況に大きく依存し、また制限修飾酵素による影響を受けていることが確認された(3,5)。pLS20*cat* 存在下における pLS30 や pUB110 の接合伝達効率も同様で、ドナー株とレシピエント株の growth が対数増殖初期において最も効率が良いことが示された(4)。

本講演において、こうしたステージ特異的な枯草菌の接合伝達様式について紹介するとともに、接合伝達を含めた菌株間の DNA の移行システムをツールとして利用し(6)、ゲノム合成技術へ向けた応用についての展望を議論したい。

(1) Tanaka T. et al., *J. Bacteriol.* 1977, Vol.131, p.699-701.
(2) Koehler T. et al., *J. Bacteriol.* 1987, Vol.169, p.5271-5278.
(3) Itaya M. et al., *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006, Vol.70, p.740-742.
(4) Sakaya N. et al., *J.Biochem.* 2006, Vol.139, p.557-561.
(5) Ohtani N. et al., *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008,Vol.72, p.2472-2475.
(6) Kuroki A. et al., *Gene* 2007, Vol.399, p.72-80.

Bacillus subtilis, Conjugational transfer, pLS20

講演番号：4SY04-4
講演日時、会場：3月25日14:45～ A校舎04会場

放線菌における接合伝達のしくみと合成生物学への応用可能性

The mechanism of *Streptomyces* conjugal transfer and the capability to apply the synthetic biology

○片岡正和（信州大・工）
○Masakazu Kataoka (Shinshu Univ)

性を持たない原核生物は遺伝子水平移動によって遺伝的多様性を増加させる。遺伝子水平移動を司る機構はDNA取り込みによる自然形質転換、バクテリオファージによる形質導入、性プラスミドによる接合伝達が一般的に知られている。これらの中で接合伝達機構は可動化できるDNA領域の大きさが最も大きく、細菌の進化への貢献は大きい。

演者等は抗生物質生産などの二次代謝産物を多く生産する放線菌の接合伝達機構について研究してきた。放線菌に一般的に見られる小型環状プラスミドの接合機構について我々の*Streptomyces nigrifaciens*由来のpSN22を用いた解析、Stanford大学やJohn Innes研のグループによるpIJ101の解析、パリ大学のpSAM2の解析等で得られた知見を統合すると以下の特徴が一般的な知見となる。①放線菌の接合伝達は大腸菌のF因子やAgrobacteriumのTi plasmidのシステムとは異なり、基本的に一つの遺伝子(*traB*)が支配する。②*traB*にコードされているTraBタンパク質はDNAチャネルとして機能し、ssDNAが輸送される他の接合システムとは異なり、dsDNAを輸送する。③プラスミドに輸送に伴いゲノムが輸送され、このゲノム輸送はF因子におけるHfrのようなゲノムへの組み込み段階は必要とされない。④*clt*(*cis*-acting locus of transfer)と呼ばれるプラスミド上のシス因子が必要だが、この遺伝子座は他の接合システムのoriTとは異なりnicking部位ではない。また放線菌は線状ゲノムを持ち、線状プラスミドも存在する。線状プラスミドの中には接合伝達する分子種が存在するが、その分子メカニズムは環状プラスミドの場合と異なってほとんどわかっていない。本シンポジウムではpSN22のシステムを中心にした環状プラスミドの伝達機構について最新の知見を紹介すると共に、接合伝達可能な線状プラスミドである*S. avermitilis*由来のSAP1をモデル分子として線状プラスミドの接合伝達についての知見を交えたい。

また、放線菌は産業微生物として現実に利用されていることから暗示される代謝系のロバスト性の高さが特徴であり、大規模なゲノム操作を伴う合成生物学的手法、すなわちゲノムデザインによる産業用人工微生物の創成を考えた場合に良い宿主になる。本シンポジウムでは演者等が新学術領域でもある生合成マシナリー領域で開発しようとしている、接合伝達機構を利用した放線菌大型DNAの操作方法の開発についても紹介する。

Streptomyces, conjugative transfer, genome design

講演番号:4SY04-5
講演日時、会場:3月25日15:10～ A校舎04会場

バクテリア接合伝達のゲノム操作への可能性

Perspective for genome technology by conjugation.

○森　浩禎（奈良先端大・バイオ）
○Hirotada Mori(Nara Inst. Sci & Tech)

我々は、大腸菌を用いて、網羅的な単一欠失株ライブラリーを2種類構築し、接合により2重欠失化を効率良く作製する系の構築を行った。現在、その系を用いて、網羅的遺伝的ネットワーク解析を進めている。F plasmidのtra遺伝子群及びoriTを持たせたplasmidを構築し、そのplasmidを欠失株の染色体に挿入させることで、Hfr化を行う。挿入されたoriTから、受容菌として別の薬剤耐性を持つ欠失株ライブラリーに対して接合で供与菌側の欠失を移し相同組換えにより2重欠失化を行う。接合で移動させるDNAのサイズは、移動開始点から全ゲノムの半分の位置に存在する遺伝子欠失を実用的なレベルで受容菌側に移すことが可能である。この方法で、育種を難しくしているロバスト性の機構等、細胞内機能ネットワーク解明を進めている。さらに接合によるplasmid DNA移動の系の開発も進めており、全欠失株約4,000株に対して、一度に寒天培地上で形質転換を行うことも可能である。この系を見直し、宿主域の広いIncP系のplasmidを利用することで、大腸菌間のみならず、広く種を超えた接合による系の開発を行っている。IncP系のRP4 plasmidが染色体に挿入されている大腸菌S17-1を利用した系は広く活用されてきているが、Muファージが挿入されているなど問題点も多い。Muファージの完全欠失を行う等、この系の最適化を図りながら、巨大DNAの接合による操作技術の開発の現状と展望を議論したい。

Escherichia coli, conjugation, RP4

講演番号：4SY04-6
講演日時、会場：3月25日15:35～ A校舎04会場

プラスミドの接合伝達が宿主細胞機能へ及ぼすインパクト

Impact of the plasmid conjugal transfer for host cell function

○野尻 秀昭（東大・生物生産工学研究センター）
○Hideaki Nojiri (The University of Tokyo)

“プラスミドが宿主細胞機能をどう変えるのか”という観点から考えると、従前の研究では、プラスミド由来酵素に依存する形質を宿主に単に**付加する**ことをプラスミド機能として盲目的に捉えられるケースが多かったように感じる。このような**機能付加因子としての役割**は、プラスミドの機能を適切に表しているだろうか？また、プラスミドの保持は宿主細胞のfitness costを上昇させ、集団内での生残性を低下させる場合が多い。これは、プラスミドを保持すること（言い換えれば、細胞内DNA量・遺伝子数が増加すること）で、転写量・翻訳量が増加したことが原因であると単純に信じる人が多い。このようなメカニズムだけで、機能付加以外の全てのイベントを説明できるのであろうか？

最近、プラスミド由来の因子が染色体の転写制御ネットワークを直接的に制御し、宿主の機能やfitness costに大きな影響を与えることが報告され、**プラスミドと宿主（染色体）相互で制御し合う実体**の解明が進みつつある(1-3)。このような状況は、宿主にプラスミドが与える影響（言い換えれば、プラスミドを保持した宿主が示す形質）は予想以上に複雑な過程を経て決定されることを示している。すなわち、“病原性プラスミドや分解プラスミドを保持する細菌が、自動的に病原菌や分解菌となる”という印象は必ずしも正しくなく、プラスミド由来の**“付加される形質（直接的な形質の付与）”**と**“プラスミド保持に端を発した間接的な宿主染色体の反応”**に加え、プラスミドによる**“染色体機能の直接的な調節”**の和として宿主の表現型が決定されると考えられる。しかし、このようなメカニズムの寄与も、house-keeping遺伝子等の種々宿主で保存性が高い遺伝子とstrain特異的な遺伝子で傾向が異なり、さらに、各種のプラスミド・宿主で様々な組み合わせがあり得るため、全てに共通のメカニズムを見通すには大きな困難が伴う。

本講演では、演者らが分解プラスミドpCAR1と数種の宿主*Pseudomonas*属細菌をモデルに用いて、pCAR1保持が各宿主の転写ネットワークや形質をどう変化させるのかを調べた結果から、プラスミドが宿主に及ぼす影響とそのメカニズムを整理したい。それに基づいて、プラスミドの**“宿主機能調節因子”**としての働きを考察したい。このような認識は、接合伝達性プラスミドは環境中でどのように宿主機能を多様化させ、結果として細菌の進化（その場の環境要因・生物学的要因に最適な個体が、多様化した集団内から選択され生き残る現象）にどの様に関与するのかを正確に理解することに資するのではないだろうか。

1. Doyle *et al.*, *Science*, **315**, 251-252 (2007).
2. Shintani *et al.*, *Environ. Microbiol.*, **12**, 1413-1426 (2010).
3. Yun *et al.*, *J. Bacteriol.*, **192**, 4720-4731 (2010).

plasmid, host, conjugation

講演番号：4SY04-7
講演日時、会場：3月25日16:00～ A校舎04会場

環境汚染物質分解能を担うプラスミドの水平伝達

Horizontal transfer of plasmids involved in degradation of environmental pollutants

○津田 雅孝、永田 裕二、大坪 嘉行（東北大・院生命科学）
○Masataka Tsuda, Yuji Nagata, Yoshiyuki Ohtsubo (Tohoku Univ.)

環境汚染物質を完全分解して炭素・エネルギー源にできる環境細菌が世界中から単離され、その微生物分解の詳細が研究されてきた。この結果、進化系統関係が遠い広範な細菌株は進化的祖先を共有する汚染物質分解酵素遺伝子群を保有する例、そして、当該遺伝子群がプラスミドやゲノミックアイランド等の可動性遺伝因子上に存在する例が多く見出されてきた。従って、種属を超えた広範な細菌株間でのこれら遺伝因子の水平伝達が、宿主細菌の汚染環境での迅速な適応・進化に大きく寄与してきたと考えられる。本講演では、環境汚染物質分解能を支配するプラスミドの水平伝達に関して我々が得てきた成果を紹介する。

Pseudomonas putida HS1 由来の IncP-7 不和合性群トルエン分解プラスミド pDK1 は特定 *Pseudomonas* 属細菌株間でのみ接合伝達能を示す。一方、本プラスミドの複製・分配装置のみを有する誘導体 mini-pDK1 は、pDK1 接合伝達の受容菌とならない多くの *Pseudomonas* 属細菌株内でも維持される。一般にプラスミドの接合伝達機能はその複製・分配機能よりも宿主域が広いことが従来の定説であったが、pDK1 では逆の知見が得られ、pDK1 接合伝達機能の受容菌宿主域決定に関わるプラスミド或いは染色体由来の因子の同定・機能解析を実施している。

別の *P. putida* 株由来 IncP-9 群ナフタレン分解プラスミド NAH7 はγ-プロテオバクテリア間で接合伝達可能である。しかし、接合伝達特異的 DNA 複製起点 *oriT* 近傍の機能未知 *traDEF* オペロンを破壊した NAH7 誘導体は、大腸菌間や *P. putida* 間での種内接合伝達頻度に顕著な差異を示さない一方で、大腸菌から *Pseudomonas* 属細菌への接合伝達は検出されなかった。そこで、*traF* 破壊 NAH7 誘導体が接合伝達可能になる *P. putida* 染色体性サプレッサー変異をスクリーニングし、この中に PTS 系の中心的リン酸基転移タンパク質遺伝子 *ptsO* の突然変異を見出した。これらの知見は、受容菌の糖源取り込み・代謝系、或いは、これに関連する現象とプラスミド接合伝達現象との機能的関連性を示唆する。また、プラスミド接合伝達宿主域に関わる受容菌側因子の同定は、供与菌が受容菌を認識する機構解明の手掛かりになろう。

自然環境に棲息する細菌群で実験室での培養が容易なのは全体の1%以下といわれ、培養が容易でない99%以上の菌由来の遺伝資源は未知といえる。我々は、汚染土壌棲息細菌集団から個々菌株を単離する過程を割愛し、「供与菌」である土壌棲息細菌集団と適当な受容菌株との接合実験により、ナフタレン分解やγ-HCH分解に関わる遺伝子を担うプラスミドを取得した。取得プラスミドの解析結果も述べる。

plasmids, conjugation, pollutants

講演番号：4SY05-1
講演日時、会場：3月25日13:35～ A校舎05会場

不均衡変異導入法を利用した新規生理活性物質探索の試み　- Cyclosporin 類縁体を例に -

Disparity mutagenesis technology as a tool for drug discovery
- Screening for Cyclosporin derivatives -

○釘宮 理恵、笠原 堅（(株) ネオ・モルガン研究所）
○Rie Kugimiya, Ken Kasahara (Neo-Morgan Laboratory Incorporated)

医薬品の種となる新規生理活性物質を得る手法として、自然界からの代謝物探索はたいへん大きな役割を果たしてきた。しかし遺伝資源は有限であり、手の届く範囲をひと通り調べてしまった後は極限環境や海外などより遠くに足を向けることとなるため、新規かつ生理活性のある化合物の発見効率は低下の一途をたどっている。当社は「不均衡変異導入法」という独自の突然変異誘発手法を利用して産業用生物の育種開発を行う会社であるが、新たなアプローチとして、薬理活性のある化合物を生産する微生物に突然変異処理をおこない、生理活性のある誘導体を生産させようという取り組みを進めている。

我々が研究対象とした、糸状菌*Tolypocladium inflatum*の生産する環状ペプチドであるCyclosporin Aは、その強い免疫抑制効果から臓器移植時の拒絶反応を抑制する医薬品として世界で使用されている。11個のアミノ酸がNon-ribosomal peptide synthase (NRPS) の11セットのモジュールによって結合された構造のため、ペプチド合成機構の変化で天文学的な数の種類の類縁体が生じる可能性のある化合物である。さらにCyclosporin類は、イムノフィリンと総称される生体内で多様かつ重要な役目を担う一群のレセプタータンパク質との結合能を持つため、立体構造の異なる類縁体では、強い免疫抑制効果を生むカルシニューリン阻害活性とは異なる新たな生理活性が引き出される可能性がある。このような理由から、我々はCyclosporin類縁体が創薬シーズとなり得ると期待している。そこで、不均衡変異導入法を用いて*T. inflatum*のランダム変異ライブラリを作成し、ここからCyclosporin Aとは異なる生理活性物質を生産する変異株を選抜するためのスクリーニングを実施した。

ここで類縁体生産株の選抜には、免疫抑制剤（カルシニューリン阻害剤）に感受性の分裂酵母its株を用いた。its株はCyclosporin A存在下では生育できないが、さらにCyclosporin Aの類縁体で免疫抑制活性のない化合物を共存させると拮抗的阻害が起こり、免疫抑制剤への感受性が緩和される。この仕組みを利用して、類縁体候補が含まれている可能性のある突然変異体の培養液をスクリーニング選抜した。その結果、突然変異体のいくつかで類縁体の生産が期待されるようなits株の挙動が認められた。現在は類縁体の構造解析と生理活性評価を進めている。

現在までの取り組みを通じて、突然変異誘発は既知代謝物の生産性を高めるためだけではなく、手持ちの遺伝資源を巨大な化合物ライブラリへと成長させるためにも活用できる有用なツールでもあると確かめられてきた。とりわけ突然変異スペクトラムの広い不均衡変異導入法は、新規生理活性物質の新たな探索源を生み出す創薬のツールとなりうるものである。

drug discovery, disparity mutagenesis technology

講演番号：4SY05-2
講演日時、会場：3月25日14:00～ A校舎05会場

酵母細胞を見て薬剤標的が分かる？

Hi-Content and Quantitative Morphological Screening for the Drug Targets in Yeast

○大矢禎一（東大・新領域）
○Yoshikazu Ohya (Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo)

我々は数年前に出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）のかたちや細胞内構造体を定量的に計測するシステム、CalMorphを開発した[1]。このシステムは、まず出芽酵母の細胞壁、DNA、アクチンを同時に染色した後で、独自に開発したプログラムにより、細胞の大きさや丸さなど501のパラメータで顕微鏡画像に基づく表現型を数値として出力するというものである。このCalMorphを使った表現型解析により、（１）非必須遺伝子破壊株約4,700株のうち約半数の株が表現型の異常を示すこと、（２）遺伝子破壊株の表現型と遺伝子の機能の間にはある種の関係があること（３）表現型と機能の間の関係を利用して遺伝子の機能予測ができること、（４）似た表現型を示す変異株のクラス分けにより遺伝子機能グループが同定できること[2]などを示すことができた。このCalMorphシステムは出芽酵母の遺伝子研究だけでなく、ビール発酵時の酵母の生育状態のモニターにも役立つことがわかった[3]。ビール酵母の生育とともに、細胞のかたちが変化していき、発酵能の低下に伴うかたちの変化も追跡することができた。一方で、酵母に薬剤を添加させたときの出芽酵母のかたちの変化を定量的に解析することにより、薬剤の標的遺伝子の同定・作用機構を解明することにも応用可能であることもわかった[4]。実際に開発したのは、統計的に有意に類似した表現型プロファイルを持つ変異株を探索する新しい統計手法である。Hydroxyurea、Concanamycin A、Lovastatin、Echinocandin Bなどの標的が既に知られている薬剤をモデルケースにして検証したところ、重複している成分やマイナーな成分である場合を除いて、薬剤の標的が実際に候補として予想された。標的の候補としてあげられた上位100株には関連する機能が欠損した変異株が濃縮されていた。これらの結果から、細胞の形態情報プロファイリングによって、形態変化を引き起こす生理活性物質の細胞標的が推定可能であることが示された。この手法は標的未知の薬剤についても応用が可能である。今回の講演では、我々が行ってきた研究を中心にして、出芽酵母の表現型プロファイリングに基づく薬剤標的の推定方法について概説する。

＜参考文献＞

1. Ohya, Y. *et al.* (2005) *PNAS* **102**：19015-20.
2. 大矢禎一 (2011) *日本醸造協会誌* **106**：630-637.
3. Okada, H. *et al.* (2010) *Genetics* **184**：1013-24.
4. Ohnuki, S. *et al.* (2010) *PLoS One* **5**：e10177.

Saccharomyces cerevisiae, drug discovery, cell morphology

講演番号：4SY05-3
講演日時、会場：3月25日14:25～ A校舎05会場

リボソームRNA遺伝子と細胞老化

Stability of ribosomal RNA gene repeat and cellular senescence

○小林 武彦[1,2]、坂 季美子[1]、ガンレイ オーステン[1,3]、井手 聖[1]（[1]国立遺伝研、[2]総研大、[3]Massey大）

○ Takehiko Kobayashi[1,2], Kimiko Saka[1], Ganley Austen[1,3], Satoru Ide[1]
([1]Natl. Inst. Of Genetics, [2]Sokendai, [3]Massey Univ.)

出芽酵母は単細胞であるにも関わらず顕著な老化現象を示す珍しい生物である。１つの細胞（母細胞と呼ぶ）は２時間に一回の速度で分裂（出芽）し１０回の分裂を経過すると「老化現象」を示しはじめる。つまり分裂速度が低下し、細胞、特に液胞、が巨大化し、不稔になる。さらに約１０回分裂すると完全に増殖を停止し３日間の短い生涯を閉じる。このように寿命を持つ出芽酵母が種を存続できるのは母細胞から生まれてくる娘細胞が「リセット」され、新たに２０回分裂する能力を回復するためである。別のいい方をすれば、母細胞は分裂の度に老化するのに対し、そこから生まれる娘は「若返り」を起こす。

この母と娘細胞の違い（分化）は、古くから研究者の関心を集め、これまでもいくつかの興味深い発見がなされた。例えば古いミトコンドリア、液胞、プラスミド（セントロメアなし）は選択的に母細胞側に残留し母細胞の老化を促進する。また酸化、変質したタンパク質のいくつかも母細胞側に残留することが知られている。つまり出芽酵母は老朽化した器官やタンパク質を母側に残すことで、常に継続して分裂可能な「若くて元気な」娘細胞を維持している。しかしここで問題となるのはゲノム DNA についてで、この遺伝子を担う物質がどのように経時による劣化を防ぎ、娘細胞に分配、維持されているのか、ほとんど研究されて来なかった。

今回我々は、ゲノム中で最も安定性が低い領域の１つであるリボソーム RNA 反復遺伝子（rDNA）に注目し、母と娘細胞の状態を比較検討した所、母細胞で不安定化した rDNA が娘で回復していることを見出した。また逆に rDNA を人為的に不安定化した株を作成し、その細胞老化に与える影響を調べたところ、寿命が約２０％短縮した。以上のことは、酵母においては rDNA の安定性が老化要因の１つとして働き、酵母の寿命を左右している可能性を示唆している。

senescence, ribosomal RNA gene, genome stability

講演番号：4SY05-4
講演日時、会場：3月25日14:50～ A校舎05会場

出芽酵母のCa^{2+}シグナルによる寿命制御

Implication of Ca^{2+} in the regulation of replicative lifespan in budding yeast

○水沼正樹、椿山諒平、久米一規、宮川都吉、平田 大 (広島大院・先端研)
○Masaki Mizunuma, Ryohei Tsubakiyama, Kazunori Kume, Tokichi Miyakawa, Dai Hirata
(Grad. Sch. of AdSM, Hiroshima Univ.)

寿命研究は、生物学的老化の仕組みを明らかにするのみならず、ヒトの老化を理解し、“健康寿命”の延長を実現するうえで極めて重要な課題である。老化過程は非常に複雑なプロセスであるが、その謎が遺伝子レベルで理解されつつある。近年、酵母、 線虫、ショウジョウバエ、マウスなどのいわゆる真核モデル生物を用いた寿命研究が活発に行われ、多くの寿命制御因子が同定され、老化の基本的な仕組みには共通点が多いことが明らかになっている[1)]。

これまでに、我々は出芽酵母を用いてCa^{2+}シグナル伝達が関わる生理機能の解析を行ってきた。特に、酵母のCa^{2+}シグナルがカルシニューリン(Ca^{2+}依存性プロテインホスファターゼ)活性化を介し、細胞周期G_2期停止及び芽の極性成長を誘導することを見出し[2)]、機構の概容を明らかにした。さらに、本制御機構に携わる機能分子を同定するため、Ca^{2+}耐性化を指標に変異株を網羅的にスクリーニングし、取得された約 500 株の変異株を遺伝学的に分類した。変異（変異株名を*scz*と呼んでいる)は、14 遺伝子座に分類され、順次解析中である。最近の解析から、*scz14* はテロメア領域と*MAT*座のサイレンシングに関わるSir3 における変異であった。またSir3 はストレス応答や寿命にも関与することも報告されている。

Ca^{2+}シグナルと寿命との機能的関連は不明な点が多いため、Ca^{2+}シグナルによる寿命制御に注目し、解析を行った。まず、Ca^{2+}の寿命に対する影響を調べた。その結果、細胞外からCa^{2+}を添加すると酵母の寿命が短くなることが分かった。また、ゴルジ体に局在するCa^{2+}トランスポーターPmr1 の破壊株では細胞内Ca^{2+}濃度が上昇し、顕著に寿命が短縮した。以上の結果から、細胞内Ca^{2+}ホメオスタシスの維持が寿命制御に重要であることが示唆された。さらに、恒常的にカルシニューリンを活性化させた株においても寿命の短縮が観察された。興味深いことに、細胞内Ca^{2+}濃度が高く寿命の短いΔ*zds1* 株においては、カルシニューリン（*CNB1*）を同時に破壊すると寿命が野生株と同程度にまで回復した。一方、*cnb1* 単独破壊株も寿命が短いことが分かった。以上の結果から、適切なカルシニューリン活性が寿命制御に極めて重要であることが分かった[3)]。本シンポジウムでは、*scz*変異株の解析から様々な生命現象が寿命制御に関わることも示唆されたので、その点にも触れたい。

[参考文献]

1) Fontana L *et al*., *Science*, 328, 321-326, 2010
2) Mizunuma *et al., Nature*, 392, 303-306, 1998
3) Tsubakiyama *et al*., *J. Biol. Chem.* 286, 28681-28687, 2011

life span, yeast, Ca^{2+}

講演番号：4SY05-5
講演日時、会場：3月25日15:15～ A校舎05会場

分裂酵母を用いた経時寿命延長因子の解析

Characterization of factors involved in chronological lifespan in fission yeast

○饗場 浩文（名古屋大・生命農学）
○Hirofumi Aiba (Nagoya Univ.)

【目的】経時寿命とは、非分裂状態の細胞が生存できる期間のことをいう。酵母では、液体培養において増殖定常期へ進入後に生存率がどれだけ維持されるかにより計測される。経時寿命に影響する因子の報告は蓄積しつつあるものの、具体的にどのような機構で経時寿命が制御されるのかに関してはまだ不明な点が多い。寿命は、多くの要因に影響され、複雑な制御下にあることが予想されるので、その理解のためには広範な寿命制御因子の探索と機能解析が重要である。

【方法】分裂酵母を用いて、経時寿命の制御に関与する因子を探索するため、(1)経時寿命が延長する変異株のスクリーニング、ならびに(2)高発現すると経時寿命を延ばす因子のスクリーニングを行った。

【結果】(1)経時寿命が延長する変異株のスクリーニングから、P型H^+-ATPaseをコードするPma1を同定した。Pma1は、細胞質膜を介したH^+の濃度勾配を形成する細胞質膜局在のATPaseで、生育に必須である。取得した寿命延長変異株では、野生株の半分程度までATPase活性が低下していた。野生株においてPma1活性を人為的に阻害すると経時寿命が延びることから、Pma1をターゲットとした寿命制御の可能性が示された。

他方、(2)高発現すると経時寿命を延ばす因子のスクリーニングから、約80アミノ酸からなる新規タンパク質を3つ同定した。これら（Ecl1, Ecl2, Ecl3）は、互いに相同性が高く、高発現すると分裂酵母の経時寿命を延長したので、Ecl1（Extender of chronological lifespan）ファミリーと名付けた。Ecl1ファミリーの機能を解明するため、その発現様式ならびに高発現した際に細胞内に生じる遺伝子発現変化を解析した。その結果、Ecl1は窒素源枯渇に、Ecl2は熱ストレスによってそれぞれ転写が誘導されることが明らかとなった。Ecl2の熱ストレスによる誘導は、熱ショック転写因子Hsf1によることもわかった。他方、マイクロアレイ解析を行ったところ、Ecl1ファミリーの高発現により、酸化ストレス耐性遺伝子ならびに、性分化（減数分裂と胞子形成）に関わる遺伝子群の発現が亢進することがわかった。さらにレスポンスレギュレーターPrr1がEcl1ファミリーによる寿命延長を仲介する重要な転写因子であることを見出した。

以上の結果をもとに、Ecl1ファミリーは分裂酵母が劣悪な生育環境に適応して、細胞寿命を維持するために獲得したシステムであるとするモデルを提唱したい。

Ohtsuka, H., Azuma, K., Kubota, S., Murakami, H., Giga-Hama, Y., Tohda, H. and Aiba, H. *Genes to Cells* 17. issue1, in press (2012)
Miwa, Y., Ohtsuka, H., Naito, C., Murakami, H. and Aiba, H. *Biosci. Biotech. Biochem.* 75. 279-283 (2011)
Ohtsuka, H., Azuma, K., Murakami, H., and Aiba, H. *Mol. Genet. Genomics* 285. 67-77 (2011)
Ito, H., Oshiro, T., Fujita, Y., Kubota, S., Naito, C., Ohtsuka, H., Murakami, H., and Aiba, H. *J. Biol. Chem.* 285. 34616-34620 (2010)

fission yeast, lifespan, Ecl1 family

講演番号：4SY05-6
講演日時、会場：3月25日15:40～ A校舎05会場

タイトル　分裂酵母のミトコンドリア機能と細胞寿命
Title　Role of mitochondrial function and life span in fission yeast

○川向　誠（島根大・生資）
○Makoto Kawamukai(Shimane Univ. Life & Env. Sci.)

酵母はミトコンドリアDNAを決失させうる酵母(petite-positive)とできない酵母(petite-negative)に分類できる。前者の代表例は出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)であり、後者の代表例は分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)である。大多数の生物ではpetite-negativeであり、ミトコンドリアの機能がその生存や寿命を大きく左右している。このことから、分裂酵母のミトコンドリア機能を理解することは、より普遍的なミトコンドリア機能を知る上において重要である。

我々はコエンザイムＱ（CoQ)の合成欠損株を、注意深く観察することにより、分裂酵母のミトコンドリア機能と寿命との関連性を強く意識しはじめた。コエンザイムＱはユビキノンとも称される脂溶性成分であり、生体内において電子伝達系の必須成分としてエネルギー生産と抗酸化に重要な機能を果たしていることから、CoQを合成できない分裂酵母ではエネルギー産生能は弱く、最小培地上での生育が著しく遅い。同時に、分裂酵母の*coq*遺伝子破壊株では、定常期での生存率が著しく低下する。(1)

一方、興味深いことに、線虫の寿命が延びるとして発見された*clk-1(coq7)*変異株はCoQ合成に必須な遺伝子の変異体である。*coq7*遺伝子はCoQ生合成経路の最後から２番目のステップの酵素をコードしており、線虫の*clk-1(coq7)*変異株はDMQ（Demethoxy-CoQ）が蓄積する。この中間物質は呼吸鎖での機能が若干残っていることから、呼吸欠損にならずに、むしろ活性酸化の発生が抑制された状態であるため、寿命が延長しているという考え方がある。(2)しかしながら、我々が分裂酵母で*coq7*破壊株を観察したところ、前駆体のDMQが蓄積するが、DMQの電子伝達系の役割を支持するような結果は得られなかった。分裂酵母の*coq7*破壊株は経時寿命が低下しており、このことは、線虫の*coq7*変異体が長寿命である結果とは対照的であり、*coq7*による影響は普遍的な生物現象でない可能性を示している。(3)

これまでに、分裂酵母のcAMP高生産株では細胞が伸張し、経時寿命は短く、逆に*pka1*破壊株では経時寿命は長いという報告結果がある。(4)cAMP-PKA経路はグルコースに依存して制御されるシグナル伝達系で、グルコースが枯渇すると経時寿命が低下する。このグルコースによってコントロールされるcAMP-PKA経路との関連も含め、ミトコンドリア機能と寿命の関連性について議論したい。

(1) Kawamukai, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **53**:217-226 (2009)
(2) Larsen *et al. Science*, **295**:120-123 (2002)
(3) Miki *et al. FEBS J.*, **275**: 5309-5324 (2008)
(4) Kawamukai *et al. Mol. Biol. Cell*, 2：155-164 (1991)

Mitochondria, life span, fission yeast

講演番号：4SY05-7
講演日時、会場：3月25日16:05～ A校舎05会場

タンパク質アセチル化による分裂酵母の代謝と寿命制御

Protein acetylation regulates metabolism and aging in fission yeast

○吉田　稔、前田和宏、松山晃久（理研基幹研）
○Minoru Yoshida, Kazuhiro Maeta, Akihisa Matsuyama (RIKEN ASI)

カロリー制限によって寿命が延長されることは、酵母から高等生物まで共通に見られる。栄養条件によって変動する NAD^+を補因子として要求するタンパク質脱アセチル化酵素である Sir2 ファミリータンパク質は、真核生物共通の寿命調節因子であることが示唆され、注目を集めている。定常期に入った分裂酵母の経時寿命（chronological life span）は、培地のグルコース濃度によって大きく変動し、高グルコースでは著しい寿命の短縮が見られる。分裂酵母には Sir2, Hst2, Hst4 の３種類が存在しているが、それらの機能の詳細と寿命調節における役割についてはよくわかっていない。そこでこれらの過剰発現と遺伝子破壊を行い、経時寿命への効果を調べた。グルコース濃度 2%の通常培地では、Sir2 および Hst2 を過剰発現すると、定常期での寿命の延長が見られたが、それぞれ単独の遺伝子破壊では寿命短縮は見られなかった。ところが、Sir2 と Hst2 の二重破壊株では著しい寿命短縮が見られた。一方、長寿命を誘導する低グルコース培地（0.2%）では二重破壊株の効果は消失したことから、Sir2 ファミリータンパク質は高カロリー条件の時にのみ寿命延長に関わると考えられた。高グルコース培地での分裂酵母の寿命調節には、Sir2 と Hst2 の共通の基質が関わっていると考えられたので、アセチル化タンパク質の解析を行い、Sir2 と Hst2 の共通の基質として eIF5A を同定した。eIF5A は定常期ではグルコース濃度に依存してアセチル化されることがわかった。eIF5A のアセチル化部位を同定し、アセチル化を受けない変異体 eIF5A-KR を作製したところ、この変異体は Sir2 と Hst2 の二重破壊株における寿命短縮を完全に相補したばかりか、高グルコース培地では野生株の寿命を延長する活性を有していることが判明した。逆にアセチル化を模倣した変異体 eIF5A-KQ では、寿命の短縮が見られた。また、Sir2 Hst2 二重破壊株では、定常期における TORC1 の活性化、ATP 生産の低下、形態異常がみられるが、eIF5A-KR はそれら全てを相補した。以上の結果から、eIF5A は Sir2 と Hst2 の共通の標的であり、そのアセチル化は TOR 経路の機能を調節することにより、グルコース濃度に応答した分裂酵母の経時寿命を制御すると考えられる。

acetylation, aging, protein synthesis

講演番号：4SY06-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ A校舎06会場

「Non-conventional yeasts から次世代微生物産業へ」

Non-conventional yeasts for the microbial industry in the next generation

○高木 正道（新潟薬科大）
○Masamichi Takagi (NUPALS)

酵母は現在までに 100 属余が報告されている。今後も植物や土壌などを分離源として新規の種が発見される可能性が高い。特にわが国は豊かな植生を有し、多様な酵母が棲息するとみられ、それらを遺伝資源として広範に活用することが期待されている。酵母の産業への利用では、従来、酒類醸造をはじめ食品産業分野において、特に *Saccharomyces* 属が主要な役割を果たしてきた。さらに *S.cerevisiae* および *Schizosaccharomyces pombe* は真核生物のモデル細胞として遺伝学、分子生物学などの研究対象として生物学に大きく貢献してきた。

一方、これら以外の酵母、いわゆる non-conventional yeasts については近年、有用形質への世界的な関心の高まりの中で、わが国においても例えば油脂生産酵母、界面活性剤生産酵母、生分解性プラスチック関連酵母など産業への利用の可能性が示され、今後「もの作り」のための新規有用形質を持つ酵母の発見が期待されている。酵母は産業利用にあたって他の真核微生物にない優れた特徴を多く備えている。世代の大部分を単細胞ですごすため他の真核生物に比べゲノム解析、遺伝子操作が容易であることから逆遺伝学的研究が可能であり、そのため改良育種しやすいなどである。さらに遺伝子組換えの宿主としても蛋白質輸送系のオルガネラが発達しており、異種蛋白質の分泌生産に適するなどの優れた特徴を備えている。現に *Kluyveromyces marxianus*、*Hansenula polymorpha*、*Pichia pastoris* のように形質転換系が確立され異種タンパク質生産の宿主として優れたものもある。また、酵母には細菌に比べウィルス汚染が少ない、細胞が比較的堅牢である、菌体を回収しやすいなど培養に際しての長所もある。さらに non-conventional yeasts においてもゲノム解析およびプロテオーム解析を機軸にした研究が進展しており、有用形質の探索とその発現機構の解明や高度利用が世界的に広がりつつある。実際今年の 9 月にヨーロッパで開催された「Non-Conventional Yeasts in the Postgenomic Era」と題した国際シンポジュウムでもこれら酵母の重要性が議論された。このような多くの長所をもつ酵母を駆使した有用物質生産によって、環境、エネルギー、医療等が抱えている課題を解決するため、基礎から応用までの幅広い研究が求められている。

これらを背景に本シンポジウムでは non-conventional yeasts の「もの作り」への利用に関するトピックスを取り上げ、分類学的な多様性、宿主としての有用性、そして有用物質生産について先進的な研究例を紹介していただく。本シンポジウムは「新産業酵母研究会」と共催である。この研究会は産業利用に大きな可能性をもつ酵母について多方面からの会員相互の情報交換と「もの作り」への展開を主目的とし、特に non-conventional yeasts への世界的な関心の高まりを背景に、微生物利用産業の次世代を築く礎になることを目指し昨年（2011 年）6 月に発足した。この若い研究会の成果が世界に向けて発信されることを期待し、このシンポジウムをその一助としたい。

non-conventional yeasts (NCY), The Meeting for Industrial NCY (MINCY), fermentation by NCY

講演番号：4SY06-2
講演日時、会場：3月25日13:50～ A校舎06会場

なぜ新たな酵母*Kluyveromyces marxianus*に魅力を感じるか―*Saccharomyces*との優劣比較―

Why the non-conventional yeast *Kluyveromyces marxianus* is so attractive -Comparison of merits and demerits with *Saccharomyces*-

○赤田 倫治（山口大・医系）
○Rinji Akada (Yamaguchi Univ Grad Sch Med)

一生のなかで酵母との出会いを意識するのは，例えばパンやお酒であったり，生物化学の解糖経路であったりするのでしょう。深く知れば知るほど，発酵の酵母，あるいは究極の細胞としての酵母の素晴らしさが理解されてきます。しかし，不思議でたまらないことが，酵母といえば*Saccharomyces cerevisiae*があたりまへだといふことです。なので，non-conventional酵母と呼ばれる酵母たちの活躍の場が少ないのが現状のようです。

Non-conventional酵母の取り上げ方は，conventional酵母にはない特殊能力を持つ点が強調されることが多いですが，*S. cerevisiae*が万能であるわけでもありません。ここでは，酵母*Kluyveromyces marxianus*と*S. cerevisiae*を正確に比較し，優劣を議論します。

*K. marxianus*は耐熱性酵母として知られており，49℃でも増殖できる能力を持ちます。*S. cerevisiae*と全く同じ種類の培養液を用いて37℃でも普段の培養を行うことができます。40℃付近で増殖ができなくなる*S. cerevisiae*と比較すると増殖速度や培養に関しては優れています。

*K. marxianus*のエタノール発酵能力は*S. cerevisiae*と比べても遜色がなく，しかも40℃での発酵が優れています。発酵条件は異なるので単純な比較はできませんが，少なくとも*S. cerevisiae*がエタノール発酵で優れているというイメージは間違っていると感じます。

次に遺伝子工学的側面では，分泌性ルシフェラーゼで比較した*K. marxianus*での外来遺伝子発現量は，*S. cerevisiae*と比較して，非常に高いことがわかりました。逆に，*S. cerevisiae*は発現量の低いホストであったと考えることができます。

さらに，*K. marxianus*ではDNA断片の末端が相同配列でなくても結合する非相同末端結合（NHEJ）が*S. cerevisiae*に比べて高頻度に行われます。*S. cerevisiae*では相同組換えが高頻度に行われるため，それが遺伝子破壊などでのメリットとして考えられてきたのですが，実はこのことがNHEJを利用する遺伝子工学的な方法の開発を遅らせた原因のように思えます。NHEJを利用すれば，PCR産物をそのまま染色体へ高頻度に導入できるメリットや酵母細胞内で２つのDNA断片を正しく融合させることもできます。つまり，conventional酵母だけを多くの人が利用することにより知識の片寄りが生まれたという考え方です。これに同意できるようであれば，non-conventionalな考え方を持っておられるといえるでしょう。特にそのような方々には，もの作りの能力をきっかけにしてnon-conventional酵母に出会ってみられることをお勧めします。そうでなくても，遺伝子工学操作におけるNHEJの利用は，その簡便さのメリットだけでなく，大腸菌プラスミドを使わないことがどれほど研究に変化を与えるかを教えてくれます。

Kluyveromyces marxianus, thermotolerant yeast, ethanol

講演番号：4SY06-3
講演日時、会場：3月25日14:20～ A校舎06会場

酵母*Lipomyces*による油脂大量生産の可能性

Possibility of lipid mass production in yeast *Lipomyces*

○長沼　孝文、正木　和夫[1]、家藤　治幸[1]（山梨大・院医工・生命、[1]酒総研）
○Takafumi Naganuma, Kazuo Masaki[1], Haruyuki Iefuji[1] (Yamanashi univ., [1]NRIB)

【目的】増え続ける世界人口は、輸入に依存する日本の燃料や食糧の供給を逼迫させる可能性が高い。また、化石燃料の使用は地球温暖化の原因となる二酸化炭素の排出を伴うばかりでなく、そのもの自体の枯渇も取りざたされている。油脂は食料やバイオディーゼル燃料として利用できるが、現状では油脂の自給率は極めて低い。油量作物の栽培面積が多くなく気候的にも適しているとはいえない我が国では自給率を上げることはそう簡単ではない。

このような背景の下、面積ではなく容積当たりとして短時間の繰り返し油脂生産が可能で、かつ気候影響を受けにくい、「発酵」による油脂生産は有効であると考え、油量作物代替としての酵母*Lipomyces*による未利用バイオマスからの油脂生産について検討をおこなっている。今回はその一環として、油脂の高効率大量生産培養および脂肪酸組成制御培養に関して述べる。

【方法】酵母*Lipomyces*を、グルコース（セルロース由来）あるいはキシロース（木糖）（ヘミセルロース由来）を炭素源とした液体培地で培養し、油脂の高効率大量生産および脂肪酸組成におよぼす培地、培養条件、菌株の影響について検討をおこなった。

【結果】組成の異なる培地における油脂生産量、生産効率を調べた。合成培地に比べて酵母エキスやペプトンを含む半合成培地は、高い糖濃度における油脂生産に適しており、特に少量の酵母エキスと無機塩から構成される培地は、使用し易い培地であった。この培地における酵母エキスの添加量および製品間の違いを調べた。いずれも影響をおよぼし、*Lipomyces*の油脂生産にとって最適濃度および適応しやすい製品があった。

培地pHを3.8にコントロールすることで、グルコース培地およびキシロース培地で油脂生成率（油脂量/消費糖量）が20%以上、油脂含量（油脂量/乾燥菌体重量）が60%以上に達した。培地溶存酸素濃度を10%にコントロールすると油脂生産速度を上げることができ、短い培養時間でも多量の油脂生産が可能になった。

バクテリアのコンタミリスク低減を図っての低pH培養でも油脂生産が可能な菌株、あるいは夏の高温下でも過度な温度制御しなくても油脂生産が可能な菌が野外分離株のなかには存在した。

グルコースとキシロースが混在する培地では、キシロースからの油脂生産が抑えられる。そこで、キシロースからの油脂生産能力が高い菌株を混植する二菌株混合培養を行った。その結果、ある特定の菌株の組み合わせでは単一菌株培養よりも油脂生産量は高い値を示した。

低温培養では不飽和脂肪酸の割合が高くなるが、生育は著しく遅延する。そこで、生育に適した培養温度から培養途中で低温にシフトダウンする方法を用いたところ、生育はそのままに不飽和脂肪酸の含有率が高い油脂を得ることができた。これらの結果から、バイオマス由来の単糖からなら、油量作物代替としての酵母*Lipomyces*による油脂生産は十分可能であることが分かった。

yeast *Lipomyces*, lipid production, medium

講演番号：4SY06-4
講演日時、会場：3月25日14:50～ A校舎06会場

とても多様な日本の酵母

Toward a comprehensive understanding for yeast diversity in Japan

○高島 昌子、大熊盛也（理研BRC-JCM）
○Masako Takashima, Moriya Ohkuma (RIKEN BRC-JCM)

2011年4月にThe Yeasts, A Taxonomic Study 第5版が発行された。本書は、1952年に出版された後、第2版（1970年）、第3版（1984年）、第4版（1998年）と改訂され、13年ぶりの大改訂後の出版で、本版から3分冊になった。収載種数も、版を重ねるに従って増加し、第5版は151属1,312種が収載された。第4版では101属、727菌種であったので、属および種ともに大幅にその数が増加した。分類体系の再構築により第4版から削除された属もあるため、実際には60属以上が第5版で増加していることになる。

特に、子嚢菌酵母は、複数の遺伝子情報を用いた多遺伝子解析(multigene sequence analysis)に基づき、新しい分類体系が構築された。*Saccharomyces*属を例に取ると、第4版では本属に14種が収載されていたが、いわゆる*Saccharomyces* sunsu latoとされていた種は別の属に移され、*Kazachstania*属、*Naumovozyma*属、および*Lachancea*属の種として記載されている。一部未整理の部分はあるものの、子嚢菌系酵母に関しては“natural relationship”を反映した分類体系ができつつあるといえるのではないかと思われる。一方、担子菌系酵母は、系統的に極めて広く担子菌門の3つの亜門に分布し、またキノコや糸状菌とも系統的に入り混じるため、形態的特徴が少ないアナモルフの分類体系は特に不備な部分が多く、再分類も進んでいないのが現状である。

我々は、平成19-21年度財団法人発酵研究所特定研究助成「我が国における微生物の多様性解析とインベントデータベースの構築 － 亜熱帯域と冷温帯域の比較から」（酵母班）において、利尻島と西表島のサンプルから、約1000株の酵母を分離、LSU rRNA遺伝子のD1/D2領域の塩基配列に基づいて簡易同定したところ、分離株中に200種以上の種が含まれ、そのうち100種以上の新種であることを明らかとなった。これはThe Yeasts第5版に収載されている種の数の14%を各々2回のサンプリングで取得したことを示しており、明らかに我が国はリソース資源国である。さらに、西表島および利尻島の両採集地から共通に分離されたのは，分離した種のわずか7%で両地域はまったく異なった多様性を有することも示された。しかし、多様な「種」の存在はいえても、その新種候補の大半を占める担子菌系酵母の分類体系が対応できていないため、当該の新種候補がどの属に帰属するかを決められず、結果として「いくつの属」あるいは「いくつの科」が分離されたかという議論ができなかった。

環境中の微生物を認識する上で、「群集構造」を共有するための方法は、環境保全やグリーンテクノロジーにまた我が国の豊かな微生物資源の利用のために重要である。分類体系の再構築はそのために必要不可欠なものであるが、その完成を待つことができない今とるべき方法は何か、それを考える立場に我々はいる。

Yeast taxonomy、diversity、population structure

講演番号：4SY06-5
講演日時、会場：3月25日15:20～ A校舎06会場

*Yarrowia lipolytica*における疎水性化合物代謝とその制御

Metabolism of hydrophobic substrates and its regulation in *Yarrowia lipolytica*

○福田　良一、太田　明徳（東大院農生科・応生工）
○Ryouichi Fukuda, Akinori Ohta (Univ. Tokyo)

*Yarrowia lipolytica*は、*n*-アルカンや油脂などの疎水性化合物の高い資化能をもつ子嚢菌酵母である。遺伝学的解析が可能で、分子学的手法が整備された本酵母は、未だ未解明な部分が多い真核微生物における疎水性炭素源の代謝とその制御を解明する上で、良いモデル生物となる。また、本酵母は、有機溶媒などに対する耐性、リパーゼやプロテアーゼなどのタンパク質や有機酸などの代謝産物の高い分泌能、米国Food and Drug Administration (FDA)によりGenerally Recognized As Safe (GRAS)に認定された安全性など、産業酵母として優れた特性を有する。本酵母における疎水性炭素源代謝と制御の解明は、本酵母の有用物質生産への活用を図る上でも重要な課題である。本講演では、*Y. lipolytica*における*n*-アルカンおよび脂肪酸の代謝とそれに関わる遺伝子の転写制御機構に関する我々の研究成果を紹介する。

*Y. lipolytica*を含むアルカン資化性酵母では、*n*-アルカンはシトクロムP450 (P450ALK) により末端が水酸化された後、脂肪酸に変換され、β-酸化により資化されると考えられているが、*n*-アルカンから脂肪酸への変換経路は未解明である。*Y. lipolytica*のゲノムには、P450ALKをコードすると予想される遺伝子が*ALK1*～*ALK12*の12種存在する。このうち*ALK1*の破壊株では炭素鎖長10の*n*-デカンの資化能が大きく損なわれ、*ALK1*および*ALK2*の二重破壊株では炭素鎖長16の*n*-ヘキサデカンの資化能に欠損が生じる。さらに12種の*ALK*遺伝子を全て破壊した12重遺伝子破壊株を作製したところ、アルカン資化能が完全に失われたことから、*ALK*遺伝子群が*n*-アルカンの代謝に必須であることが明らかとなった[(1)]。

また、*Y. lipolytica*を*n*-アルカンや脂肪酸を炭素源として培養すると、それらの資化に関わる遺伝子の発現が誘導される。*ALK1*等のアルカン代謝関連遺伝子の*n*-アルカンによる発現制御には、プロモーター上のE-boxモチーフ様配列ARE1に結合するbasic helix-loop-helix型転写活性化因子Yas1pとYas2p、さらにYas2pと結合する転写抑制因子Yas3p [(2-4)]が関与する。一方、β酸化やペルオキシソームの増殖に関わる遺伝子の脂肪酸による発現誘導にはZn_2Cys_6型転写因子Por1pが主要な役割を果たす[(5)]。本講演では、我々の研究により明らかになってきたこれら2つの疎水性炭素源による遺伝子発現制御のメカニズムについてもあわせて発表する。

Reference

1. Takai, H. *et al.* Fungal Genet Biol. in press
2. Yamagami, S. *et al.* J. Biol. Chem. 279, 22183-22189 (2004)
3. Endoh-Yamagami, S. *et al.* Eukaryot. Cell 6, 734-743 (2007)
4. Hirakawa, K. *et al.* J. Biol. Chem. 284, 7126-7137 (2009)
5. Poopanitpan, N. *et al.*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 402, 731-735 (2010)

Yarrowia lipolytica, *n*-alkane, fatty acid

講演番号：4SY06-6
講演日時、会場：3月25日15:50～ A校舎06会場

Kluyveromyces lactis のβガラクトシダーゼの開発

Development of food additive including β-galactosidase that *Kluyveromyces lactis* produces

○塩田一磨（合同酒精・酵医研）
○Kazuma Shiota (Godo Shusei)

乳は、栄養豊かで魅力的な食品であるが、含まれる乳糖のために腹痛を起こすことがあり（乳糖不耐）、摂取を控える人々も多い。そこで前もって乳糖を分解した乳を製造するために、乳糖を分解する酵素（ラクターゼ）の探索がなされ、細菌、酵母、糸状菌などから、様々な特徴を持ったラクターゼが見出されてきた。合同酒精は、酵母 *Kluyveromyces lactis* のラクターゼ（βガラクトシダーゼ、Lac4p）に着目し、生産菌の育種や製造方法改良等の検討を重ねてきた。
Kluyveromyces は、サッカロマイセス科に属し、出芽で増殖する。パン酵母とはよく似た部分も多いが、乳糖をよく分解、資化できることで特徴付けられる。*K. lactis* のβガラクトシダーゼは、ｐH6.5 付近の中性域で最適に働き、牛乳のｐH とほぼ等しいこと、乳糖をほぼ 100％分解できることなどを理由として、乳糖分解乳の製造には最も広く用いられてきた。

近年、乳糖不耐に対する用途だけでなく、乳糖を分解することで、アイスクリームや練乳等のざらつき感を抑制したり、糖類を添加することなくヨーグルトや粉乳に甘味やリッチ感を持たせたりできること等から、βガラクトシダーゼの使用量は増大を続けている。

演者らは、*K. lactis* のβガラクトシダーゼの開発について更に進展させるべく、３つのテーマを掲げて研究を行なっている。(1)クオリティアップ:海外における乳糖分解乳の製造において、原料乳に無菌的に酵素を添加し、保管・輸送中に反応を行う形式が増加している。流通中に酵素が常に働き続けることから、これまでは見過ごされていたレベルの夾雑酵素が悪影響を及ぼす。悪影響を与える酵素を同定し、除去する。(2)アプリケーション：酵素用途範囲の増大に伴い、乳糖分解程度の分析依頼や、特定条件における酵素添加量の推定等の問い合わせも増加している。酵素失活条件やオリゴ糖生成についての問い合わせも多い。(3)トータルコストダウン：これまで長期にわたり生産性の向上を指標に生産菌の育種を継続してきたが、古典的育種法による活性増加が困難になりつつある。そこで、遺伝子組み換えによる生産性増加や、これまでにクオリティを上げるために追加してきた精製工程を、その工程で除かれるものをあらかじめ生産菌に作らせないように育種することで、トータルの製造コストを抑制する。
今回は、以上の各テーマに係る検討例を紹介したい。

Kluyveromyces lactis, lactase, beta-galactosidase

講演番号：4SY06-7
講演日時、会場：3月25日16:20～ A校舎06会場

植物酵母が生み出す天然系保湿剤の開発とその利用

Development of natural moisturizer produced by plant yeast and its application

○北川　優（東洋紡・バイオケミカル事業部）
○Masaru Kitagawa (Toyobo)

【はじめに】天然系の界面活性剤のうち、微生物によって生産されるものをバイオサーファクタントと呼ぶ。バイオサーファクタントは、生分解性や安全性に優れた「環境に優しい界面活性剤」としての研究が主流であったが、ここ数年、ライフサイエンス分野へのアプローチから、既存の界面活性剤には見られない高度な分子集合能や生理作用などの特性が見出され、その研究動向は変わりつつある[1,2]。我々は独立行政法人産業技術総合研究所との共同研究により、植物酵母を用いたバイオサーファクタントの一つであるマンノシルエリスリトールリピッド（MEL-B）の発酵生産技術の開発から機能開拓まで体系的に研究を進めてきた。本シンポジウムでは、そのMEL-Bを取り上げ、多様な特性の一部を概説するとともに、天然系保湿剤への実用化に向けた検討結果について紹介する。

【MEL-Bの特性】MEL-Bは水と接触した際に、二分子膜構造を基本とするエロンゲートラメラ構造を形成し、攪拌することで巨大なベシクルとなるユニークな界面特性を示す。また、多彩な生理作用を示すが、最近ではMEL-Bがアレルギー反応に寄与するマスト細胞からの炎症性メディエーターの分泌を阻害するという興味深い報告もなされている[2]。

【天然系保湿剤としての機能】MEL-Bの機能利用に関する研究を進める中で、培養皮膚細胞や損傷毛を用いた実験からMEL-Bが非常に優れた保湿、肌荒れ改善や損傷毛改善効果を有することを見出し、新しいタイプのスキンケア、ヘアケア素材として、化粧品へ応用できることを明らかにした。またメイクアップ化粧品の中でも重要な位置を占めるファンデーション分野において、MEL-Bで表面処理した顔料を開発した。MEL-Bは粉体表面でラメラ構造を形成して吸着しているものと思われ、疎水性部位を粒子の外側に向けることにより、ファンデーションに必要な耐水性を保ち、かつ糖の親水性部位に水分子を抱き込むことにより保湿効果を示していると思われる[2]。

【最後に】近年、化粧品において安全性を重視する傾向が大きく、肌や環境に対して負荷の低いものを選びたいなどの消費者ニーズが高まっている。MEL-Bに留まらず、さらにユニークな構造を持つ多様なバイオサーファクタントを開発し、それらが化粧品のみならず、幅広い分野で用いられることに期待している。

1)福岡徳馬他，化学経済，8月号，52(2010)
2)井村知弘他，COSME TECH JAPAN，2012年1月号掲載予定

moisturizer, biosurfactant, mannosylerythritol lipid

講演番号：4SY07-1
講演日時、会場：3月25日13:35～ A校舎08会場

麹菌研究から発見したペルオキシソームの新規機能

Cellular investigation of *Koji* Mold led to the discovery of novel peroxisomal functions

○丸山 潤一（東大院農生科・応生工）
○Jun-ichi MARUYAMA (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

麹菌*Aspergillus oryzae*は古くから日本酒・醤油・味噌の製造に用いられ、その優れたタンパク質分泌能力により酵素生産や異種タンパク質生産にも利用されている。演者らは、麹菌は糸状菌であり、細長い菌糸を伸長させながら生長することに着目、GFP を用いた細胞内可視化技術を導入することで、様々なオルガネラやタンパク質の特徴的な動態を報告してきた。そのなかで、真核生物に存在するオルガネラであるペルオキシソームについて、その新規機能を発見した。

糸状菌特異的なオルガネラWoronin bodyはペルオキシソームから形成される[1,2] 麹菌の菌糸は隔壁により仕切られ、隣接する細胞は隔壁にあいた小さな穴“隔壁孔”を通じて、細胞間連絡を行っている。この細胞間連絡は、ある細胞が溶菌した際、隣接する細胞に溶菌が伝播するリスクをもたらす。演者は、麹菌を用いた酵素生産で行われる固体培養での酵素抽出過程を模倣し、寒天培地上の麹菌のコロニーに水を添加して顕微鏡で観察した（低浸透圧ショック実験）。その結果、菌糸の先端細胞が溶菌する現象を発見し、一方で、これに隣接する2番目の細胞には溶菌が伝播しなかった。演者は、糸状菌に特異的に存在するオルガネラWoronin bodyが、隔壁孔をふさぐことにより、2番目の細胞への溶菌の伝播を防ぐことを証明した。さらに、Woronin bodyを構成するタンパク質がペルオキシソーム移行配列を有することを見いだし、ペルオキシソームの分裂・増殖機能を欠損させた株で、Woronin bodyが分化できず、溶菌の伝播を防ぐ機能が低下することを示した。この結果より、ペルオキシソームがWoronin bodyの形成を介して、溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することを明らかにした。

ペルオキシソームはビオチン生合成に関与する[3] ビタミンの一種であるビオチンは、補酵素としてあらゆる生物において重要な役割を担っている。真核生物では植物、一部の菌類により生合成されるが、その生合成経路についてミトコンドリアが関与することが報告されているのみであった。当初、演者らはWoronin bodyの分化機構を解析するため、麹菌のペルオキシソーム移行配列の受容体をコードする遺伝子の破壊株を作製した。意外なことに、この遺伝子破壊株がグルコースを炭素源とした最少培地で生育できないことを発見、さらに、ビオチンを添加すると生育が回復することを突き止めた。そして、ビオチン生合成経路の酵素のひとつBioF (KAPA [7-keto-8-aminopelargonic acid] synthase)がペルオキシソーム移行配列を有することを見いだし、そのペルオキシソームへの局在を明らかにした。また、植物のBioFタンパク質についても同様にペルオキシソーム局在を示した。そして、BioFがペルオキシソームに局在することがビオチン生合成に必要であることを機能的に証明した。

以上より、演者らはペルオキシソームがビオチンの生合成に関与することを世界で初めて発見した。

1) Maruyama *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 331, 1081-1088.
2) Escaño *et al.* (2009) *Eukaryot. Cell* Vol. 8, 296-305.
3) Tanabe *et al.* (2011) *J. Biol. Chem.* Vol. 286, 30455-30461.

Aspergillus oryzae, peroxisome, biotin

講演番号：4SY07-2
講演日時、会場：3月25日14:05～ A校舎08会場

麹菌の菌糸が密集して塊を作るメカニズム
～新規の転写因子が制御することを発見

Discovery of novel transcription factors regulating sclerotium formation in *Aspergillus oryzae*

○金 鋒杰、小山 泰二（公益財団法人野田産業科学研究所）
○Feng Jie Jin, Yasuji Koyama （Noda Institute for Scientific Research）

麹菌 *Aspergillus oryzae* の形態形成に関する研究では、今までは主に分生子形成機構の解明が中心に行われてきたが、菌糸の形態、特に菌核 sclerotium と呼ばれる菌糸の塊の形成制御系の解析はあまり進んでいない。菌核は，直線的に伸長する菌糸が分岐し，お互いに絡み合って塊状になったものであり，過酷な環境において形成され，乾燥や低温に耐えることのできる構造を持つ耐久体である。有性生殖構造 cleistothecium の形態に似ていることから、菌核は子嚢胞子を生じる能力を失った cleistothecium ともいわれている。本講演では、麹菌の形態形成、特に重要な生存構造―菌核の形成に関与する新規転写因子の発見について紹介したい。

大規模領域欠失により見出された新規菌核制御転写因子の発見： 我々のこれまでの研究において麹菌の 7 番染色体の短縮化を行ったところ、高い密度で分生子を形成する欠失株が取得され、その表現型を引起す原因遺伝子(AO090011000215; *sclR*) が同定された [1)]。SclR は basic Helix-Loop-Helix (bHLH) モチーフを含む転写制御因子であると推定されている。*sclR* 破壊株では、高い密度で分生子を形成することが観察され、反対に、*amyB* プロモーターを用いた *sclR* の強制発現株では、マルツ培地上での分生子形成が抑制され、菌核と思われる菌糸の塊が多く観察された。また、これらの株を DPY 液体培地で培養し、菌体中のタンパク質生産を調べたところ、*sclR* 破壊株では親株より早く、3 日目にはタンパク質の分解と溶菌が観察された [2)]。

分生子と菌核形成の共同制御系の解明： 麹菌には 13 個の HLH ドメインを持つ転写調節因子が存在したので、その全ての遺伝子を破壊して調べたところ、*sclR* と正反対の表現型を表す遺伝子 (AO090023000902; *ecdR*) を見出した。*ecdR* の破壊株ではマルツ寒天培地においては分生子が極めて少なく、逆に非常に多数の菌核が検出されたが、*ecdR* の強制発現株では早い生育段階で高密度の分生子が形成されていることが観察された。Yeast two-hybrid アッセイを行った結果、EcdR と SclR の二つの HLH 転写因子は相互作用により heterodimer を形成している一方、それぞれが自分自身との homodimer を形成していることが確認された。これらの結果から、SclR と EcdR は dimer を形成することにより、菌株の分生子、あるいは菌核に分化するスイッチの on/off をコントロールし、分生子と菌核の形成を共同制御していることが示唆された [3)]。

1) Jin F.J. *et al.* (2009) *Appl Environ Microbiol.* 75:5943-51.
2) Jin F.J. *et al.* (2011) *Eukaryot Cell.* 10:945-55.
3) Jin F.J. *et al.* (2011) *Fungal Genet Biol.* [Epub ahead of print]

Aspergillus oryzae, sclerotium, transcription factor

講演番号：4SY07-3
講演日時、会場：3月25日14:35～ A校舎08会場

『働き者』の清酒酵母―高発酵性原因遺伝子の解析―

Identification of the genes responsible for high fermentation ability of sake yeast

○渡辺 大輔、下飯 仁（酒類研）
○Daisuke Watanabe, Hitoshi Shimoi (NRIB)

清酒酵母は、出芽酵母の菌株群の中でも清酒もろみにおける発酵性が特に高いという特徴を有する。この原因を明らかにするために、清酒もろみにおける清酒酵母と実験室酵母のトランスクリプトーム解析を行った結果、清酒酵母はストレス応答において中心的な役割を果たす転写因子Msn2/4pを介した遺伝子発現に欠損を示す一方で、細胞周期のG1/S期進行に必須な転写因子SBF/MBFを介した遺伝子発現が亢進されていることが明らかになった。

まず、清酒酵母におけるMsn2/4pの不活性化の原因を調べるために、Msn2/4pや関連因子をコードする遺伝子の配列に着目して解析したところ、*MSN4*遺伝子及びMsn2/4pの上流活性化因子である*RIM15*遺伝子のそれぞれに清酒酵母特異的な機能欠失変異が見出された。これと矛盾することなく、清酒酵母は熱ショックやエタノールストレスに対する耐性が実験室酵母と比べて実際に低いことも明らかになった。「発酵性の高い清酒酵母が実はストレスに弱い」という結果は意外であったが、実験室酵母においてこれらの遺伝子を破壊すると有意に発酵速度は向上した。したがって、Rim15p-Msn2/4pを介したストレス応答経路は発酵の阻害因子として機能しており、清酒酵母はこの経路に複数の機能欠失変異を生じたことにより高発酵性を獲得した、という新たな知見を得ることができた。

次に、転写因子SBF/MBFを介した遺伝子発現の亢進に着目し、清酒酵母のG1/S期進行について解析を行った。対数増殖期において、清酒酵母は実験室酵母よりも増殖速度が速く、G1/S期の進行が促進された*whi*変異株と共通の細胞形態学的特徴を有することも明らかになった。また定常期においても、清酒酵母はG1期停止及び休止期（またはG0期）への移行に欠損を示した。さらに、清酒酵母では発酵期間を通じてG1期サイクリン*CLN3*の有意な発現上昇が認められ、このことが清酒酵母におけるSBF/MBF活性化の原因であると結論づけられた。実験室酵母を用いた発酵試験の結果、Cln3pの発現量に応じて発酵性が変化し、SBF/MBFの構成因子である*SWI6*遺伝子の破壊によって発酵速度が低下したことから、Cln3p-SBF/MBF経路を介したG1期制御が発酵を促進することが新たに証明された。

Rim15p-Msn2/4p経路を発酵制御のための「ブレーキ」、Cln3p-SBF/MBF経路を「アクセル」と仮定すると、発酵中の清酒酵母は「ブレーキが利きにくく、アクセルがよく利く」状態にあると考えられる。清酒醸造の歴史の中で、高い発酵性を有する酵母の選抜によってこのような『働き者』の清酒酵母が生み出されたのだろうと推測される。

[1] Watanabe *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 934-941 (2011)
[2] Watanabe *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* **112**: 577-582 (2011)
[3] Urbanczyk *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* **112**: 44-48 (2011)

sake yeast, fermentation, quiescence

講演番号：4SY07-4
講演日時、会場：3月25日15:05～ A校舎08会場

醸造関連ストレスによる酵母の翻訳抑制とmRNP granules形成

Translation repression and mRNP granule-formation in yeast under stressed conditions

○井澤真吾（京都工繊大・工芸科・応生）
○Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol., Grad. School. Sci. Technol., Div. Appl. Biol.)

酒類醸造やバイオ燃料製造において出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* およびその近縁種は欠かすことのできない重要な産業微生物である。醸造過程に関連するストレスとして、酵母自身が作り出すエタノール濃度の上昇のみならず、浸透圧、酸、温度などがよく知られており、発酵効率への悪影響がしばしば問題となっている。これらのストレスに対する酵母の応答機構について理解を深めることは、醸造技術の改良を図る上で重要である。転写段階におけるストレス応答機構については、転写調節因子の研究やトランスクリプトーム解析などを通じて多くの知見がこれまでに集積している。しかし、真核生物である酵母の場合、ストレスによる転写レベルの増減が必ずしも翻訳レベルに反映されず、転写以降の mRNA の核外輸送段階や翻訳段階における制御もストレス応答機構として重要な役割を担っているはずである。

演者らは、ストレス条件下で生じる非翻訳状態の mRNA や翻訳効率の変化に着目して、その制御機構や生理的意義について酵母を用いて研究を行っている。醸造に関連するエタノールや酸、温度、糖度などのストレスが翻訳効率に与える影響をポリソーム解析によって調べたところ、それぞれのストレスで翻訳を抑制する程度には大きな違いがあることが確認された。また、非翻訳状態の mRNA が細胞質に形成する P-body や stress granule といった mRNP granules についても、ストレス種ごとで構成因子や形成様式に違いが観察された。実際の醸造過程では複数のストレスが酵母細胞に作用することから、ストレスを組み合わせて解析をおこなったところ、翻訳抑制や mRNP granules 形成に対して相乗的な影響が確認された。解析結果からは、ストレス条件下という‘‘難局’’を乗り越える上で不要不急の遺伝子はリボソームから隔離し、緊急事態への対応に必要とされる遺伝子の翻訳を最優先するという酵母の生存戦略が伺える。また、ストレスが軽減あるいは除去された場合に、P-body や stress granule に保管されている mRNA をリボソームに再輸送してただちに翻訳することが、増殖を速やかに回復するため上で必要なのではないかと考えられた。本講演では、細胞質側における mRNA flux の観点からみた醸造過程の酵母の生理について、いくつかの最新の知見を紹介したいと考えている。

P-bodies, stress granules, translation repression

講演番号：4SY07-5
講演日時、会場：3月25日15:35～ A校舎08会場

発酵呼吸転換における酵母ミトコンドリアの新機能

A novel role of yeast mitochondria during the diauxic shift

○北垣浩志（佐賀大・農）
○Hiroshi Kitagaki (Saga U)

酵母は周りの環境に応じて発酵と呼吸の間の代謝転換を行うが、そのとき生存に有利になるようにミトコンドリアの機能を感知してその転換を制御していることを明らかにした。

酵母はグルコースの多い環境で生き残るよう適応進化した生物である。酵母はグルコースが多い環境では発酵の代謝を行うが、環境からグルコースが枯渇するとその環境でも生き残るために呼吸状態に転換し(diauxic shift)、非発酵性炭素源を資化するように代謝を大きく変化させる。このとき、Adr1やCat8などの転写因子やSnf1などのシグナル伝達因子が発酵呼吸転換に重要な役割を持つことは遺伝学的な解析からわかっていたが、「ミトコンドリア活性自体」が発酵呼吸転換に役割を持つという概念自体が今まではなかった。

我々はミトコンドリアに局在する複合スフィンゴ脂質分解酵素であるIsc1の遺伝子破壊株の解析をしている中で、*isc1*遺伝子破壊株のミトコンドリア機能には異常が認められないのに、diauxic shift時の酸素呼吸に関わる遺伝子の発現誘導が遅れるという事実を見出した。この事実に対して、二つの仮説を立てた。一つ目は、Isc1の生成するセラミドが、シグナル伝達を行ってdiauxic shiftをスムーズにするのではないか。二つ目は、*isc1*遺伝子破壊株のミトコンドリア機能は一見正常に見えるが、測定では検出できない「微妙な」ミトコンドリアの機能欠損があり、それを細胞が検知してdiauxic shiftを遅らせているのではないか。一つ目の仮説は、diauxic shift中のスフィンゴ脂質分子種を調べたところ大きな変化がなかったことで蓋然性が低いと考えられた。二つ目の仮説を立証するため、呼吸欠損株を取得してミトコンドリアの活性が低くなった株を造成し、diauxic shift時の遺伝子発現を解析した。その結果、呼吸欠損株では*isc1*遺伝子破壊株と同様に酸素呼吸に関わる遺伝子の発現誘導が遅れることが明らかとなった。この結果は、ミトコンドリアの活性自体が発酵呼吸転換時の遺伝子発現を制御しており、ミトコンドリアの機能に欠損があるときは生存に有利なように呼吸に転換しないことを示している。

哺乳類の細胞も含めて、酵母などの高等真核生物は、転写因子による遺伝子発現制御やシグナル伝達など高度に複雑化したシステムを使って精緻な制御を行っているが、糖やエネルギー代謝の制御はそうしたシステムが進化により発達する前から存在していたと考えられる。従って、転写因子による遺伝子発現制御やシグナル伝達の上位概念として、物質代謝やエネルギー代謝による生理状態の制御が存在していることが考えられる。本研究で明らかにしたミトコンドリア活性による発酵呼吸転換制御は、そうした制御の一部であると考えられる。

Kitagaki et al., *J Biol Chem*, 284(16), 10818-10830 (2009).
Kitagaki et al., *Biochmica Biophysica Acta*, 1768, 2849-2861 (2007).

mitochondria, yeast, diauxic shift

講演番号：4SY08-1
講演日時、会場：3月25日13:40～ A校舎07会場

The Pup-proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*

○Kristin E. Burns, K. Heran Darwin (New York University School of Medicine)

Tuberculosis, one of the leading causes of death in the world, results from infection with *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Current therapies consist of a daily regime of multiple antibiotics over a period of several months. Side effects and problems with efficacy have resulted in the prevalence of multi-drug resistant strains of *Mtb*. New therapies that reduce treatment time and toxicity are critical to control the spread of this disease.

Mtb contains the Pup-proteasome pathway (PPS), where post-translational modification with Pup (*p*rokaryotic *u*biquitin-like *p*rotein) serves as a signal for degradation by the Mpa-proteasome complex. In this pathway, Pup is first activated by Dop (*d*eamidase *o*f *P*up) by deamidation at the carboxyl-terminal glutamine residue, converting it to glutamate. PafA (*p*roteasome *a*ccessory *f*actor *A*) catalyzes the ligation of the glutamyl side-chain of Pup to a lysine residue of a target protein, forming an iso-peptide bond. Pup-linked substrates are guided to the proteasome through Pup's association with Mpa (*m*ycobacterium *p*roteasomal *A*TPase). Mpa recognizes and unfolds pupylated proteins, delivering them to the proteasome for degradation. Dop can also function as a depupylase to reverse the Pup modification prior to degradation. Each of these five proteins appears to be required for a functional PPS in mycobacteria.

The PPS is critical for *Mtb* to cause lethal infections *in vivo* and at least three proteins in this pathway are unique to bacteria, providing ideal targets for the development of chemotherapies against *Mtb*. Our goal is to understand the mechanism of the enzymes involved in the PPS for the development of inhibitors and to identify the link between the PPS and *Mtb* survival, especially under conditions of NO (nitric oxide) stress and various host insults.

Mycobacterium tuberculosis, pupylation, proteasome

講演番号:4SY08-2
講演日時、会場:3月25日14:10～ A校舎07会場

放射線抵抗性細菌の解析とその応用

Analysis of radioresistant bacterium and its application

○鳴海 一成（原子力機構・量子ビーム）
○Issay Narumi (QuBS, JAEA)

Deinococcus radiodurans belongs to a unique family of eubacteria that are characterized by an exceptional capacity to withstand the usually lethal effects of DNA-damaging conditions such as those induced by ionizing radiation, UV light and desiccation. The most noteworthy characteristic of *D. radiodurans* is the capacity to repair DNA double-strand breaks (DSBs) induced by ionizing radiation. This bacterium can repair over 200 genomic DSBs during post-irradiation incubation, while only a few DSBs are lethal to *Escherichia coli*. The genome sequence of *D. radiodurans* had been determined in 1999. The genome analysis, however, did not clarify the radioresistance mechanisms of this bacterium.

Identifying responsible genes in radiosensitive mutants of *D. radiodurans* was carried out to discover critical genes for radioresistance. In consequence, a new gene named *pprA* (pleiotropic protein promoting DNA repair) was found out. PprA protein, product of the *pprA* gene, had no similarity to any other known proteins. Subsequent biochemical studies revealed that PprA protein interacts with DNA ends to protect the ends from DNA degradation, and thereby stimulates DNA ligase activity with high efficiency.

DNA cloning is one of the most frequently used methods in genetic engineering. DNA ligase is required to clone nucleic fragments into a DNA vector. Many biotech reagent manufacturers industrialize DNA ligase as a fundamental reagent. PprA protein combined with DNA ligase showed promising property in developing a new biotech reagent. As a result of the transfer of technology, Nippon Gene Co., Ltd., Toyama, Japan, who licensed from JAEA, released a new product “TA-Blunt Ligation Kit” in 2005. The kit is specialized in the ligation of PCR products and blunt-ended DNA fragments with which ligation was usually difficult. The inclusion of the PprA technology provides 10-fold increase in ligation efficiency compared to conventional products.

A huge amount of radioactive substances was released during the Fukushima No. 1 nuclear power plant accident, and fell out in parts of Tohoku and Kanto area. Of these radioactive substances, cesium-137 is a significant radionuclide because of its long half-life. *D. radiodurans* possesses the ability to accumulate cesium. An urgent study is ongoing in my laboratory to generate a high cesium-accumulating mutant of *D. radiodurans*. I hope this study will contribute to facilitating the secondary concentration of radioactive cesium.

radioresistant bacterium, DNA repair mechanism, technology transfer

講演番号：4SY08-3
講演日時、会場：3月25日14:40～ A校舎07会場

酵母に見出した一酸化窒素の生理的役割とその応用

The physiological role of nitric oxide found in yeast and its application

○高木 博史、西村 明、笹野 佑（奈良先端大・バイオ）
○Hiroshi Takagi, Akira Nishimura, Yu Sasano (Nara Institute of Science and Technology)

Nitric oxide (NO) is a ubiquitous signaling molecule involved in the regulation of various cellular functions. NO confers oxidative stress tolerance by enhancing cellular antioxidative activity in mammals and plants. In the unicellular eukaryote yeast, NO may be involved in stress response pathways, but its role is poorly understood due to the lack of mammalian NO synthase (NOS) orthologues in the genome. Previously, we proposed the oxidative stress-induced L-arginine synthesis and its physiological role for stress tolerance in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Our experimental results indicated that L-arginine from L-proline led to NO production catalyzed by NOS-like activity in response to elevated temperature that induce the intracellular generation of reactive oxygen species (ROS). From the uncharacterized oxidoreductase genes, we identified the *TAH18* gene encoding the essential flavoprotein Tah18, which was previously shown to transfer electrons to the Fe-S cluster protein, as the yeast NOS gene. Recombinant Tah18 showed characteristics similar to those of mammalian NOSs except for their calmodulin non-requirement. Gene knockdown analysis demonstrated that Tah18-dependent NO synthesis confers oxidative stress tolerance on yeast cells. Thus, we propose an antioxidative mechanism involving Tah18-dependent stress-induced NO production.

During bread-making processes, baker’s yeast mostly *S. cerevisiae* cells are exposed to baking-associated stresses, such as air-drying, high-sugar concentrations and freeze-thaw stresses. These stresses in common induce protein misfolding and mitochondrial damage leading to ROS generation. To develop the commercial production and fermentation process, it is necessary to construct yeast strains with higher tolerance to these stresses. We showed that engineered baker’s yeast strains with enhanced NO synthetic ability are tolerant to multiple baking-associated stresses by reducing intracellular ROS level. The increased NO level also improved the fermentation ability after air-drying and freeze-thaw stress treatment in baker’s yeast. Hence, appropriate NO production could be promising for breeding novel baker’s yeast strains that are tolerant to baking-associated stresses.

yeast, nitric oxide, stress tolerance

講演番号：4SY08-4
講演日時、会場：3月25日15:10～ A校舎07会場

酵母の環境ストレス応答機構の解析と環境リスク評価への応用

Application of yeast environmental stress response to environmental risk assessment

○岩橋　均（岐阜大・応生）
○Hitoshi Iwahashi (Gifu University)

According to the Chemical Abstract service (http://www.info.cas.org), there are more than 64 million chemicals that have been found and identified, and more than 70,000 of them are utilized in agriculture and industry. However, the spread of toxic chemicals in the environment is not well understood. Conventional environmental risk assessment is mainly based on chemical analysis to identify the source of the toxicity. With this approach, only about 10% of the chemicals can be analyzed even with the latest technology and there are still detection limits for some of these chemicals. Furthermore, the degree of toxicity to organisms may not correlate with the concentrations of chemicals, especially in complex mixtures like environmental samples. In this context, environmental risk assessment using a bioassay is necessary. The bioassay is a versatile technology, which evaluates chemical toxicity using various organisms without identifying the individual toxic substances.

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the one of the organisms living in environment and the bioassay using yeast can contribute ecotoxicology. Further, yeast is one of the most studied organisms and possesses a variety of advantageous characteristics, such as relatively short life cycle and inexpensive media requirements. The biggest advantage of yeast is the available functional information for each gene and this lead to suitable model organisms of toxicogenomics. Yeast toxicogenomics using DNA microarray analysis is a powerful tool, which is expected to compensate for some of the flaws in the classical bioassay through simultaneous expression analysis of thousands of genes. Changes in gene expression patterns indicate changes in its physiological conditions. Following the exposure of an organism or cell to chemicals or other environmental stresses, the global genetic responses can be expeditiously and easily analyzed. About 6000 ORFs were found in the *S. cerevisiae* genome and more than 70% of the ORFs contain functionally classified proteins. We have been using public databases, to categorize induced and repressed genes by toxicant and to evaluate hazardous effect of toxicant.

Considering the rapid advancements in the field of toxicology brought about by proteomics and metabolomics research genomics, proteomics, and metabolomics are being integrated as environmental OMICS technology.

yeast, chemicals, stress

講演番号：4SY08-5
講演日時、会場：3月25日15:40～ A校舎07会場

プラスチック生産微生物工場：代謝・酵素工学

Microbial Plastic Factory: metabolic-enzyme engineering

John Masani Nduko、松本 謙一郎、○田口　精一（北大院工・生物機能高分子）
John Masani Nduko, Ken’ichiro Matsumoto, ○Seiichi Taguchi (Hokkaido University)

Bacterial polyesters, polyhydroxyalkanoates (PHAs), are synthesized to form polymeric granule as sink for carbon and reducing equivalents. When nutrient supplies are imbalanced, it is advantageous for bacteria to store excess nutrients intracellularly, especially as their general fitness is not affected. Consequently, the nutrient stores will remain available at a relatively low maintenance cost and with a secured return on investment. Once PHAs are extracted from the bacterial cell, they can be used as biodegradable alternatives of petrochemical thermoplastics. The diversity of different natural monomers that can be incorporated into PHAs, combined with a biological polymerization system that generates polymeric materials, has resulted in a situation where an enormous range of new polymers are potentially available.

In our current study, unnatural monomer, lactic acid (LA), could be for the first time incorporated into the PHA backbone in *Escherichia coli* from glucose by using engineered LA-polymerizing enzyme (LPE). Enrichment of LA fraction in the LA-based polymer has been achieved by combination of anaerobic cultivation and pathway engineering. Further evolution of LPE has allowed us to regulate LA fraction and polymer content. The effectiveness of these biotechnological trials are always evaluated by polymer properties and productivity.

Most recently, PHA was produced in recombinant *Escherichia coli* LS5218 from ruthenium-catalyzed cellulose hydrolysate. The strain was found to be resistant to 5-hydroxymethylfurfural, which is a major inhibitory byproduct against cell growth, generated in the cellulose hydrolysis reaction. This platform will provide the cost-effective production of valuable LA-based polymers from renewable carbon sources.

Biopolymer, Lactic acid, Microbial factory

講演番号:4SY08-6
講演日時、会場:3月25日16:10～ A校舎07会場

細菌情報伝達阻害型薬剤の開発と応用

Antibacterial and antivirulence drugs targeting bacterial signal transduction

○内海龍太郎、五十嵐雅之[1]（近大院・農・バイオ、[1]微化研）
○Ryutaro Utsumi, Masayuki Igarashi[1] (Grad.Sch.Agricul.Kinki Univ., [1]MCRF)

Bacteria possess a two-component signal transduction system (TCS) to adapt to external physical, chemical, and biological stresses. The bacterial TCS comprises membrane-bound sensor histidine kinase (HK) that can autophosphorylate in response to environmental signals, and a cytosolic response regulator (RR) that interacts with the phosphorylated HK. HK transfers the phosphoryl group (which is covalently bound to a histidine residue conserved in the dimerization domain) to the aspartic acid conserved in a regulatory domain of its cognate RR. Phosphorylated RR binds to the upstream promoter region of target genes and regulates their expression to adapt to the initial signal. Some TCSs control gene clusters essential for cell viability or those contributing to virulence, biofilms, and quorum sensing in pathogenic bacteria. Animal cells do not have sensing and gene-regulating systems homologous to bacterial TCS. Anti-TCS drugs are expected to work in a manner different from existing antibiotics.

In this contribution, we introduce two drug-discovery systems to isolate the inhibitors of the WalK (HK)/WalR (RR) TCS (which is a master regulatory system for the metabolism and growth of the cell wall): (1) a differential growth assay with a temperature-sensitive *walR* mutant; and (2) a high-throughput genetic system for targeting WalR dimerization. By using such screening systems, we discovered three new antibacterial drugs (walkmycin, signermycin, walrycin) targeting WalK and WalR, respectively. Signermycin B was first found as an antibiotic targeting the common dimerization domain of HKs. It shows not only antibacterial effects on the drug-resistant pathogens methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus*, but also has an antivirulent effect on the plant pathogen *Pectobacterium carotovora*. These results indicate novel effects of the inhibitors that interfere with TCS, making possible the development of drugs and pesticides effective against various drug-resistant bacteria.

histidine kinase inhibitor, antibiotic, bacterial signal transduction

講演番号：4SY09-1
講演日時、会場：3月25日13:05～ B校舎18会場

標的決定による化合物ツールの設計

Design of Small-Molecule Tools by Target Identification

○上杉　志成[1]（京大・iCeMS）
○Motonari Uesugi (Kyoto Univ., iCeMS)

人間の歴史の中で、生理活性小分子化合物は、さまざまな形で用いられてきた。その利用法は主に三つあった――医薬品、農薬、基礎生物学研究のツールである。今回の講演では、細胞生物学や細胞治療に利用できる化合物ツールをいくつか紹介する。生理活性分子の未解明作用機序を理解すれば、ユニークな化合物ツールの設計が可能となり、それらを道具として生命現象を操作・解析できる。

我々の研究室の一つの例として、細胞接着を促進する「アドヘサミン」の発見と作用機序解明がある。分子生物学、細胞生物学、有機化学を利用した研究により、アドヘサミンの標的は細胞表面のヘパラン硫酸であることが示唆された。詳細なメカニズム研究をもとにして、「小分子フィブロネクチン」のデザインが可能となった。この新しい化合物ツールの細胞治療へのインパクトを議論する。

さらに、ヒト多能性幹細胞を選択的に染色する蛍光物質の例も紹介する。「Kyoto Probe 1 (KP-1)」と名付けたこの蛍光化合物は、ヒト iPS 細胞を用いたスクリーニングで発見された。その後の解析により、選択性のメカニズムが示唆された。メカニズム解析の結果を利用して、ヒト多能性幹細胞に選択的に作用する化合物の設計や天然物の発見が可能である。これまでの私たちの経験について議論する。

いずれの化合物も細胞研究の独特なツールとなり、細胞治療に活用される可能性がある。細胞治療は 10 年、20 年後には医療現場で汎用されるものになると予想される。その時に問題となるのは、細胞治療の高コストや安定した治療効果になるだろう。化合物の利点は、大量生産性と安定性である。化合物の大量生産性と安定性が、細胞治療の高コストや不安定さを補完できればと期待する。

chemical biology, cell therapy, small molecules

講演番号：4SY09-2
講演日時、会場：3月25日13:45～ B校舎18会場

がん細胞遊走のケミカルバイオロジー

Chemical Biology for Cancer Cell Migration

○井本正哉（慶大・理工）
○Masaya Imoto (Keio Univ.)

ポストゲノム生命科学研究を遂行する上で小分子化合物が重要なプローブとなることから，小分子化合物を用いて生命現象を解析する「ケミカルバイオロジー」がポストゲノムの重要な研究領域としてその発展が期待されている．すなわち，多彩な構造とユニークな活性を有する小分子化合物群こそが多様なゲノムに対応しうる分子群であると考えられ，「ケミカルゲノミクス」や「ケミカルジェネティクス」などのケミカルバイオロジー研究が生命現象解明に極めて有効な研究手法であることが認識され始めた．一方，ある種のがん細胞は非常に細胞の運動能力が高く，このことががんの転移に密接に関与することが知られている．しかし，がん細胞の運動機能を制御する細胞内情報伝達経路については不明な点が多く，このメカニズム解析に有用なケミカルプローブの開発が注目を集めている．また，このようなケミカルプローブそれ自身ががん転移を克服する新しいタイプの制がん剤のリード化合物としても期待される．我々は近年，がん細胞の遊走を阻害する小分子化合物を探索し，その遊走阻害機構の解析を行ってきた．本シンポジウムでは，ケミカルバイオロジーのアプローチでがん細胞の遊走制御機構の解明に向けた我々の研究成果を紹介したい．

Migration, Chmical Biology, Cancer Cell

講演番号：4SY09-3
講演日時、会場：3月25日14:15～ B校舎18会場

F-アクチン-アクチン結合蛋白質間相互作用を阻害する天然化合物

Natural product inhibiting F-actin-actin binding proteins interaction.

○臼井 健郎（筑波大生命環境）
○Takeo Usui (Univ. Tsukuba)

ケミカルバイオロジー研究の進展とも相まって、様々な疾病関連酵素に対する小分子阻害剤が盛んに研究・開発されている。中でも酵素阻害剤は活性を指標とした検出系が組み立てやすいこと、また酵素そのものが基質認識を行うためのポケット構造を有しており、基質ポケットに入る阻害剤を発見・設計しやすいという構造上の特徴を有することから、非常に多くの阻害剤が報告されており、それらのほとんどは基質拮抗型の阻害剤であることが多い。一方で生体内蛋白質の多くは複合体で機能することが明らかになっており、複合体形成阻害剤などを用いた蛋白質複合体の機能制御が注目されている。複合体形成に関わる蛋白質－蛋白質間相互作用は、ファンデルワールス力などによる弱い結合が広い接触面積で数多く形成されることで、強く、かつ安定した結合を形成しており、特に明確なポケット構造を有していない場合も多い。それに対し小分子化合物は狭い接触面積しか持ちえないため、ポケット構造を持たない蛋白質とは特異的で強い結合は望めない。また、たとえ結合しても結合面積が限られており、複合体形成を阻害することは難しいと考えられる。

我々は放線菌由来の抗腫瘍物質 FD-891（*J. Antibiot.* **47**, 1226 (1994); **62**, 507 (2009)）の作用機構解析を行う過程で、本物質が細胞内アクチン形態を劇的に変化させることを見出した。このアクチン構造変化は他のアクチン重合阻害剤や重合安定化剤によるものとは異なることから、新たな作用機構を有することが期待された。そこでアクチン重合・脱重合に与える影響を in vitro で検討したところ、FD-891 はアクチン重合を促進し、安定化させることが明らかとなった。さらに興味深いことに、FD-891 は F-アクチンとカルポニン(CH)ドメインを有するアクチン結合蛋白質との相互作用を阻害することが明らかとなった。このような CH ドメインをアクチン結合ドメインとして有するアクチン結合蛋白質と F-アクチンの結合阻害は、jasplakinolide や phalloidin といった既存のアクチン重合安定化剤では観察されないことから、FD-891 特異的な作用であると考えられる。

以上の結果は、FD-891 はアクチンとアクチンとの相互作用を安定化させる一方で、F-アクチンとアクチン結合蛋白質との相互作用は阻害するという、相反する活性を有する蛋白質間相互作用阻害剤であることを示している。今回はこれまでに明らかにした FD-891 の作用機構の詳細と、結合部位に関する知見について報告する。

Actin, Actin-binding proteins, Protein-protein interaction

講演番号：4SY09-4
講演日時、会場：3月25日14:45～ B校舎18会場

天然発がんプロモーターの骨格を利用した新規抗がん剤リードの開発

Development of new anti-cancer leads by utilizing the skeleton of tumor promoters in nature

○入江一浩、柳田　亮[1]、中川　優[2]（京大院・農、[1]香川大・農、[2]理研・基幹研）
○Kazuhiro Irie, Ryo C. Yanagita[1], Yu Nakagawa[2] (Kyoto University, [1]Kagawa University, [2]RIKEN)

【目的】プロテインキナーゼ C (PKC) は，発がんプロモーターの主要な標的の一つである．Bryostatin 1 (Bryo-1) は，発がんプロモーターとは異なり，PKC 活性化能と細胞増殖抑制活性を合わせもつ化合物であり，抗がん剤として有望視されている．しかしながら，本化合物の天然からの単離収率はきわめて低く，全合成も困難であるため，その供給が大きな問題になっている．Bryo-1 は，発がんプロモーターと比べて分子疎水性度が低く，発がんの抑制に関わる PKCδ を核膜付近に局在化させる特徴を持つ．そこで筆者らは，天然発がんプロモーターの中で分子疎水性度が比較的低く，Bryo-1 に最も類似したラクトンタイプの化合物である aplysiatoxin (ATX) に注目し，その単純化アナログ Aplog-1 ならびに各種誘導体を合成した (*JACS* **2009**, *131*, 7573; *BMCL* **2010**, *20*, 6064; *BBB* **2011**, *75*, 1167; *Med. Res. Rev.*, in press; *Pure Appl. Chem.*, in press).

【方法および結果】Aplog-1 は Bryo-1 と同様に，PKCδ に強く結合し，核膜付近に局在化させた．また，発がんプロモーターの *in vitro* 試験法の一つである Epstein-Barr virus (EBV) の活性化をほとんど示さず，逆に発がんプロモーターの EBV 活性化を顕著に抑制した．さらに本化合物は，マウス皮膚での発がん二段階試験において，12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) の 5 倍量塗布でも，腫瘍を形成しなかった．Aplog-1 は 39 種類のヒトがん細胞に対して，Bryo-1 と同等の増殖抑制活性を示したことから，Bryo-1 と同様の抗がん剤リードになる可能性が示唆された．

次に各種誘導体を用いて Aplog-1 の構造活性相関を検討したところ，スピロケタール付近の疎水性が，活性発現に重要であることが判明した．さらに，Aplog-1 と Bryo-1 の PKC アイソザイムに対する結合能を調べた結果，これらはいずれも novel PKC アイソザイム選択的に結合した．一方，発がんプロモーターは，アイソザイム選択性を示さなかった．これより，Aplog-1 および Bryo-1 の特異な活性の一部は，PKCδ の核膜付近への局在性と novel PKC の選択的な活性化に起因している可能性が示唆された．一方で，Bryo-1 や Aplog-1 の特異な生理活性は，PKC だけでは説明できない．そこで，PKC 以外の標的分子の存在を視野に入れ，フェノール部分に FLAG-Tag を結合させた Aplog-1 誘導体を合成し，その標的分子探索も合わせて行なっている．

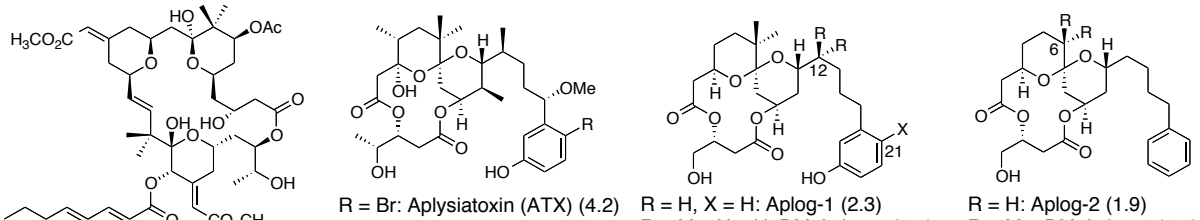


図　Bryo-1, ATX および Aplog 誘導体の構造．括弧内の値は，Clog P 値を示す．

Protein kinase C, Bryostatin, Aplysiatoxin

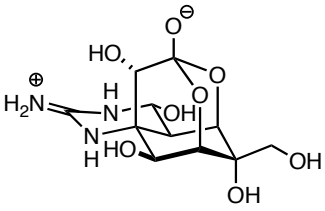
講演番号：4SY09-5
講演日時、会場：3月25日15:15～ B校舎18会場

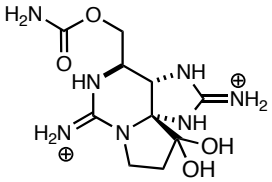
イオンチャネル阻害剤の創製を目指した海産天然毒の化学合成

Synthetic studies of marine natural products aiming at development of ion channel inhibitors

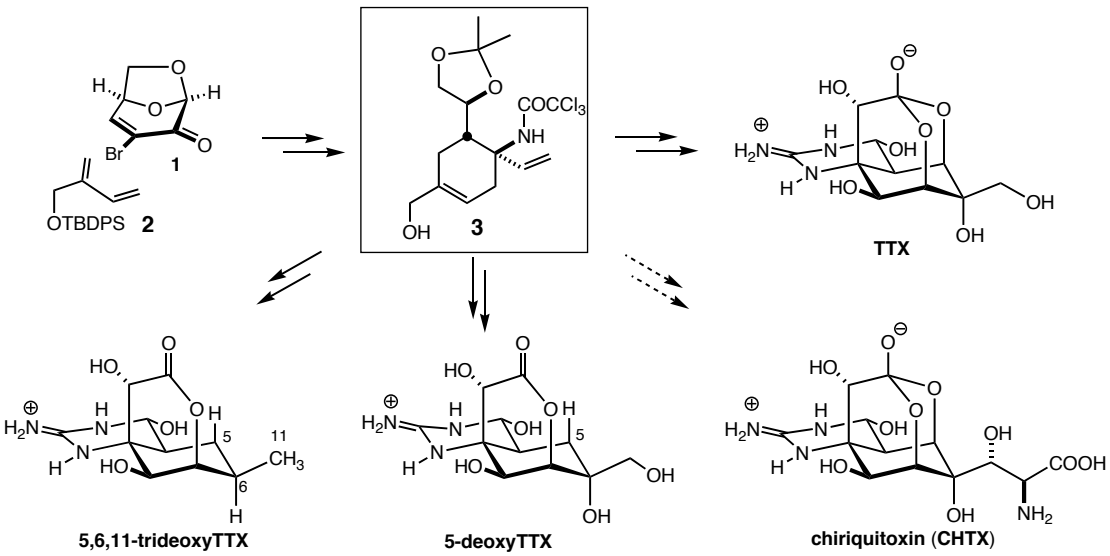
○西川俊夫（名大院生命農学）
○Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

フグ毒テトロドトキシン（TTX）と麻痺性貝毒サキシトキシン（STX）は、神経伝達系の要である電位依存性ナトリウムチャネル（以下Na^+チャネル）を特異的に阻害することから、Na^+チャネルの構造・機能の研究で欠かすことのできないツール分子として広く利用されている。しかし、近年Na^+チャネルに多くの分子種が存在することが明らかになり、その機能解析のためにサブタイプを区別できる阻害剤が切望されている。我々は、TTX, STXの完全化学合成による類縁体供給と電気生理学的手法によるサブタイプ選択的阻害活性の評価系を確立し、サブタイプ選択的阻害剤を創製することを目指している。


テトロドトキシン (TTX)


サキシトキシン (STX)

TTX, STXは、その複雑な構造と化学的性質のため天然物からの誘導体合成が極めて困難である。我々は、様々なTTX類縁体を合成供給するためにbromolevoglucosenone (**1**)とisoprenol誘導体 **2** のDiels-Alder反応から数工程を経て大量合成できる共通中間体**3**を使った第3世代のTTXの汎用合成法を開発してきた。本シンポジウムでは、この合成ルートによる5,6,11-trideoxyTTX、5-deoxyTTX, TTXの全合成と、中南米産矢毒カエルが保有するチリキトキシン（CHTX）の合成アプローチについて発表する。



tetrodotoxin, sodium channel blocker, natural products synthesis

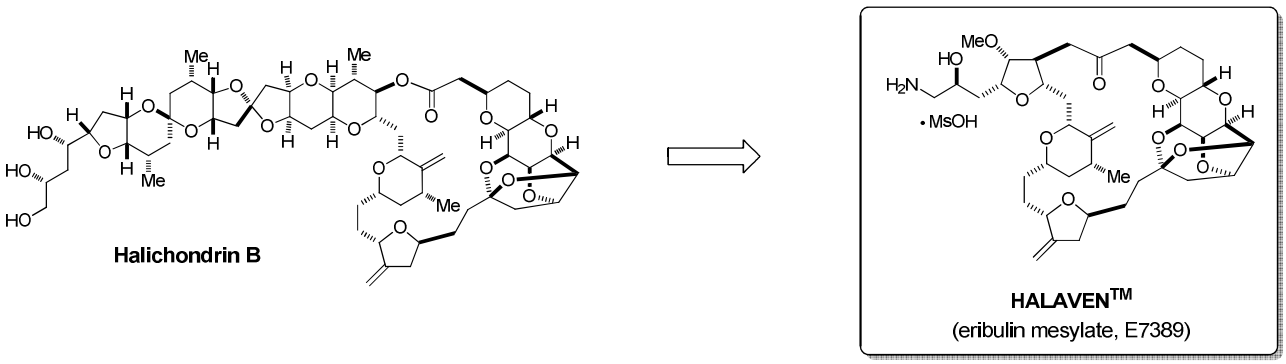
講演番号：4SY09-6
講演日時、会場：3月25日15:45～ B校舎18会場

新規抗がん剤ハラヴェン（エリブリンメシル酸塩）の創製とプロセス開発研究

Research and Development of Novel Anticancer Agent, Halaven (eribulin mesylate)

○千葉 博之、田上 克也（エーザイ株式会社 原薬研究部）
○Hiroyuki Chiba, Katsuya Tagami (API Research, Eisai Co., Ltd.)

ハラヴェン（エリブリンメシル酸塩, E7389）はエーザイが創製した新規化合物であり、局所再発性・転移性乳がんの治療薬として、日米欧を含む34カ国で承認された新規医薬品である。ハラヴェンは海綿動物の一種であるクロイソカイメン(*Halichondria okadai* Kadota)から単離された海洋天然物ハリコンドリンBをリード化合物とした完全化学合成による合成アナログ誘導体である。その構造はハリコンドリンBに比較すれば大幅に単純化されたものではあるが、19個の不斉炭素を有し、その合成には60工程を超える合成プロセスを必要とする。この複雑な化合物を医薬品として開発することは、有機合成化学者・プロセス化学者にとって大きな挑戦であると同時に、その供給を確実なものとし、臨床試験、さらには医薬品市場に提供していくことは大きな社会的責任でもあった。本講演では、これらの開発の歴史と現状について紹介する。



参考文献
1) D. Uemura, Y. Hirata et al., *J. Am. Chem. Soc.*, ***107,*** 4796 (1985)
2) Y. Hirata, D. Uemura, *Pure Appl. Chem.*, ***58,*** 701 (1986)
3) (a) Y. Kishi et al., *J. Am. Chem. Soc.*, ***114,*** 3162 (1992); (b)Y. Kishi et al., *US Patent*, 5338865 (1994)
4) Y. Kishi et al., WO 9317690 (1993)
5) (a) M. J. Yu et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, ***10***, 1029 (2000); (b) M. J. Yu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, ***14***, 5547 (2004); (c) M. J. Yu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, ***14***, 5551 (2004)
6) M. J. Towle et al., *Cancer Res.*, ***61***, 1013 (2001)
7) J. Cortes et al., *Lancet.*, ***377***, 914 (2011)
8) F. G. Fang et al., WO 2005 118565
9)千葉博之、田上克也 有機合成化学協会誌 2011. Vol.69, No.5, p.600-610

Halaven, eribulin mesylate, Halichondrin B

講演番号：4SY10-1
講演日時、会場：3月25日13:35～ B校舎19会場

*lig4*破壊株*Chaetomium globosum*による天然物生合成機構の網羅的解析法の構築

Activating silented biosynthetic pathways to produce novel natural products in filamentous fungi

渡辺 賢二（静岡県立大学　薬学部）
Kenji Watanabe (University of Shizuoka, Department of Pharmaceutical Sciences)

微生物が生産する二次代謝産物の中から多くの有用な天然物が見出されてきた。しかし、これまでの糸状菌に関する分子生物学的研究結果から、実験室における一般的な糸状菌の培養法では真菌の二次代謝産物生合成遺伝子の転写活性は低いことが明らかとなっている。つまり、糸状菌のゲノム上に生合成遺伝子はコードされているが天然物として生産を確認できない化合物が多数存在すると考えられる。とりわけ転写活性が極めて低い場合、その生合成遺伝子の mRNA を単離し cDNA を合成することは困難である。従って、異種発現による生合成産物の獲得も難しくなる。そこで本研究では、機能未知生合成遺伝子の合成産物の特定および機能解析を目的として、休眠型遺伝子クラスターの網羅的活性化法の構築を試みた。

既に我々は、トランスクリプトーム解析による *Aspergillus oryzae* の遺伝子発現に関するプロファイリングから、PKS (AoiG) をコードしていると推定されるが極めて転写活性の低い遺伝子クラスターを見出し、クラスター内に存在する転写因子をクラスター領域の外で発現することによって、新規化合物を含むいくつかのポリケタイド系天然物の合成に成功した。これら上記の知見を活用することによって、非モデル系糸状菌であり様々な天然物を生合成する潜在的能力を持つ *Chaetomium globosum* の休眠型遺伝子クラスターを活性化した。非モデル系である本糸状菌の形質転換法を確立した後、*lig4* を不活性化することによって相同組換え効率を飛躍的に向上させた。*lig4* を不活性化した *C. globosum* を用い、プロモーターの変換によって化合物を創製することを可能とした。さらに、核タンパク質の一つで二次代謝産物の生合成制御因子をコードした *laeA* の過剰発現および不活性化によっても新規天然物を見出すことができた。

以上今回我々は、複雑な構造を持った天然物を生合成すると推定された遺伝子クラスターを活性化することで、有機合成化学による全合成とは全く異なる方法論を用いた天然物の供給方法を示した。また、本研究では生合成遺伝子が転写されないために、これまで発見されずにいた膨大な数の糸状菌由来二次代謝産物を制御因子の改変によって合成できる可能性も合わせて示した。さらに今後、これら天然物の生合成酵素を獲得することが容易となり、酵素群の詳細な機能解析を進めることができると考えられる。

Synthetic biology, natural products, filamentous fungi

講演番号：4SY10-2
講演日時、会場：3月25日14:00～ B校舎19会場

糸状菌 *Phomopsis amygdali* が生産するフシコクシン生合成マシナリーの全容解明

Analysis of biosynthetic machinery of fusicoccin produced by *Phomopsis amygdali*

野池　基義、小野　裕介、加藤　修雄[1]、○大利　徹（北大院・工、[1]阪大・産研）
Motoyoshi Noike, Nobuo Kato[1], ○Tohru Dairi (Hokkaido Univ., [1]Osaka Univ.)

【目的】フシコクシンA（FC）(1)やコチレニンA（CN）(2)は糸状菌によって生産されるジテルペン配糖体であり極めて類似した構造を持つ（下図）。両者とも植物ホルモン様活性を示すが、興味深いことに、(2)のみがヒト急性白血病細胞（HL-60）に対して分化誘導活性を示し、新規作用機作を持つ抗がん剤のリード化合物として期待されている。しかし、(2)生産菌は長期保存の間に増殖能を失い、現在(2)の新規調製は不可能な状況である。そこで我々は構造類縁体である(1)の生合成を解明し、生合成工学による(2)と同等か、それ以上の活性を有する新規FC/CN類縁体の創製を目指し研究を行った。

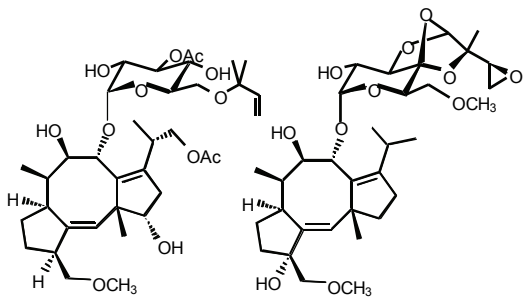
【方法】FC の基本骨格を成すフシコッカジエン生合成遺伝子（*orf1*）の取得と周辺領域の解析により dioxygenase（*orf2*）、P450（*orf3*）、dehydrogenase（*orf4*）の合計 4 つからなるクラスターを、また *P. amygdali* のドラフトゲノム解析により、さらに 4 つの P450 遺伝子(P450-2(*orf5*)、P450-3（*orf7*）、 P450-4（*orf10*）、 P450-5（*orf13*））、糖転移（*orf6*）、メチル基転移（*orf8*）、アセチル基転移 2 つ（*orf9* と *orf12*）、プレニル基転移遺伝子（*orf11*）の 9 個の遺伝子からなるクラスターを同定し（合計 13 個）、これらの機能解析を行った。

【結果】①P450;；見出された P450 は、酵母を用いた異種発現、および相同組換えによる破壊実験により、P450-2（ORF5）、P450-1（ORF3）、P450-3（ORF7）、P450-4（ORF10）、P450-5（ORF11）が、各々8、16、9、12、19 の位置を水酸化することを明らかにした。

②その他の修飾酵素；dioxygenase（ORF2）、dehydrogenase（ORF4）、糖転移(ORF6)、メチル基転移(ORF8)、およびプレニル基転移酵素(ORF11)に関しては、それぞれを組換え酵素として発現させ、生合成中間体を基質に用い *in vitro* アッセイを行った結果、予想される活性を検出した。

以上、フシコクシン生合成マシナリーの全容を解明した。

また、これまでの構造活性相関試験により、(1)が(2)同等の分化誘導活性を示すには、12 位の水酸基の除去が必須であることが判明している。そこで、*orf10*（12 位水酸化 P450）破壊株が蓄積する 12 位に水酸基の無い中間体（FC H）生産性を検討した結果、野生株が生産する(1)以上の生産性が認められ、他の FC 関連化合物の副生もほとんど見られなかった（95%以上）。FC H からは、3 位水酸基を有する完全な CN(2)ミミックが誘導できるなど、今後の医薬候補化合物の創製に新たな展開が期待できる。



FC (**1**)　　CN (**2**)

fungi, fusicoccin, biosynthesis

講演番号：4SY10-3
講演日時、会場：3月25日14:25～ B校舎19会場

マクロラクタム抗生物質ビセニスタチンの生合成マシナリーの精密解析

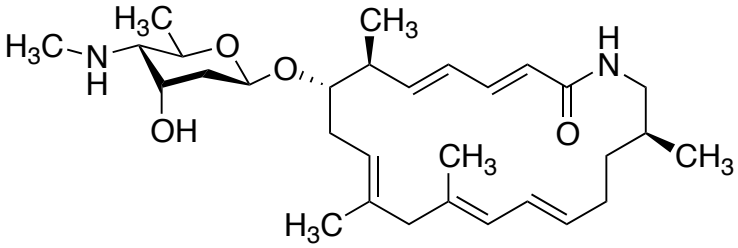
Molecular Analysis of Biosynthetic Machinery of Macrolactam Antibiotic Vicenistatin

○江口　正（東工大・院理工）
○Tadashi Eguchi (Tokyo Institute of Technology)

植物や微生物の二次代謝産物は古来より医農薬などとして人類の生活向上に貢献してきた。「化学構造の多様性」とそれに基づく「多彩な生物活性」こそが、二次代謝産物の特徴であるとすれば、新しい化学構造を自然の中に見つけ出す探索研究を今まで以上に推進するとともに、そのさまざまな化学構造を生み出す仕組みが自然の中で長い歴史をかけて如何に出来上がってきたか、すなわち、その生合成マシナリーを解析し、その基盤に立って新たな創造を生む研究が極めて重要である。

マクロライド抗菌剤やアントラサイクリン系抗ガン剤などはポリケチドと総称される二次代謝産物群であり、構造多様性の典型である。また、有用な生物活性を示すポリケチド化合物の多くは配糖体構造をなし、ハイブリドポリケチドとも呼ばれる。ポリケチド部分は通常、炭素鎖が２～４個の低級脂肪酸の縮合により構成される単純ポリケチドであり、その生合成系は長鎖脂肪酸のそれと祖先を一にすると考えられている。一方、脂肪酸以外の代謝中間体が組み込まれた複合ポリケチド類が知られており、それらの特異な生理活性から、広く注目されている。特にポリケチド鎖のスターター部は、アンサマイシンのように芳香族カルボン酸由来、あるいはアミノ酸由来のものがあり、ポリケチド化合物の多様性を例証するだけでなく、自然界で生起するポリケチド生合成系システムの遺伝的組み換えを強く示唆している。

我々はこの様な背景のもと、スターター部が脂肪酸でない複合型ポリケチドであると共に特異なアミノ糖を有するハイブリドポリケチドでもあるビセニスタチンの生合成に注目してきた。ビセニスタチンは *Streptomyces halstedii* HC34 から単離された抗腫瘍性 20 員環マクロラクタム抗生物質である。そのアグリコンでは、特徴的なアミノ酸とポリケチド鎖が連結して構築すると考えられ、生合成遺伝子のスワッピングなどによる生合成工学的手法により、新たな分子創製も可能になると期待される。本シンポジウムでは、我々が最近明らかにしたビセニスタチン生合成の全貌を述べると共に、ハイブリド型複合ポリケチド生合成マシナリー成立の分子基盤を反応化学の観点から遺伝子解析をも通して紹介したい。



ビセニスタチン

biosynthesis, macrolactam, vicenistatin

講演番号：4SY10-4
講演日時、会場：3月25日14:50～ B校舎19会場

糸状菌を宿主とした効率的な二次代謝化合物生合成遺伝子発現系の開発

Development of efficient expression systems for secondary metabolite biosynthetic genes in filamentous fungi

○五味勝也（東北大院農）
○Katsuya Gomi (Grad Sch Agric Sci, Tohoku Univ)

糸状菌や放線菌の生産する二次代謝化合物は多数の生合成ステップを経て合成されるが、生合成に関わる酵素群、すなわち生合成マシナリーを構成する酵素の遺伝子はクラスター構造を形成しており、これらの遺伝子群が協調的に発現することにより、複雑な構造をもつ化合物が生産される。近年のゲノム解析の結果、麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノムには生合成遺伝子クラスターが約 50 個推定され、他の同属糸状菌に比べ多くの二次代謝関連遺伝子を保有しているものの、その多くはほとんど発現しておらず、自身が生産する代謝産物のバックグラウンドが低く、そのため純度の高い物質生産システムの構築が可能なクリーンホストとして利用できることが示されている。しかし、生合成マシナリーの構成酵素遺伝子を自由に操作して麹菌内に導入し、目的の化合物を高効率・高生産する手法は未だ確立していないのが現状である。そこで、クリーンホストとして期待される麹菌に生合成マシナリーを構成する複数の生合成酵素遺伝子を効率的に導入する手法として、Cre-loxP システムを利用した多重遺伝子導入法の開発を試みた。

宿主に多重の選択マーカーが付与されていない場合、生合成遺伝子クラスターを構成する複数の遺伝子を導入するためには、マーカー遺伝子のリサイクリングが重要な技術となる。近年相同組換え頻度の高い宿主が開発されているが、相同領域間で選択マーカーを組換えてリサイクリングを行う方法では脱落効率が低く労力を要するため、より簡便な方法が求められる。そこで、Cre-loxP システムに着目し、Cre 組換え酵素発現カセットの導入と発現誘導による選択マーカーの除去ステップを簡略化するために、Cre 酵素を直接菌体核内に導入することで loxP 配列に挟まれたマーカー遺伝子を除去することを試みた。その結果、酵素キャリアとして何らかのDNA断片をCre 酵素と一緒に作用させることで、効率良く麹菌細胞内でマーカー遺伝子の除去が可能であることを見出した。この手法により遺伝子破壊を簡便かつ迅速に繰返して行うことができ、多重マーカーを付与した宿主の造成が容易になった。一方、単一の選択マーカーの繰返し利用により複数の遺伝子導入を行うためには、変異型loxP 配列を用いた選択マーカーの導入・除去が必要であり、この場合には従来のCre 組換え酵素発現カセットの導入が有効であった。

糸状菌や植物などの真核生物では、二次代謝化合物の生合成の場がペルオキシソームや液胞などの細胞内オルガネラの場合があり、生合成マシナリーのオルガネラ局在化の制御が効率的な代謝産物の生産に必要と考えられる。また、生合成反応を効率的に進めるために、オルガネラなどを生合成マシナリーの複合体形成の場として利用することも可能である。そのため、糸状菌の二次代謝化合物生合成遺伝子クラスターに存在する遺伝子産物の細胞内局在解析も重要である。本講演では、*Phoma betae* が生産するテルペノイド化合物であるアフィディコリンの生合成酵素をモデルとして、それらを麹菌で発現させた場合の細胞内局在化についても報告したい。

secondary metabolite, Cre-loxP, *Aspergillus oryzae*

講演番号：4SY10-5
講演日時、会場：3月25日15:15～ B校舎19会場

生合成マシナリー構築のための汎用宿主の開発

Construction of versatile host for biosynthetic machinery

小松　護、○池田　治生（北里大・生命研）
Mamoru Komatsu, ○Haruo Ikeda (Kitasato Inst. for Life Sci., Kitasato Univ.)

微生物由来の代謝産物は、一次代謝産物および二次代謝産物を含め、これまで我々の社会生活に貢献しているものが多い。これらの中で二次代謝産物は医薬品の素材として20世紀から注目され、現在も微生物から新規な化合物の探索が続けられている。微生物二次代謝産物の多くは土壌微生物である放線菌から発見されるものが多く、特に*Streptomyces*属の菌種はこれまでに多くの医薬品を供給してきた。今世紀の初頭になってアミノ酸および抗生物質の生産に利用されている産業微生物のゲノム解析が報告され、その後ドラフトゲノム解析を含めいくつかの産業利用微生物のゲノム解析が行われた。したがって、抗生物質を含む二次代謝産物の生合成ならびにそれらの生成に関わる遺伝子の発現調節を含む生成機構全体をゲノムレベルで研究する体制が整ってきた。我々は2001年に抗寄生虫・抗昆虫抗生物質avermectinの工業的生産株*S. avermitilis*のゲノムの99%以上を解読し(1)、さらに2003年に完全配列を報告した(2)。その後に解析したstreptomycin生産菌*S. griseus*のゲノム解析を含め、*Streptomyces*のゲノム上には30種を越える二次代謝産物生合成遺伝子群を保有することが明らかにするとともに、これら二次代謝産物生成のための前駆体供給に関与する一次代謝系に関しても多くのパラログを見いだしている。*Streptomyces*属のいくつかの菌株は分子遺伝学的な解析系が整備されてはいるが、多くの*Streptomyces*では変異株の取得のみならず遺伝子導入などが困難な場合が多く詳細な解析が困難な場合がある。*S. avermitilis*はavermectinの工業生産といった産業利用のみならず、遺伝子導入ならびに破壊といった分子遺伝学的な解析系が十分整備されており、平成22年3月より文科省「組換えDNA実験指針」の認定宿主ベクター系の宿主として認可された数少ない菌株の一つである。*S. avermitilis*は産業利用株であり、物質生産のための本質的な機能を有している生物と理解できる。我々は*S. avermitilis*のこの機能を自身の二次代謝産物の生成のみならず、異種菌株あるいは生物の二次代謝産物生合成の解析に利用可能な「生合成マシナリー」としての汎用宿主を構築することを計画した(3,4)。二次代謝産物の大部分はその生合成経路として(i)糖質、(ii)脂肪酸およびポリケチド、(iii)シキミ酸、(iv)アミノ酸、(v)メバロン酸あるいはメチルエリスリトールリン酸を出発物質とする五つの経路に分類することができ、各経路単独もしくはこれらが組み合わされた経路を経て生合成される。現在までに多くの異種二次代謝産物生合成遺伝子群の発現を*S. avermitilis*のゲノム再構成株で検討し、上記の五つの経路によって生合成される二次代謝産物の生成を確認した。また、(ii)のポリケチド化合物の生合成遺伝子群については80 kbを越える遺伝子断片を導入することが可能であり、かつ安定な代謝産物の生成も確認されている。

(1) *PNAS* **98**:12215, 2001 (2) *Nat. Biotechnol.* **21**:526, 2003 (3) *PNAS* **105**:7422, 2008 (4) *PNAS* **107**:2646, 2010

biosynthesis, secondary metabolism, heterologous expression

講演番号：4SY10-6
講演日時、会場：3月25日15:30～ B校舎19会場

イソキノリンアルカロイドの微生物発酵生産の可能性

Microbial production of isoquinoline alkaloids

○ 佐藤文彦、南　博道[1]（京大院・生命、[1]石川県立大・生物資源工学研）
○ Fumihiko Sato, Hiromichi Minami[1] (Kyoto Univ., [1] Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】イソキノリンアルカロイドは鎮痛剤であるモルヒネ、鎮痙剤であるパパベリン、抗菌・抗炎症剤であるベルベリン等の医薬品を含む多様な一群の植物アルカロイドである。現在もなお天然の植物資源から抽出利用されているが、例えば、ベルベリンに血中コレステロール低下作用が認められる等の新規薬理活性が認められるなど、これらの化合物の生理活性を更に改変した新規創薬のための新たな合成法の開発が急務である。これまで、化学合成、細胞培養、代謝工学等の手法により生産効率の改良、生産物の改変が試みられてきたが、本研究では、植物由来の生合成遺伝子を活用した微生物によるイソキノリンアルカロイド生産系構築の可能性を検討した。
【方法】これまでに、キンポウゲ科のオウレン培養細胞を用いて、イソキノリンアルカロイド生合成系の主経路であるノルコクラウリン生合成から鍵中間体であるレチクリン生合成系の生合成酵素遺伝子を単離してきた。一方、イソキノリンアルカロイドの前駆物質であるチロシンからノルコクラウリン生合成の基質であるドーパミンならびに4-hydroxyphenylacetaldehyde (4HPAA)の合成経路に関しての知見は限られていた。一方、ノルコクラウリン生合成酵素（NCS）は4HPAA以外に3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (3,4DHPAA)をも基質にできることからドーパミンから3,4DHPAAを微生物酵素由来のモノアミン酸化酵素(MAO)で変換生成させ、反応の初発とすることとし、植物由来の生合成酵素と組み合わせ、大腸菌内に生合成系を再構築することを試みた（レチクリン生合成プラットフォーム）。また、大腸菌の代謝系を改変し、チロシン、さらには、ドーパミンを比較的大量に産生する生合成プラットフォーム（ドーパミン高産生プラットフォーム）を構築した。
【結果】まず、レチクリン生合成プラットフォームを用いて、ドーパミンからレチクリンを10 mg/L以上の収率で産生できること、また、反応条件の改変によりさらに収率を改善できることを明らかにした。一方、このレチクリン生合成プラットフォームをドーパミン高産生プラットフォームと組み合わせることにより、グルコース、あるいは、グリセリンから5 mg/L以上の収率でレチクリンを産生することが明らかとなった。更なる検討によりグルコース等から発酵生産する場合、ドーパミン産生が律速であった。そこで、生合成酵素をさらに選択することにより、40 mg/L以上の収率でレチクリン産生することが可能であることを明らかにした。多様な前駆体の投与による生成物の構造改変、ならびに、レチクリンからの更なる代謝変換についても議論する。

参考文献　1) Minami H et al. (2008). Microbial production of plant benzylisoquinoline alkaloids. Proc Natl Acad Sci USA 105: 7393-7398. 2) Nakagawa A et al. (2011) A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. Nature Communications 2: 326

isoquinoline alkaloids, microbial production, dopamine

講演番号：4SY10-7
講演日時、会場：3月25日15:55～ B校舎19会場

メタボロミクスによる植物成分生合成のゲノムマイニング：キノリチジンアルカロイド生合成の初発酵素遺伝子の同定

Genome mining for biosynthesis of plant products by metabolomics: Identification of a gene involved in the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis

○斉藤和季[1,2]、Somnuk Bunsupa[1]、山崎真巳[1,3]（[1]千葉大・院薬、[2]理研・植物科学研究セ、[3]CREST/JST）
○Kazuki Saito[1,2], Somnuk Bunsupa[1], Mami Yamazaki[1,3] ([1]Chiba Univ, Grad Sch Pharm Sci, [2]RIKEN Plant Sci Ctr, [3]CREST/JST)

植物は動けないので化学的な戦略に基づく独自の生存戦略を発達させた。その結果、植物代謝産物の総数は20万～100万種に達すると見積もられ、動物や微生物の化学的多様性を凌駕している。また、薬用植物、農作物、工業原料植物など植物の有用性を決めているのは、糖、アミノ酸、脂質などの一次代謝産物およびアルカロイド、ポリフェノール、テルペノイドなどの二次代謝産物（いわゆる天然有機化合物）である。この植物の有する化学的多様性を決めているゲノム基盤解明とその応用は、昨今求められている再生可能な自然資源、食料、感染症の拡大など地球規模での諸問題解決に向けて極めて重要な課題である。このためのアプローチとして、メタボロミクスや次世代シークエンサーなど技術進歩を背景にした統合オミクスに基づく植物科学でのシステム生物学が注目されている。

本研究では、植物における天然物生合成のゲノム基盤を、メタボロミクスを基軸とした統合オミクスによって解明する事を目的としている。すでにモデル植物シロイヌナズナにおいてトランスクリプトミクスとメタボロミクスを中心にした統合オミクスによってシロイヌナズナの特異的成分生合成に関わる新規な遺伝子を数多く発見することに成功した。さらに、このモデル植物で確立したゲノムマイニング手法を、血糖降下作用を有するキノリチジンアルカロイドや抗がん成分カンプトテシンをはじめとする生物活性成分を生産する非モデル薬用植物について適用し、統合オミクスデータからその生合成に必須な遺伝子（酵素、転写因子など）を推定している。さらにこれらの推定遺伝子は実験的にその機能を同定しつつある。その中で、今回リシンを前駆体としピペリジン環を有する大きな一群のアルカロイド生合成の初発反応を触媒するリシン脱炭酸酵素を初めて同定する事に成功した。これはマメ科ルピナス属植物においてキノリチジンアルカロイド含有性のビター品種と非含有のスイート品種の間でのトランスクリプトーム解析と代謝プロファイル解析を基にした生合成遺伝子マイニングの成功例である。

本講演では、これらのモデル植物と薬用植物での二次代謝成分生合成システムのゲノムマイニングついて最近の例を紹介する。

Biosynthesis, Metabolomics, Natural products

講演番号：4SY11-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ C校舎01会場

マイトコキシンのリスク評価

Risk Assessment for Mycotoxins

○小西良子、吉成知也（国立衛研）
○Yoshiko Sugita-Konishi,　Tomoya Yoshinari (National Institute of Health Sciences)

【目的】マイコトキシンは、カビの産生する二次代謝産物で、ヒトや動物に健康被害を引き起こす化合物である。今までに報告されたマイコトキシンは 1,000 種以上にのぼるが、食品を介して健康被害を引き起すことが明白になっているマイコトキシンは、アフラトキシンズ、トリコテセン系マイコトキシン、オクラトキシン A, フモニシン、ゼアラレノン、パツリン、黄変米毒などの数十種に限られている。しかし引き起される健康被害は発がん性をはじめ、免疫不全、内分泌かく乱など、生命維持を脅かすものが多いため、その対策は食の安全を確保する上で重要な問題となっている。我が国においては、マイコトキシンは主に輸入食品の摂取から暴露されることが多い。マイコトキシンの危害を最小限に抑えるためには科学的な根拠に基づいたリスク評価が必要である。
【方法】マイコトキシンのリスク評価は、国際的にはFAO/WHO 食品添加物合同専門家会議（JECFA）や欧州食品安全機関（EFSA）が行っており、我が国では食品安全委員会（Food Safety Commission）が行っている。マイコトキシンは微生物が産生する毒素であるが、化学物質であることから化学物質のリスク評価手法を用いて評価を行う。すなわち、ハザードの確定を行うために、疫学調査および動物実験等で毒性評価を行う。毒性に遺伝毒性が認めらない場合には、慢性毒性試験等により最大無作用量（No-Observable-Effect Level）を決定し一日耐容摂取量を定めることとなるが、遺伝毒性が認められた場合には一日耐容摂取量は定めることはできないため、ベンチマークドーズ（BMD）を設定することが推奨されている。次に食品中のマイコトキシンの汚染濃度を精密に分析し、平均汚染量とともにその分布状態を明らかにする。同時に汚染量および汚染頻度の高い食品（寄与食品）の摂取量を国民栄養調査等の結果から平均汚染量とともに分布状態を明らかにし、汚染量および対象食品の摂取量を解析することにより、暴露評価を行う。この暴露評価の値が一日耐容摂取量以上の場合、あるいはBMDと暴露量との差（Margin of exposure,　MOE）がある一定の値以下である場合に基準値を設定することとなる。
【結果】国際機関でリスク評価が一通り行われているマイコトキシンは、総アフラトキシン、アフラトキシンM,　パツリン、オクラトキシンA,　トリコテセン系マイコトキシン（デオキシニバレノール、T-2トキシン、HT-2トキシン）、ゼアラレノン、フモニシンである。食品安全委員会で評価が行われているのがパツリン、総アフラトキシン、デオキシニバレノール、ニバレノールであり、現在進行中なのはアフラトキシンM,　オクラトキシンAである。今後の進展も含めて紹介したい。

mycotoxins, risk assessment, aflatoxin

講演番号:4SY11-2
講演日時、会場:3月25日14:00～ C校舎01会場

フモニシンの分析とリスク

Analysis of fumonisins and their risk

○久城 真代（(独) 農研機構）
○Masayo Kushiro (NARO)

フモニシンは比較的最近、1988年に同定されたフザリウム属菌によるマイコトキシン（かび毒）であり、世界中でトウモロコシの汚染度が高く、飼料と食料の安全性確保の上で重要な問題となっている。動物種によってさまざまな毒性を発現し、馬の白質脳症、豚の肺水腫、ラットの肝臓がんの原因物質である。ヒトではIARCの評価で発がん性の可能性がある（グループ2B）とされ、新生児の神経管障害との関連がトウモロコシを主食とする地域における疫学的調査で示唆されている。日本ではトウモロコシを主食としないことからフモニシンに対する注目度は低いが、リスク管理機関による汚染実態調査は行われており、飼料用トウモロコシで高頻度の汚染が報告されている。

わが国の主食であるコメについてはマイコトキシン汚染報告事例が少ない。しかしフザリウム属菌感染によって発生する「赤もみ」については旧来知られており、国内外で散発的にフモニシン汚染の報告がある。「赤もみ」の原因菌として幾種かのフザリウム属菌が報告されているが、そのうち一部はフモニシン産生能を有する菌種である。よってコメにおいてもフモニシン汚染の潜在リスクがある。

そこでわれわれは、人工汚染米を用いてフモニシン含有コメ標準物質を作製し、コメ中フモニシン分析法を開発した。また、圃場でのコメ汚染の可能性について調査している。本講演では、（１）インハウスかび毒分析用標準物質の作製とコメ中フモニシン分析法の開発、（２）高感度分析法を用いた稲もみ中フモニシンの検出、（３）コメ着生フザリウム属菌のフモニシン産生性とリスク
について概説する。

文献

Kushiro M, Tanaka K, Miyazaki S, Nagata T. Advances of liquid chromatographic determination of fumonisins; Potential mycotoxins for humans. Current Pharmaceutical Analysis 2:289-297 (2006).

Kushiro M, Zheng Y, Sagou Y, Tanaka K, Nagata T. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2, and B3 in rice. Mycotoxins 57:95-104 (2007).

Awaludin N, Nagata R, Kawasaki T, Kushiro M. Preparation of an in-house reference material containing fumonisins in Thai rice and matrix extension of the analytical method for Japanese rice. Toxins 2:188-195 (2009).

fumonisin, *Fusarium*, rice

講演番号：4SY11-3
講演日時、会場：3月25日14:30～ C校舎01会場

赤かび病菌のトリコテセン系かび毒の後期生合成機構

Studies on the late biosynthetic grids of *Fusarium* trichothecenes

○前田 一行[1,3]、富永 直樹[2,3]、兵藤 壮一郎[2,3]、大里 修一[1]、鎌倉 高志[2]、米山 勝美[1]、吉田 稔[3]、木村 真[3,4]（[1]明大・農、[2]東理大・理工、[3]理研・基幹研、[4]名大・生命農）

○Kazuyuki Maeda[1,3], Naoki Tominaga[2,3], Soichiro Hyodo[2,3], Shuichi Ohsato[1], Takashi Kamakura[2], Katsuyoshi Yoneyama[1], Minoru Yoshida[3], Makoto Kimura[3,4]（[1]Meiji Univ., [2]Tokyo Univ. Sci., [3]RIKEN ASI, [4]Nagoya Univ.）

【目的】トリコテセン系かび毒の生合成は、*Fusarium sporotrichioides* が生産するほぼ単一の経路からなる T-2 toxin の生合成をモデルに解明されてきた。しかし実際の圃場で穀類を汚染する赤かび病菌 *F. graminearum* のトリコテセンでは、それらを生産する菌株によって側鎖の水酸化やアセチル化のパターンが異なるために構造多様性に富み、現場で対応可能な簡易検査法を開発する上で障害となっている。本講演では赤かび病菌のトリコテセン系かび毒の後期生合成を概説し、側鎖多様性を生み出す原因となる脱アセチル化の機構を中心に最近の成果を紹介する。
【結果と考察】ニバレノール（NIV）を生産する赤かび病菌のトリコテセン生合成遺伝子の破壊により、生合成過程においてトリコテセン骨格 C-3、C-15、C-4 の全ての位置が一旦この順にアセチル化を受け、生合成後期にこの順で脱アセチル化を受けることが明らかになっている。このうち C-3 の脱アセチル化に加え C-15 の脱アセチル化反応もトリコテセン遺伝子クラスターの末端にある *Tri8* 遺伝子がコードするエステラーゼが関与することが明らかになった。TRI8 酵素はこのように C-3 と C-15 のいずれのアセチル基にも作用できるエステラーゼであるが、C-4 が水酸化されないデオキシニバレノール（DON）を生産する２種類の菌株においては、C-3 もしくは C-15 のいずれかのアセチル基に対するエステラーゼ活性が高く、もう片方の残りの位置（それぞれ C-15 もしくは C-3）に対しては活性が低いことが明らかとなった。さらにゲノムデータベースからトリコテセン遺伝子クラスターと同一染色体上の離れた位置に *Tri8* のパラログ *Tri104* が見出されたが、TRI104 はトリコテセン骨格 C-3、C-15、C-4 の各アセチル基に対して弱いながらも同等の脱アセチル化活性を有することが分子遺伝学的、生化学的に証明された。NIV 生産菌の *Tri104* を破壊すると NIV 生産量が著しく低下することから、TRI104 は NIV 生産菌の C-4 脱アセチル化を担う正規の生合成酵素であると言える。このようにトリコテセン後期生合成では、遺伝子クラスター外の *Tri104* 遺伝子がコードする基質特異性の低いエステラーゼとクラスター内の *Tri8* 遺伝子がコードする基質特異性の高いエステラーゼの２つの酵素が関与し、２種類存在する DON 生産菌株のうちの１つのタイプについては TRI8 の基質特異性が著しく変化して後期生合成経路が異なるルートをとるように進化してきたことが示唆された。

Fusarium graminearum, trichothecene biosynthesis, esterase

講演番号：4SY11-4
講演日時、会場：3月25日15:00～ C校舎01会場

赤かび病抵抗性植物の作出によるカビ毒低減化の試み

Generation of *Fusarium*-resistant plants to reduce trichothecene mycotoxin levels.

〇西内巧（金沢大・学際セ）
〇Takumi NISHIUCHI(ASRC, Kanazawa Univ.)

【目的】

赤かび病菌はコムギ、オオムギ、トウモロコシ等に感染し、人畜に深刻な健康被害(食中毒や免疫抑制等)を及ぼすデオキニバレノール(DON)等のトリコテセン系カビ毒を産生することから、世界的に問題になっている。植物の赤かび病抵抗性の分子機構を明らかにし、実用的な防除技術を開発することで、作物のカビ毒汚染防除につなげたい。

【結果】

＜シロイヌナズナを用いた赤かび病抵抗性の制御因子の同定＞

赤かび病菌に罹病性でムギ類と同様の病徴を示すモデル植物のシロイヌナズナを用いて、マイクロアレイ解析により同定した赤かび病菌感染応答遺伝子やトリコテセン応答遺伝子について、T-DNA挿入変異株を用いた逆遺伝学的な解析を行った。転写因子であるAtNFXL1の変異株では、赤かび病抵抗性が向上し、カビ毒蓄積も有意に減少していた。一方で、AtNFXL1と相互作用するMAPKKKであるMKD1の変異株では赤かび病抵抗性が低下していたが、MKD1に近い他のMAPKKKの変異株は異なる表現型を示した。これらのMAPKカスケードを人為的に制御することで、赤かび病に非常に強い抵抗性を示す植物の作出が期待される。

また、複数のエチレン応答性転写因子(ERF)の変異株において、赤かび病抵抗性が向上していた。エチレン非感受性変異体でも同様の表現型が見られたことから、ERF 遺伝子とエチレンシグナルとの関連性について解析を進めている。

＜オオムギの抵抗性系統を用いた赤かび病抵抗性獲得機構の解明＞

赤かび病抵抗性が示唆されている１５系統を圃場栽培し、切り穂接種により赤かび病菌の分生子を接種した。罹病性系統に比べて、被害粒の割合が1/3以下、カビ毒蓄積（デオキシニバレノール・ニバレノール）が1/2以下に減少した抵抗性系統を複数同定した。これらの系統を用いて、マイクロアレイ解析及びメタボローム解析を進めている。

【今後の展開】

シロイヌナズナで同定した赤かび病抵抗性に関わる遺伝子について、オオムギオルソログの発現を人為的に制御した形質転換オオムギを作製し、赤かび病抵抗性への関与について解析を進めたい。

また、赤かび病抵抗性植物から抗菌活性物質の単離・精製を試みており、オオムギの抵抗性系統におけるメタボローム解析の結果と合わせて、赤かび病防除及びカビ毒低減化に有効な低分子化合物の探索を進めたい。

trichothecene　mycotoxin, disease resistance, Fusarium

講演番号：4SY11-5
講演日時、会場：3月25日15:30～ C校舎01会場

シクロピアゾン酸生合成機構と麹菌のセーフガード

Cyclopiazonic acid biosynthesis and genetic safeguard against mycotoxin production in *Aspergillus oryzae*.

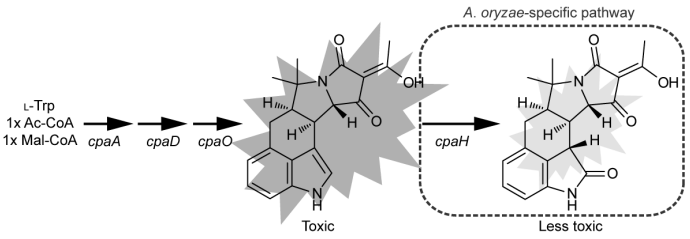
○加藤 直樹、徳岡 昌文[1]、篠原 靖智[1]、小山 泰二[1]、長田裕之（理研基幹研・ケミカルバイオロジー、[1]野田産研）

○Naoki Kato, Masafumi Tokuoka[1], Yasutomo Shinohara[1], Yasuji Koyama[1], Hiroyuki Osada (Chemical Biology Dept., RIKEN ASI, [1]Noda Institute for Scientific Research)

麹菌*Aspergillus oryzae*は我が国の伝統的な発酵食品の生産には欠かせない微生物であり、長い年月をかけた育種により、その安全性が確立されている。本菌は、アフラトキシン生産菌*A. flavus*から数千年前に派生した家畜種と考えられており、その進化的な近縁関係は、両種のゲノム解読によっても裏付けられている。我々人類にとって対極とも言える両種の決定的な相違点として、二次代謝産物生産能を挙げることが出来る。両種のゲノム中には共通して多数の二次代謝系遺伝子が存在しているにも関わらず、*A. oryzae*は一切、アフラトキシンを生産せず、報告のある二次代謝産物もごく少数である。家畜化の過程において喪失されたであろうマイコトキシン生産性は、その生合成に関わる遺伝子の変異や欠損、転写抑制によるものと考えられ、これは*A. oryzae*が*A. flavus*から家畜化して生じた種であるという概念によく合致している。しかしながら、*A. oryzae*における非生産性を決定する遺伝的因子についてはほとんど明らかとなっていない。

我々は、その異なる二次代謝産物生産能の要因を探るため、両種の二次代謝産物生合成遺伝子の比較を行った。その結果、*A. oryzae*における限定的な代謝産物生産能を説明できるような塩基配列の欠失だけでなく、野生種とそこから派生した家畜種という従来の概念とは相反しそうな遺伝子、すなわち、*A. oryzae*では保持されているが、*A. flavus*において（部分）欠失している遺伝子の存在を見出した。シクロピアゾン酸（CPA）の生合成遺伝子クラスター中に含まれるシトクロムP450遺伝子*cpaH*もその一つであり、その二次代謝産物生産における役割や家畜化との関連（安全性に与える影響）について解析を行うこととした。

小胞体Ca^{2+}-ATPaseに対する強力な阻害活性を有するCPAは、*A. oryzae*（の一部の菌株）において生産が報告されている数少ないマイコトキシンの一つである。これまでの遺伝学的、および生化学的解析により、PKS-NRPSハイブリッドCpaA、プレニル基転移酵素CpaD、環化酵素CpaOの３つの酵素が関与する生合成経路が提唱されている。遺伝子破壊実験、代謝産物解析、ならびに生物活性の評価から、*A. oryzae*では、CPAは*cpaH*の作用により、毒性の低い2-オキソCPAに変換されていることを明らかにした。*A. flavus*では失われた、この解毒様の役割を担う*cpaH*の存在は、両種の関係をよく反映しており、麹菌ゲノム中には、その安全性を担保する様々な遺伝要因が蓄積していることが示唆される。



secondary metabolite, biosynthesis, *Aspergillus oryzae*

講演番号：4SY11-6
講演日時、会場：3月25日16:00～ C校舎01会場

アフラトキシン生産阻害物質の作用機構

The mode of action of aflatoxin production inhibitors

○吉成 知也、作田 庄平[1]、長澤 寛道[1]、小西 良子（国立衛研、[1]東大院農生科・応生化）
○Tomoya Yoshinari、Shohei Sakuda[1]、Hiromichi Nagasawa[1]、Yoshiko Konishi(NIHS、[1] Univ of Tokyo)

アフラトキシン類は*Aspergillus flavus*等の真菌が生産する二次代謝産物で、天然有機化合物中最も強い発ガン性を有している。熱帯、亜熱帯地域を中心に、とうもろこし等の穀類、ピーナッツ、ピスタチオ等のナッツ類、香辛料等の多くの農作物においてアフラトキシン汚染が認められており、そのようなアフラトキシン高汚染地域ではアフラトキシンが原因と推定される肝臓ガンにより多くの人々が毎年死亡している。そのためアフラトキシンについては世界各国で厳しい基準が設定されており、米国や東南アジアでは汚染農作物の廃棄によりそれぞれ年間数億ドルの経済的被害が発生している。わが国においても、総アフラトキシン（アフラトキシンB_1、B_2、G_1 及びG_2の総和）を10μg/kgを超えて検出する食品は、食品衛生法第６条第２号に違反するものとして取り扱うこととされており、多くの違反した農作物が廃棄処分となっている。このようなことから、アフラトキシンの汚染防除法の開発は、食の安全の確保や食料不足の問題といった観点から、非常に重要な課題である。

アフラトキシンの汚染防除法の一つとして、カビのアフラトキシン生産を抑制する化合物を栽培時や収穫後の貯蔵段階で利用する方法の実用化が期待されており、これまでに放線菌や植物の代謝産物からアフラトキシン生産阻害活性を持つ化合物が単離同定され、報告がなされている。その中でも放線菌代謝産物であるアフラスタチンA、ブラストサイジンA及びジオクタチンAは、カビのアフラトキシン生産に特異的に作用し、カビの生育に大きな影響を与えずにアフラトキシン生産のみを低濃度で阻害する活性を有することが知られている。これらアフラトキシン生産阻害剤の作用機構に関する情報は、阻害剤の実用化やより効果的な薬剤の開発において重要である。また、現在、アフラトキシンの生産には、炭素源や温度、pH等の環境因子が影響を与えることは示唆されているものの、その分子レベルの調節機構についてはほとんど解明されておらず、アフラトキシン生産阻害剤の作用機構に関する研究は、カビのアフラトキシン生産に関する分子メカニズムの解明にもつながることが期待される。

我々はこれまでに天然物由来のアフラトキシン生産阻害物質の探索を試み、単離同定された化合物についてその作用機構の解析を行ってきた。最近では、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法を用いたプロテオミクス解析により、ブラストサイジンAがカビのタンパク質発現に与える影響を調べ、ブラストサイジンAがカビのタンパク質合成系に影響を与えることを見出した。また、質量分析器を用いたメタボロミクス解析により、ジオクタチンAがカビの代謝産物に与える影響を調べている。本発表では、我々が研究を行っているアフラトキシン生産阻害剤が有する活性の特徴や作用機構研究の最新の結果について述べる。

aflatoxin, metabolomics

講演番号：4SY12-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ C校舎23会場

クロマチン・細胞核の構造とエピゲノム制御：アクチンファミリーからのアプローチ

Nuclear actin family proteins involved in epigenome regulation: their roles in the organization of chromatin and the nucleus

尾間　由佳子、北村　大志、高橋　裕一朗、日下部　将之、小西　辰紀、中山　景樹、
島田　健士、Susan Gasser[1]、○原田　昌彦（東北大院農・応生科、[1]Friedrich Miescher Inst.）
Yukako Oma, Hiroshi Kitamura, Yuichiro Takahashi, Masayuki Kusakabe, Tatunori Konishi, Keyaki Nakayama, Kenji Shimada[1], Susan Gasser[1], ○Masahiko Harata (Tohoku Univ., [1]Friedrich Miescher Inst.)

エピゲノムは、遺伝子の多様な発現調節を可能にしている。また、様々なシグナルを受容してゲノム機能を制御するというエピゲノム制御の特性は、栄養条件、温度、紫外線、放射線などのストレスに対する対応やゲノム安定性の維持においても重要な役割を果たしている。ゲノムとヒストンなどとの複合体であるクロマチンがエピゲノムの分子基盤となっているが、それに加えて、クロマチンと細胞核構造との相互作用やクロマチンの核内空間配置もエピゲノム制御に重要な役割を果たしている。

我々は、クロマチン・細胞核の分子構築を担う分子として、アクチンファミリーに注目して解析を行っている。アクチンファミリーは、アクチンとアクチン関連タンパク質（actin-related protein; Arp）によって構成されている。アクチンはその一部のみが細胞核に存在するが、6種のArpが核に集積しており、このことはアクチンファミリーの核における重要な機能を示唆している。これらの核内Arpはクロマチンリモデリング複合体やヒストン修飾複合体の構成因子となっており、さらにヒストン結合能やDNA結合能を有している。このような特性によって、核内Arpはクロマチン構造変換やその制御に関与している。実際に、Arpを欠損した培養細胞では、ストレス応答遺伝子などの発現が異常になるなど、細胞の環境対処能の低下が観察された。

さらに、これらの核内Arpは細胞核の構築にも関与する。出芽酵母を用いた解析により、核内Arpがリボソームタンパク質遺伝子や損傷DNAの核内空間配置に関与することが示され、また脊椎動物細胞でもArpのクロマチン核内空間配置への関与が見出された。これらのArp欠損細胞では、遺伝子発現の変化に加え、ゲノムの不安定化も観察された。

これらの結果は、細胞核内のアクチンファミリーが、クロマチンおよび細胞核機能構造の構築を介して、細胞のストレスやゲノム不安定性への対処マシナリーの一つとして機能していることを示している。

References

Oma and Harata, Nucleus 2, 38-46 (2011)
Yoshida *et al.*, PLoS Genet. 6, e1000910 (2010)
Shimada *et al.*, Curr Biol. 18, 566-575 (2008)

chromatin, epigenome, actin-related protein

講演番号：4SY12-2
講演日時、会場：3月25日14:05～ C校舎23会場

放射線誘発核内フォーカス形成のエピゲノム制御

Epigenomic regulation of the radiation-induced repair focus formation

○田代　聡、井倉　毅[1]（広大・原医研、[1]京大・放生研）
○Satoshi Tashiro, Tsuyoshi Ikura[1] (Hiroshima Univ., [1]Kyoto Univ.)

放射線の被ばくでは、さまざまなゲノム損傷が誘導される。これらのなかでも、DNA二本鎖切断は最も重篤なゲノム損傷であり、修復されない場合は細胞死が誘導される。一方、DNA二本鎖切断の修復エラーからは染色体転座などが形成され、このような遺伝情報の改変が被ばく数年から数十年後に認められるがんや白血病の発症に繋がると考えられている。

放射線などによるDNA二本鎖切断の修復には、ゲノム損傷応答や修復に関連する様々なタンパク質が関与している。放射線照射などにより活性化されたゲノム修復関連タンパク質は、損傷部位周辺に順次集積し、放射線誘発核内フォーカスと呼ばれる核内高次構造体を形成することが知られている。このような放射線誘発核内フォーカスを形成するタンパク質としては、損傷応答や修復に直接関連するATM、RAD51、53BP1などのタンパク質が知られている。しかし、放射線誘発核内フォーカス形成の制御機構については不明な点が多い。

放射線誘発核内フォーカスを形成するタンパク質としては、ゲノム修復タンパク質とともにゲノム損傷誘導後にリン酸化されたヒストンバリアントH2AXが形成するγ-H2AXフォーカスが知られている。さらに、γ-H2AXは、修復タンパク質を損傷部位に保持するために重要であることが示されている。最近、ゲノム修復には、γ-H2AX以外にもさまざまなヒストンのユビキチン化、アセチル化などの翻訳後修飾や、ヒストン交換反応によるクロマチン構造変換などエピゲノム制御が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

本発表では、放射線誘発核内フォーカス、特にRAD51フォーカス形成の分子機構研究の進展について我々の知見を含めて概説し、このような放射線誘発核内ドメインについての知見の放射線障害やがんの診断・治療開発など医療分野への応用の可能性を討論したい。

radiation, DNA double strand breaks, radiation induced repair foci

講演番号:4SY12-3
講演日時、会場:3月25日14:40～ C校舎23会場

DNAメチル化とシロイヌナズナ転移因子の動態

DNA methylation and transposon dynamics in Arabidopsis

○角谷徹仁（遺伝研）
○Tetsuji Kakutani (NIG)

ゲノムDNAにおけるシトシンのメチル化は、多くの真核生物で観察されるエピジェネティックな修飾である。植物のゲノムでは、メチル化されたシトシンの大部分はトランスポゾンなどの反復配列に分布し、機能する遺伝子のメチル化レベルは低い。

DNAメチル化の働きと制御機構を理解するため私達はシロイヌナズナを用いた遺伝学的なアプローチをとっている。クロマチン再構成因子DDM1 (decrease in DNA methylation 1)はトランスポゾンをメチル化するのに必要である。一方、遺伝子をメチル化しないためには、ヒストン脱メチル化酵素IBM1 (increase in BONSAI methylation 1)が必要である。これらのタンパク質をコードする遺伝子の変異体では、メチル化の変化にともなってさまざまな発生異常が観察される。これらの発生異常の遺伝解析から始まった我々の研究結果について話したい。

DNA methylation, transposon, centromere

講演番号：4SY12-4
講演日時、会場：3月25日15:15～ C校舎23会場

出芽酵母の飢餓応答とエピジェネティクス制御

Epigenetic regulation in response to nutrient starvation in budding yeast.

○湯川 格史、今村 優子、土屋 英子（広島大院先端物質・分子生命）
○Masashi Yukawa, Yuko Imamura, Eiko Tsuchiya (Hiroshima Univ.)

厳しい自然環境下において、生物は絶えず栄養源が枯渇する危険に曝されており、飢餓ストレスにどのように対処して生き延びていくかは生物にとって極めて重要な問題である。細胞が飢餓ストレスに曝されると、ストレスに対する抵抗性を身につけると同時に、生体分子のリサイクルを行いながら、最低限の栄養を確保して生き延びようとする。酵母のような真菌類の場合には飢餓ストレスに強い胞子に分化することで、栄養状態が改善されるまで休眠して生存する。このような飢餓ストレスに抗う多様な生存戦略を実行するために、細胞は遺伝子の発現パターンを適宜変化させて対処している。遺伝子発現調節において、エピゲノム制御を担うクロマチン再編因子の役割は極めて重要であり、ATP依存型再編因子とヒストン化学修飾酵素が互いに協調しながら働く事が知られているが、本シンポジウムでは栄養飢餓条件下における出芽酵母のクラスⅠヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の役割に焦点を当て、我々の最近の研究結果について紹介する。

出芽酵母は二倍体細胞を栄養飢餓条件の胞子形成培地に移すと減数分裂を開始して胞子を形成するが、その際には栄養増殖時に抑制されていた減数分裂遺伝子群の転写が必要なタイミングで誘導されなければならない。我々はこれまでに減数分裂初期遺伝子群の転写抑制に働くRpd3(クラスⅠ HDAC)が栄養飢餓条件においてもプロモーター上に局在し続けることを見出している。この意義について調べた結果、Rpd3はプロモーターに局在し続けることによって、周囲のヒストンがアセチル化されただけでは転写誘導が起こらないように他の転写因子と相互作用しながら転写を抑え続け、より厳格に発現のタイミングを調節していることがわかった。

また、*rpd3*ホモ二倍体欠損株は減数分裂中期遺伝子群の転写誘導に異常を来たし、第一減数分裂に進行できないため、胞子形成不能を示す。我々はこの表現型に着目して、中期遺伝子群の転写制御におけるRpd3の役割についても解析を行った。中期遺伝子群の転写誘導には、Hst1(クラスⅢ HDAC)-Sum1複合体によるMSE配列を介した転写抑制の解除と、Ndt80によるこの配列を介した転写活性化が必要である。詳細に解析した結果、Rpd3はMSE配列における転写抑制の解除と転写活性化の両方の制御に必要であることがわかった。HDACによる転写活性化の分子機構については不明な点が多く、この制御系におけるRpd3の役割について非常に興味が持たれる。

さらに、胞子形成培地に移した*rpd3*ホモ二倍体欠損株の生存率が野生株に比べて著しく低下することを見出した。しかし、この生存率低下は減数分裂の進行には依存せず、一倍体欠損株でも飢餓条件下の経時寿命を維持できないことがわかった。現在、飢餓応答による抗酸化酵素や熱ショック蛋白質の発現誘導、グリコーゲンの蓄積にRpd3が必要かどうか検証している。

以上の結果と他の研究者の成果も交え、飢餓条件下のクロマチン制御におけるHDACの新たな役割について議論したい。

epigenetics, histone deacetylase, HDAC

講演番号：4SY12-5
講演日時、会場：3月25日15:50～ C校舎23会場

ゲノム情報発現制御とエピゲノム制御の分子機構

Molecular mechanism of co-regulation in gene expression and epigenome

加藤　茂明　（東京大学・分子細胞生物学研究所）
Shigeaki Kato
(Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo)

真核細胞 DNA は、ヒストンタンパクに巻きつき、特徴的な染色体構造を形成している。最近染色体は、刻々とダイナミックに構造が変化し、遺伝子発現制御を染色体レベルで調節することが明らかになりつつある。このような染色体構造調節は、ヒストンコードとよばれる染色体ヒストンタンパク修飾の特異的組み合わせにより規定される仮説が支持されつつあり、エピゲノムの中核のひとつと考えられつつある。エピゲノムは、各種慢性疾患や、再生医学の進展に欠かす事のできない基盤的な知識となりつつある。

このようなゲノム情報発現制御におけるヒストンコードの重要性を検証するモデルシステムとして、核内受容体群による染色体構造調節やヒストン修飾の解析は、極めて有用である。核内受容体群は、ビタミン A,D をはじめとした、ステロイド/甲状腺ホルモン及エイコサノイド等の低分子量脂溶性生理活性物質を、リガンドとした転写制御因子である。これら核内受容体は、リガンド誘導性転写制御因子として転写共役因子複合体群と相互作用することで、標的遺伝子群の発現を転写レベルで制御する。これら転写共役因子複合体群の主たる機能は、染色体構造調節やヒストンタンパク修飾であることが、次々と明らかになってきている。更にこれら複合体は、各種シグナル因子と直接的・間接的に相互作用することで、他のシグナルとクロストークすることを我々は明らかにした。しかしながらこれら複合体の構成因子群の性状や、染色体構造制御複合体との関連など、不明な点が極めて多いのが現状である。本講演では、核内ビタミン A(レチノイド)受容体の転写制御を担うヒストンメチル化酵素複合体の糖修飾による活性化制御（Nature 459, 455, 2009a）やビタミンＤ受容体による転写抑制複合体（Nature, 461,1005, 2009b）による例を紹介することで、核内脂溶性ビタミン受容体による新たな遺伝子発現制御の分子機構について触れたい。

gene expression, chromatin reorganization, nuclear receptors

講演番号：4SY13-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ C校舎09会場

Raiding the SWEET shop – how pathogens gain access to the plants nutrient resources

Li Qing Chen, Xiao Qing Qu, I Lin, Davide Sosso, Frank White[1], Alexander Jones, Sue Rhee, Maria Sardi, Sam Parsa, Erika Valle, and ○Wolf B. Frommer
Carnegie Institution for Science, Stanford, CA; [1]Kansas State University, Manhattan, KS

Plants require sugar efflux transporters to support root, seed and pollen development, produce nectar and nurture beneficial microorganisms in the rhizosphere. Animals require efflux transporters for maintenance of blood glucose levels. The identity of these efflux transporters has remained elusive. Using FRET sensors, we identified a novel class of sugar transporters (SWEET). Arabidopsis SWEET1 and 8 function as glucose uniporters, mediating both import and export of sugars. The paralogs OsSWEET11/Os8N3 and AtSWEET8/RPG1 are essential for pollen viability. Fungal and bacterial pathogens modulate mRNA levels of different *SWEET*s to co-opt sugar transport activity. Specific TAL effectors directly target the promoter of OsSWEET11 and OsSWEET14. Mutation of OsSWEET11 or OsSWEET14 lead to bacterial blight resistance. SWEETs are thus essential for pathogen nutrition. We will present data on the function of various SWEETs in both uninfected plants and plants infected with various pathogens.
The sugar transport activity is conserved in metazoan homologs, making them prime candidates for roles in cellular efflux of glucose from intestinal or liver cells. This hypothesis is currently under investigation.
In parallel, we have carried out a large-scale membrane protein/signaling protein interactome study. A screen of 6.4 million Arabidopsis protein pairs using the yeast split ubiquitin system is now complete. The screen included over 3,300 unique genes and is the first of its kind in any organism to focus on membrane and signaling proteins. Statistical analyses of yeast growth data have resulted in the selection of a network of over 10,000 unique Arabidopsis PPI termed Membrane-protein Interaction Network Database (MIND), and available at Associomics.org. Retesting of subsets of MIND interactions using multiple yeast split-ubiquitin assays and an Arabidopsis split-luciferase system demonstrates the robust reproducibility of the data. Network analysis shows that the MIND interactions are mostly novel and will greatly strengthen predictive power over still obscure plant genomes.
Currently, SWEET interactors are being identified and tested for potential roles in signaling and regulation of sugar flux.

FRET sensor, fluorescence, transport

講演番号：4SY13-2
講演日時、会場：3月25日14:05～ C校舎09会場

Title

Long-distance control of nodulation

○Masayoshi Kawaguchi（National Institute for Basic Biology）

【Introduction】To keep the symbiotic balance with rhizobia, legumes evolved specific mechanisms to control the nodule number in response to internal and external cues. An important internal cue is a feedback regulatory system involving long-distance signaling also known as autoregulation of nodulation (AON). AON is believed to consist of two presumptive long-distance signals, i.e., the root-derived and shoot-derived signals. The root-derived signal is thought to be generated in roots in response to rhizobial Nod factors and then translocated to the shoot, while the shoot-derived signal is generated in shoots and then translocated to the root to restrict further nodulation. The aim of this study is to elucidate the molecular mechanism for AON.

【Methods】Using *Lotus japonicus* ecotypes, Gifu B-129 and Miyakojima MG-20, we conducted an extensive screening of symbiotic mutants defective in AON and characterized their phenotypes. To identify the root-derived signal we performed an in silico search of *L. japonicus* genome database.

【Results】 We have isolated *har1, klavier*, *too much love* (*tml*) and *plenty* hyper-nodulation mutants. Grafting experiments revealed that HAR1 and KLAVIER function in the shoot while TML and PLENTY in the root. *HAR1* encodes a LRR receptor-like kinase that shows the highest similarity with Arabidopsis *CLV1* that maintains shoot apical meristem by receiving a CLE peptide derived from the stem cell region. *KLAVIER* is also indispensable for AON signaling and encodes a LRR receptor-like kinase. The mutation exhibits stem fasciation as well as hyper-nodulation phenotype. On the other hand, TML is likely to function downstream of HAR1, possibly as a receptor or a mediator of the as-yet unidentified shoot-derived signal.

Next we searched for the root-derived signal. An in silico search of *L. japonicus* genome database led to identify 39 *CLE* genes. *CLE* genes encode a small secreted peptide. Among them, two CLE genes (*LjCLE-RS1, -RS2*) are strongly up-regulated in roots in response to Nod factor of *Mesorhizobium loti.* A hairy root transformation study showed that the *CLE-RS1/2* overexpression inhibits nodulation systemically in HAR1 and KLAVIER-dependent manner. Moreover, *CLE-RS2* is strongly up-regulated in roots by nitrate addition. Based on these findings, we propose a model for AON mediated by CLE-RS1/2 peptides and the HAR1-KLAVIER receptor-like kinases.

Nodulation, Long-distance signaling, CLE peptides

講演番号：4SY13-3
講演日時、会場：3月25日14:40～ C校舎09会場

Plant-specific ALMT transporter family regulates multiple physiological functions

○Takayuki Sasaki, Izumi C. Mori, Takuya Furuichi[1], Yoshiyuki Murata[2], Yoko Yamamoto (Ins. Plant Sci. Resources, Okayama Univ., [1]EcoTopia Science Ins., Nagoya Univ., [2]Grad. School Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

Malate is an important metabolite in all organisms, such as an intermediate product in TCA cycle. In plant cells, malate is mainly accumulated in vacuoles, and regulates osmotic balance and the detoxification of metals by chelation.

We identified for the first time the *ALMT* gene conferring aluminum (Al) resistance in wheat. Toxic Al^{3+} ion is a major constraint on crop production in acidic soils. The *ALMT* gene expressed dominantly in root apex of Al-resistant wheat lines. The analyses using heterologous expression systems demonstrated that the gene encodes Al-activated malate transporter, hence the gene named as the *ALMT1*. ALMT1 protein consists of six transmembrane domains with the hydrophilic carboxyl-terminal (CT)-domain which is located on the extracellular side of the plasma membrane, and that the acidic amino acids (E274, D275 and E284) on the CT-domain are necessary for Al activation.

Several *ALMT* homologues have been identified but only in plant spices. All the homologues characterized so far encode transporters of malate and/or inorganic anions and are localized in the plasma membrane or tonoplast. *Arabidopsis thaliana* possesses 13 *ALMT* homologues and we have recently characterized the *AtALMT12*. The *AtALMT12* is expressed in guard cells and necessary for stomatal closure induced by abscisic acid, calcium or dark-treatments. However, it seems that AtALMT12 transporter is not related to rapid- and slow-type anion channels, major characteristics in anion flux for stomatal closure, although other groups reported that AtALMT12 is rapid-type anion channel.

In summary, ALMT proteins comprise a diverse family of anion channels/transporters in plant kingdom. Comparative study of the *ALMT* homologues reveals that CT-domains are variable regions, while the homology of N-terminal transmembrane regions are relatively conserved among them. These structures suggest that the CT-domain of each ALMT might be related to unique physiological functions and subcellular localizations. Further characterization of ALMT homologues will elucidate important functions related to plant specific physiology.

ALMT, Malate, Transporter

講演番号：4SY13-4
講演日時、会場：3月25日15:15～ C校舎09会場

Molecular diversity of zinc transporters in plants

Miki Kawachi[1], Sayaka Kogawa[1], Yoichiro Fukao[2], Ute Kraemer[3], Natsuki Tanaka[1], ○Masayoshi Maeshima[1] ([1]Nagoya Univ., [2]NAIST, [3]Ruhr-Univ. Bochum, Germany)

Zinc is an essential component of the functional structure of numerous enzymes and regulatory proteins and is involved in the functional regulation of enzymes and membrane transport systems as a messenger in intracellular signaling. Even though Zn is an essential cofactor for many enzymes and proteins, excessive amounts of Zn disturbs the balance of metals elements in cells and is harmful to the plants. Excessive absorption of Zn suppresses absorption of Fe and Cu by plant roots (1). Excess Zn concentrations cause chlorosis and growth disorders in plants. Thus, to ensure Zn homeostasis, transporters act in coordination to mediate cellular import and export of Zn and distribution between cell organelles.

The transport machinery responsible for uptake and export of Zn has been identified and its intracellular localization has been studied. Transporters implicated in Zn transport include members of the metal tolerance protein (MTP), ZRT1/IRT1-like protein (ZIP) and heavy metal ATPase (HMA) families. ZIP is a passive transporter that facilitates the “downhill” flow of Zn until its electrical and/or concentration gradient is dissipated. HMA actively transports Zn using energy provided by ATP hydrolysis. In this symposium, we talk these transporters, particularly vacuolar membrane MTP1, which is localized in the vacuolar membrane and functions as a H+/Zn2+ exchanger.

Arabidopsis MTP1 is involved in detoxification of excess Zn in the cytosol. The loss-of-function *atmtp1* plants have a low Zn content and more sensitive to high Zn levels compared with the wild-type plants (2,3). AtMTP1 has six transmembrane (TM) domains and a long His-rich region between TM4 and TM5. The His-rich region, which is lack in *E. coli* orthologous metal transporter YiiP, is involved in regulation of transport activity of AtMTP1 (4). In addition to the His-rich region, AtMTP1 has the long C-terminal tail and the unique N-terminal region. We discuss biochemical and physiological roles of the motifs in sensing and transport of Zn in plant cells.

(1) Fukao et al. (2011) Plant Physiol. 155, 1893-1907. (2) Kobae et al. (2004) Plant Cell Phyiol. 45, 1749–1758. (3) Kawachi et al. (2010) Plant Cell Physiol. 50, 1156–1170. (4) Kawachi et al. (2008) J. Biol. Chem. 283, 8374–8383.

Vacuole, zinc transporter, zinc homeostasis

講演番号：4SY13-5
講演日時、会場：3月25日15:50～ C校舎09会場

Strigolactone function and action

○Shinjiro Yamaguchi (Tohoku Univ., RIKEN PSC)

Strigolactones (SLs) are a group of teropenoid lactones that are released from roots and were first discovered in the 1960s as germination stimulants of root parasitic plants, such as witchweeds (*Striga* spp.) and broomrapes (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.). SLs released from roots also act as host recognition signals for symbiotic arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, which assist the uptake of water and mineral nutrients by the host plant. Thus, SLs released to the rhizosphere are allelochemicals that act in parasitism and symbiosis. More recent studies have shown that endogenous SLs function as a new class of hormones that inhibit shoot branching. This discovery had started to allow us to identify key components in the SL biosynthesis and response pathways using increased shoot branching mutants that are deficient in or insensitive to SLs. Previous grafting experiments have suggested that SL or SL-derived hormone generated in the root can move upwardly to inhibit axillary branching in the shoot. Therefore, SLs appear be a mobile hormone, which also is secreted from roots to the rhizosphere for their allelochemical functions.

SL-deficient mutants have been useful for studying the role of SL in parasitic and symbiotic interactions with root parasites and AM fungi, respectively. Our previous studies suggested that SL-deficient mutants might be beneficial for generating *Striga*-resistant crops, because much fewer *Striga* seeds germinated in the vicinity of SL-deficient rice mutants at least in an experimental condition. However, SL-deficient mutants also have undesirable traits in agriculture, including reduced symbiosis with AM fungi and the production of too many shoot branches (tillers). To explore the potential usefulness of SL-deficient mutants as starting materials to generate *Striga*-resistant crops, we are currently studying whether we can selectively control SL action on root parasites, AM fungi and as endogenous plant hormones. As a first step towards this goal, we've been studying the similarities and differences in SL structural requirements between *Striga*, AM fungi and rice.

plant hormone, strigolactone, rice

講演番号：4SY13-6
講演日時、会場：3月25日16:25～ C校舎09会場

Membrane transporters involved in translocation of nicotine in *Nicotiana tabacum*

Nobukazu Shitan[1,2], Shota Minami[2] Masahiko Morita[1], Shingo Ito[1], Alain Goossens[3], Dirk Inzé[3], ○Kazufumi Yazaki[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Kobe Pharm. Univ., [3]Ghent Univ.)

Plant alkaloids are a functional small molecules containing N atom. They exhibit a variety of biological activities, such as anti-tumor, anti-bacterial, anti-malarial, and analgestic activities, and thus some of them are utilized as medicines in clinical field. For plants, these functional small molecules are thought to play defensive roles against pathogens and herbivores. It is often observed that alkaloids are accumulated in a specific organ or tissues in plant body, and in some particular cases alkaloids are translocated from source cells to sink organ. Nicotine, a pyridine-type as well as pyrrolidine-type alkaloid, is a model of those alkaloids transported in a long distance in plant body.

Nicotine plays a role of protectant against insect attack in tobacco plant. This alkaloid is known to be biosynthesized in root tissues of *Nicotiana* species, but mainly accumulates within the vacuoles of leaves, in which xylem transport system is involved. However, its membrane transport is still largely unknown. Recently, AFLP-based transcriptome analysis of methyl jasmonate-treated tobacco BY-2 cells revealed that expression of some transporter genes (Nt-JAT1, C215, T408, and T449) was highly up-regulated in a coordinate manner with the alkaloid biosynthetic genes. Characterization of Nt-JAT1 (*N. tabacum* jasmonate-inducible alkaloid transporter 1), belonging to the family of multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporters, suggested that Nt-JAT1 played an important role in the nicotine translocation by acting as a secondary transporter at leaf vacuoles. These data suggested that this MATE-type transporter is responsible for unloading of alkaloids in the aerial parts and deposition in the vacuoles.

As the second transporter, we have analyzed C215, which also belongs to MATE transporter family, to find that C215 is specifically expressed in leaves under methyl-jasmonate treatment. Functional analysis using yeast cells revealed the nicotine efflux activity for C215. Membrane localization analysis was done with C215-GFP expressed in BY-2 cells, indicating that this protein was localized to the tonoplast. We are analyzing the biological function of C215. The third member T408, which belongs to nucleobase cation symporter-1 family, is under investigation and its biochemical properties will be discussed in the symposium.

nicotine, transport, MATE

講演番号：4SY14-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ C校舎10会場

無細胞タンパク質合成系を用いた脂質修飾タンパク質の網羅的探索法の確立とその応用

Comprehensive analysis of lipid modifications of proteins using cell-free protein synthesis system

○内海俊彦（山口大院・医）
○Toshihiko Utsumi (Yamaguchi Univ.)

無細胞タンパク質合成系は、DNA あるいは RNA を鋳型としてタンパク質を試験管内で合成する手法であり、プロテオーム解析におけるハイスループットなタンパク質発現手段として威力を発揮している。ウサギ網状赤血球ライセートにミクロソーム膜を添加した無細胞タンパク質合成系を用いて、シグナルペプチドの切断、膜タンパク質の膜挿入、N-グリコシル化といったタンパク質修飾が検出できることは古くから知られていた。しかし、その他の多くのタンパク質翻訳後修飾の解析に無細胞タンパク質合成系が有用であることは意外に知られていない。我々は、生理的に極めて重要な機能を有するにも関わらず、リン酸化、グリコシル化、ユビキチン化といった翻訳後修飾と比較し、その解析が遅れているタンパク質脂質修飾に注目した。本シンポジウムでは、タンパク質合成と共役して生ずる典型的な脂質修飾である N-ミリストイル化、プレニル化を中心に、我々が無細胞タンパク質合成系を用いて行った脂質修飾の解析結果について紹介する。

ウサギ網状赤血球ライセート、あるいは昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系において、RI-標識基質存在下で目的遺伝子 mRNA を翻訳させ、SDS-PAGE 後フルオログラフィーにより解析した結果、細胞では発現しない高分子量のタンパク質や膜貫通タンパク質、細胞毒性を有するタンパク質を含む多くのタンパク質において、容易に N-ミリストイル化、プレニル化が検出された。また、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系で合成した脂質修飾タンパク質を質量分析に供与することで、修飾部位、修飾基の同定を含む詳細な解析が可能であることが示された。これらの手法を用いて、N-ミリストイル化を指令する N-ミリストイル化シグナルの解析を行った結果、これまで知られていなかった新たなアミノ酸配列要求性が明らかになるとともに、N-ミリストイル化は、もう一つの異なる N-末端修飾である N-アセチル化により大きく影響を受ける事が示された。さらに、これらの解析手法を、アポトーシス過程でカスパーゼ基質 Bid に生じ、アポトーシスの進行に重要な役割を果たすことが明らかになった翻訳後 N-ミリストイル化反応の解析に応用した結果、アクチンやゲルゾリンといった細胞骨格系タンパク質がカスパーゼ切断に伴い翻訳後 N-ミリストイル化され、この修飾を介してこれらのタンパク質がアポトーシス制御に関与することが示された。また、同様の手法を用いてヒト cDNA リソースから N-ミリストイル化タンパク質の網羅的探索を行った結果、約 2,000 個のヒト cDNA から、18 個もの新規 N-ミリストイル化タンパク質が見出され、これらの中に多数の疾患関連タンパク質が含まれる事が明らかになった。

これらの結果から、cDNA リソースと無細胞タンパク質合成系を用いた解析手法は、脂質修飾反応自体の詳細な解析からゲノム中に存在する脂質修飾タンパク質の網羅的同定に至る広範囲な脂質修飾の解析に極めて有効な手段であることが示された。

Cell-free protein synthesis, posttranslational modification, lipid modification

講演番号：4SY14-2
講演日時、会場：3月25日14:00～ C校舎10会場

無細胞膜組込み系を用いたTail-anchor型膜タンパク質とマルチスパン膜タンパク質の解析

Study of Membrane Insertion of Tail-Anchored Proteins and Multispan Membrane Proteins by Cell-Free Translation and Translocation Systems

佐藤 陽子、相澤 圭師、三島 枝里子、江連 徹[1]、安藤 英治[1]、阪口 雅郎[2]、○魚住 信之
（東北大・院工、[1]（株）島津製作所、[2]兵庫県大・院生命理）
Yoko Sato, Keishi Aizawa, Eriko Mishima, Toru Ezure[1], Eiji Ando[1], Masao Sakaguchi[2], ○Nobuyuki Uozumi
(Tohoku Univ., [1]Shimadzu Co., [2]Univ. of Hyogo)

膜タンパク質の構造と機能解析は生物化学分野における重要な課題であり、膜タンパク質の無細胞膜組込み系は強力な解析法の一つとなっている。一方、界面活性剤存在下で合成した膜タンパク質のリポソームへの再構成も行われている。この方法と比較して、無細胞膜組込み系は、正しく折りたたまれた構造を有する膜タンパク質を高い効率で生産する特徴を持つ。真核生物の小胞体膜には少なくとも2種類の膜タンパク質形成装置が存在している。一つはGuided Entry of TA-protein 複合体(GET複合体)であり、もう一つはトランスロコン(SecY/Sec61複合体)である。真核細胞の膜タンパク質の無細胞翻訳・膜組込み系は、1966年にSabatiniらが小胞体膜の単離に成功した後、Blobelらがイヌ膵臓由来の小胞体膜で達成した方法が長く使われてきた。最近では、昆虫培養細胞から調製した翻訳系((株)島津製作所Transdirect)に同じく昆虫培養細胞から精製した小胞膜画分をカップリングした無細胞膜組込み系が開発されている。本発表では、これらの無細胞翻訳・膜組込み系を用いた膜タンパク質の形成に関する知見を紹介する。

TAタンパク質(シナプトブレビン)の膜組込み： Tail-anchored protein(TAタンパク質)は、その名の通りC末端領域に膜貫通部位を1つ有する膜タンパク質であり、そのN末端領域にはTAタンパク質の大部分を占める細胞質ドメインが存在する。TAタンパク質の膜組込みには、GET複合体依存型と非依存型の二種類の経路が存在し、GET複合体依存的に組込まれるTAタンパク質は、細胞質中のリボソームで全長が合成された後に標的化因子である2量体Get3とGet3-TAタンパク質複合体を形成し、小胞体膜上のGet1/2受容体に移行して膜組込みすると考えられている。GET複合体依存的に組込まれるタイプのTAタンパク質であるヒト由来シナプトブレビン2の場合、膜貫通領域周辺のアミノ酸の電荷数に依存して膜組込み効率が変化することから、この電荷アミノ酸がGet3-TAタンパク質複合体形成や膜挿入に影響を与えることが予測される。

マルチスパン膜タンパク質(イオンチャネル)の膜組込み： 膜タンパク質の大多数を占めるマルチスパン膜タンパク質は、合成中にシグナル認識粒子(SRP)によって認識された後、トランスロコンに移行して小胞膜へ組込まれる。微生物、植物、動物のイオンチャネル(KvAP、KAT1、Kir2.1、ShakerB)は、マルチスパン膜タンパク質の一つである。疎水性が高いにもかかわらず膜貫通しないイオン透過孔領域や、電荷アミノ酸に富むにも関わらず膜貫通する膜電位センサー領域が存在する。一般にN末端側の膜貫通領域から膜挿入が開始されるが、Kチャネルの膜組込みにおいては、これに従わない性質が見いだされており、疎水性による推測では予測できない膜貫通構造形成様式が存在することが明らかとなった。

tail-anchored protein, voltage-sensor insertion, ion channel

講演番号:4SY14-3
講演日時、会場:3月25日14:30～ C校舎10会場

PURE systemでバイオシステムを作る

Creation of biosystems by the PURE system

上田卓也（東大・新領域）
Takuya Ueda(Univ. Tokyo)

生命は、分子から構成された絡繰り人形ということができる。絡繰り人形の部品が蛋白質であり、そのアミノ酸配列を記載した設計図がDNAである。私達の研究室では、大腸菌の翻訳システムを構成する因子を精製し、再構築した無細胞蛋白質合成系PURE systemの開発に成功した。このシステムを基盤として、部品である蛋白質を無細胞で合成し、生命システムを試験管内で実験的に再現することに取り組んでいる。最終的な目標は、人工細胞をPURE systemを用いて合成することにある。

この目標のためには、高品質な蛋白質を合成することが必要不可欠である。PURE systemと蛋白質の構造形成に関与するシャペロンとの融合システムを用いて、細胞内での蛋白質の折れ畳みのプロセスの再現させることで、シャペロンネットワークの解析を進めている。大腸菌の全蛋白質遺伝子をPURE systemで網羅的に合成し、その凝集特性を解析することでシャペロン依存性が明らかになりつつある。また、膜への挿入プロセスに関与する因子群を単離し、翻訳プロセスと共役させることで、脂質二重膜に効率よく膜蛋白質を合成することに成功している。生命現象のメカニズムの多くのものは、細胞膜で進行するため、この再構築型の膜蛋白質合成システムにより、機能する人工細胞の創製が可能になると考えている。

また、PURE systemを基盤としたリボソームディスプレー法の開発を進めているが、この手法は蛋白質の重要な特徴である高い分子認識能とアミノ酸配列の相関を解明する新たなツールである。リボソームディスプレー法は、大きな配列空間を取り扱え、分子認識能を有する蛋白質をランダムな配列の中から収斂進化をさせることが可能である。アミノ酸配列は膨大な可能性があるが、その中から機能を持った蛋白質がどのように出現したのか、というプロテインワールドの出現の謎を解明する足がかりとなるはずである。またこの技術は応用面においても、新規また人工的な抗体医薬品を開発するための基盤技術としても有望と考えている。

生命は蛋白質などの生体高分子から構成されている。バイオシステムを構成する蛋白質群を試験管内で合成できれば、これらの蛋白質の自己組織化により細胞のシステムを創出することが可能となると期待できる。私達は、大腸菌の蛋白質合成系を試験管内で再構築することに成功した。この再構成型無細胞蛋白質合成系PURE systemを用いたバイオシステムの無細胞合成を進めている。現在までに、ATPaseなどのバイオシステムの合成が可能であることも示された。さらに、合成生物学的アプローチの一環として、tRNA群の再構築による遺伝暗号表の再構成や、リボソームの再構築についての取り組みについても報告をする。

translation, ribosome, membrane

講演番号：4SY14-4
講演日時、会場：3月25日15:00～ C校舎10会場

無細胞タンパク質合成系を用いたライブラリー構築技術の開発と応用

Development and Application of Protein Libraries using Cell-Free Protein Synthesis Systems.

○中野秀雄、兒島孝明（名古屋大・生命農）
○Hideo Nakano, Takaaki Kojima (Nagoya Univ.)

無細胞蛋白質合成系は、細胞抽出液中に存在するリボソームや翻訳因子、tRNA などの諸因子の働きにより、DNA あるいは mRNA からその遺伝子産物を生合成させるシステムであり、１）反応系の制御が容易である、２）PCR 産物を鋳型としてタンパク質を合成できる、３）細胞毒性を示すようなタンパク質の合成が可能である、４）非天然アミノ酸の導入が容易である、５）スケーラブルな反応系であり、L スケールからから pL スケールまで同一の反応システムで蛋白質を合成できるなど、生細胞による合成系とは異なる様々な利点が存在する。

これまで我々はこの無細胞蛋白質合成系と、様々な PCR 技術を組み合わせ、様々なライブラリー構築技術を開発してきた。まず一分子 PCR と無細胞タンパク質合成系を組み合わせ、DNA 一分子からプレート上にライブラリーを構築する SIMPLEX(Single-Molecule PCR-linked in vitro Expression) 法を開発し、DNA 一分子をからの PCR 技術と組み合わせ、マイクロプレート上にタンパク質ライブラリーを構築する技術を開発し、酵素の進化分子工学などへ応用した。また細胞１個由来の mRNA を特異的に増幅する技術である SICREX(Single Cell RT-PCR linked in vitro Expression)法を開発し、B 細胞１個から、迅速にモノクローナル抗体を取得することに成功した。本手法はヒト、マウス、ウサギなど様々な動物由来のモノクローナル抗体取得法として利用可能である。

さらに我々は、独自に 1kb 以上の一分子 DNA をビーズ上に固定化できるエマルジョンＰＣＲの技術を確立し、転写因子の結合配列解析に用いた 3)。そのスケーラブル性を生かして、エマルジョン中の微小液滴(約１ｐL)中での無細胞蛋白質合成反応を組み合わせ、DNA とそれがコードするペプチドや蛋白質をマイクロビーズ上へのディスプレイ技術を開発した。本手法は簡単に膨大なライブラリー（１０の１２乗以上）を簡単に構築することができ、セルソーターを用いることで、種々の解析およびスクリーニング法をハイスループット（１０の７乗以上／時間）に行うことができる。この手法は親和性に基づいたアッセイ法でなく、酵素の活性を指標としたハイスループットスクリーニングが可能であり、今後様々な酵素の進化分子工学などへの応用が期待されている。

Cell-free protein synthesis, high-throughput screening, emulsion PCR

講演番号：4SY14-5
講演日時、会場：3月25日15:30～ C校舎10会場

無細胞タンパク質合成系を利用した膜輸送体の機能解析

Functional analysis of membrane transporters based on cell-free protein expression system

○戸澤 譲（愛媛大・無細胞セ）
○Yuzuru Tozawa (Ehime Univ)

無細胞タンパク質合成系は、開放系であるその特性を活かし、様々な工夫を施すことが可能なインビトロ技術である。今回は、我々の取組みの一つ、コムギ無細胞タンパク質合成系を利用した膜輸送タンパク質の機能解析技術開発の取組みについてご紹介する。

生体膜は、その疎水領域がバリアとなり膜内外の溶質の移入および放出を厳密に制限する性質を有するため、生体内の物質循環は各溶質に対応する膜輸送装置によって制御される。従って、創薬、代謝工学など応用の視点からも膜輸送系タンパク質の機能解明は極めて重要な基礎研究である。生物のゲノム中には極めて多種類の膜輸送タンパク質が存在するが、それらの多くの機能が未解明のままである。これは、生体からの膜輸送タンパク質の単離・精製自体が技術的に困難を伴うことに加え、組換え微生物を利用する膜輸送タンパク質発現もしばしば宿主に対し生理学的に悪影響を及ぼすなどの理由により、機能解析の効率が低いためである。

膜輸送タンパク質は膜貫通領域を複数有し、膜内にこれらの領域が配置する形で機能的構造を取る。従って、水系で機能構造を形成しやすい親水性タンパク質とは大きく異なり、機能的な構造の形成を促す、あるいは維持するためには、その疎水領域の保護および構造形成促進に工夫を要する。我々の研究室では、生物種を問わずに優れたポリペプチド合成効率を実現できるコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を利用し、まず始めに界面活性剤や人工脂質二重膜の至適添加条件の探索より膜輸送タンパク質の可溶化合成系を構築した。さらに、大豆由来の脂質であるアゾレクチンから調製したリポソームに膜輸送タンパク質を組込み、解析用の基質を封入したプロテオリポソーム再構成系によるトランスポーターの機能解析系構築を進めた。これまでに植物葉緑体内膜の糖リン酸／リン酸交換輸送体、マラリア原虫および植物のミトコンドリア内膜のTCA経路の基質輸送体などの機能再構成に応用し、個々のオルガネラ膜輸送タンパク質の基質特異性を明らかにしてきた。最近では、バクテリアのプロトンポンプや、植物原形質膜のカリウムチャネルKAT1について、界面活性剤添加による効率的な可溶化合成・精製系の構築も進め、リポソームあるいは脂質平面膜への再構成を試み、これらの無細胞合成した精製膜輸送タンパク質の機能が再構成可能であることを確認した。バクテリオロドプシンについては光依存的なプロトン輸送活性を、KAT1に関しては電圧依存的なカリウムイオン電流を観察している。

これらの結果は、コムギ無細胞タンパク質合成系が、様々な種類の膜輸送タンパク質の合成、精製、機能再構成を可能にする汎用性の高いシステムであることを示している。

Cell-free protein synthesis, membrane transporters, wheat embryo extracts

講演番号：4SY14-6
講演日時、会場：3月25日16:00～ C校舎10会場

コムギ無細胞タンパク質合成法の開発とその応用

RIBOENGINE: Wheat germ cell-free protein production system for post-genome research

○遠藤 弥重太（愛媛大・無細胞セ）
○Yaeta Endo (Ehime Univ)

ゲノム情報を生命科学研究や医療・産業分野で活用するためには、先ず、蛋白質を生産・調製してその機能や構造を解明することが不可欠です。しかし、従来の組換え生産法では、生細胞系の原理的な限界から自由自在に蛋白質を調製することが困難であることの他にも幾つかの欠点があり、ポストゲノム研究に対応できる汎用的な蛋白質生産法の開発が課題となっていました。

我々は、細胞毒素のリボソーム不活性化機構の研究からヒントを得て、無細胞系の欠点であった翻訳反応の不安定性を解決することに成功し、高品質タンパク質のハイスループット生産が可能なコムギ胚芽無細胞技術を確立しました。

本シンポジウムではタンパク質を自由自在且つバイオハザードや生命倫理問題もクリアーした本技術の特色から、遺伝子産物の機能解析、タンパク質ネットワーク解析、バイオマーカー探索、医薬品開発、構造生物学研究等への応用の現状について紹介するとともに、無細胞技術の可能性について展望させていただきます。

参考文献：Y. Endo et al., Curr. Opin. Biotech., 17, 373 (2006), N. Goshima et al., Nature Methods, 5(12), 1011(2008), K. Takai et al., Nature Protocol, 5(2), 227 (2010))

Cell-free protein production, post-genome research

講演番号：4SY15-1
講演日時、会場：3月25日13:35～ C校舎20会場

ピレトリンとボラタイルセンシングによる植物恒常性の維持

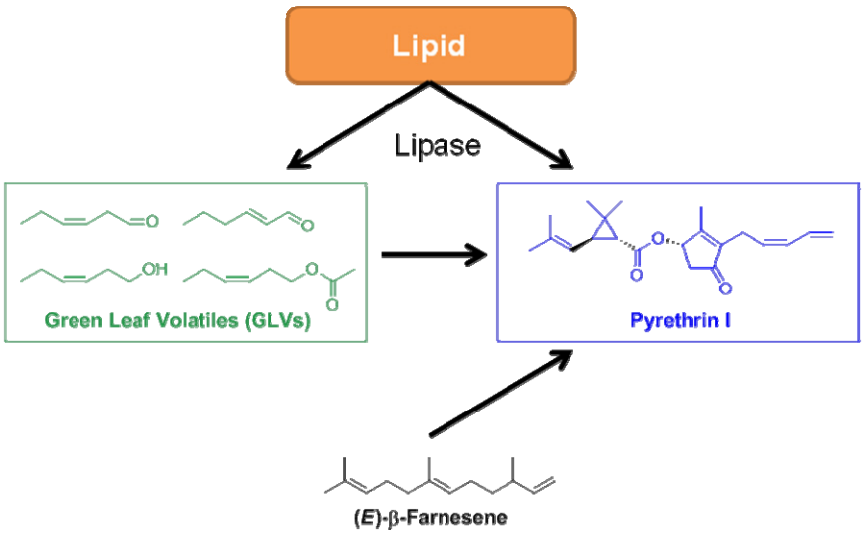
Pyrethrins and maintaining plant homeostasis by volatile sensing

○松田一彦（近畿大院・農・応生化）
○Kazuhiko Matsuda (Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agric., Kinki Univ.)

脂質は生命を一つの閉じた系として維持する膜をつくる役割と同時に，自身からシグナル分子をつくる役割も演じている．脂質から派生した分子の多くは細胞内に拡散し生命の恒常性を維持するために種々の細胞応答を誘起するが，中には細胞外に放出されることで機能を発揮するものも存在する．

演者らは，後者の例として植物のみどりの香り(Green Leaf Volatiles (GLVs))を取り挙げ，それを受容した除虫菊でのピレトリン生合成の調節について研究した．GLVs とピレトリンはどちらも脂質を起源としてつくられる．すなわち，GLVs は脂質のリノレン酸部が過酸化され，次いで hydroperoxide lyase によって開裂されることで生成するのに対して，ピレトリンは MEP 経路で生じるシクロプロパンカルボン酸と，GLVs と共通の経路で脂質からつくられるアルコール部とが縮合することで生成する．除虫菊の幼苗は傷害応答的に GLVs と（*E*）-β-farnesene を主要な揮発性分子として放出する．そこで，これらの揮発性シグナル分子によるピレトリン生合成の調節機構について調べた結果，これらの揮発性シグナル分子の比率が除虫菊から放出されるブレンド比のときにはじめてピレトリン生合成が活性化することを発見した．

演者らはさらに，ピレトリン生合成の最終ステップを触媒するアシルトランスフェラーゼ活性の本体を除虫菊から単離し，遺伝子を獲得した．本酵素はリパーゼ！であり，加水分解活性のみならずピレトリン合成活性もあわせて呈した．



Airborne signals, Green leaf volatiles, Pyrethrins

講演番号：4SY15-2
講演日時、会場：3月25日14:05～ C校舎20会場

揮発性オキシリピンによる植物の生態系での生存戦略

Plants’ strategy to thrive in an ecosystem with volatile oxylipins

○松井 健二（山口大・院医）
○Kenji Matsui (Yamaguchi Univ.)

脂肪酸酸化代謝物（オキシリピン類）は動植物の恒常性維持を担う生理活性物質である。そのうち、ヘキセナールなどの揮発性オキシリピンは植物特異的であり、植物特有の「みどりの香り」の原因物質でもある。これまでの検討から、揮発性オキシリピンの中でもヘキセナールなどのアルデヒド類が植物の病虫害に対する直接防衛物質として機能していることを明らかにした。しかし、植物はヘキセナールだけでなく還元体のヘキセノールや、ヘキセノールが更にアセチル化されたヘキセニルアセテートを生成する。還元、アセチル化には還元力とアセチルCoAを必要とすることから、植物はコストをかけて揮発性オキシリピンの多様性を高めている。

シロイヌナズナを用いた検討から食害を受けた組織で生成されたヘキセナールが周辺の無傷組織に浸潤することが明らかになった。こうして浸潤したヘキセナールは植物自身にとっても毒性を示すため、植物はヘキセナールに特異性の高い還元酵素を用いて毒性の低いアルコール体へと変換していることが示された。ヘキセノールのアセチル化は揮発性を高め、植物体外への放散を一層促進する。こうして植物から揮発性オキシリピンのブレンドが生態系に放散されることとなったと考えられる。放散された揮発性オキシリピンは植物を取り巻く生物達に受容され、その結果として揮発性オキシリピンを介した生物間ネットワークが構築されてきた。

揮発性オキシリピンは周辺の植物によっても受容され、将来の生物的ストレスへの防衛能力の強化を促す。私たちはトマト植物が漂ってきたヘキセノールを組織内に取り込み、それを配糖体化して蓄積することを明らかにした。こうして蓄積されたヘキセノール配糖体は草食昆虫に毒性を示した。つまり、植物の揮発性オキシリピン受容機構のひとつは体外からの取り込みと配糖体化である。一般に配糖体化は生体異物の解毒プロセスである。このことから、ヘキセノールの配糖体化も本来は解毒プロセスであり、この場合はその産物に予期せぬ効果が認められたため強化されてきたプロセスであると考えられる。

植物の揮発性物質を介した生存戦略は多岐に渉るが、私たちの検討結果は、揮発性オキシリピンによる戦略（ここでは還元／アセチル化と配糖体化を示した）は本来的には生体異物への応答能力として獲得されたものであることを示している。しかし、こうした能力が結果的に植物の適応度を高めたことで、揮発性オキシリピンの生成と受容に生態学的意義が付与されたのであろう。

Green leaf volatiles, Hexenal reductase, Glycosylation of hexenol

講演番号：4SY15-3
講演日時、会場：3月25日14:35～ C校舎20会場

イネの防御応答におけるジャスモン酸の生理機能

Biological functions of jasmonates in defense responses in rice

清水 崇史、宮本 皓司、岡田　憲典、○山根 久和（東大・生物工学セ）

Takafumi Shimizu, Koji Miyamoto, Kazunori Okada, ○Hisakazu Yamane (Biotechnology Research Center, The University of Tokyo)

植物は、傷害、乾燥、病原菌感染などのストレスに応答して様々な抵抗性反応を示すが、その過程においてジャスモン酸 (JA)及びその同族体が環境ストレスのメディエータとして機能していることが示されてきた。しかしながら、JA 類が植物体内でどのように集積し、どのような抵抗性反応を制御しているかについては多くが未解明である。そこで、我々は、イネを用い、ストレス応答時における JA 集積部位、及び生理機能の解析を行った。

まず、ストレスの受容と JA の集積部位との関連を解析するため、傷害、乾燥処理したイネ葉身を用いてストレス受容部位と JA 及びその活性型と考えられるジャスモノイルイソロイシン(JA-Ile)の集積部位との関連を LC-MS/MS を用いた定量分析、及びレポーター遺伝子を用いた JA-Ile 応答性遺伝子の発現部位の解析により調べたところ、JA 及び JA-Ile は傷害受容部位に顕著に集積し、乾燥処理の場合は葉全体に集積することが示された。一方、いもち病菌を接種した場合についても同様の解析を行い、いもち病菌感染部位およびその周辺の細胞に JA-Ile が局所的に集積することを示した。こうして、病原菌感染を含む様々なストレス応答時においてストレス受容部位に JA/JA-Ile が集積し JA/JA-Ile 依存性の抵抗性遺伝子群の発現を制御していることが強く示唆された。

イネの病原菌感染に対する代表的な防御応答の一つとして、ジテルペン型のモミラクトン類・ファイトカサン類やフラボノイドのサクラネチンなどのファイトアレキシンの生産が挙げられる。我々は、イネの JA 生合成変異体（*cpm2*、*hebiba*、*osjar1*)の詳細な characterization を行うとともに、それら変異体における JA/JA-Ile 処理やいもち病菌接種等のファイトアレキシン生産誘導効果を調べることで、JA/JA-Ile とファイトアレキシン生産との関連について検討した。その結果、JA 誘導のファイトアレキシン生産においては JA-Ile が必須シグナル物質として機能していることが明らかになった。また、ファイトアレキシンの種類によっては、JA-Ile を介さないシグナル伝達系が機能している可能性も示された。すなわち、サクラネチン生産に関しては JA-Ile 依存型のシグナル伝達のみが機能しているが、ジテルペン型ファイトアレキシン生産については、JA-Ile 依存型、非依存型のシグナル伝達がともに存在することが示された。

以上に加えて、我々は最近長年未同定であったサクラネチン合成酵素遺伝子の単離同定にも成功した。今後、本遺伝子の発現制御機構を解明することで、JA-Ileを介したシグナル伝達系解明のための重要な足掛かりが得られるものと考えられる。

jasmonates, *Oryza sativa* L., phytoalexins

講演番号：4SY15-4
講演日時、会場：3月25日15:05～ C校舎20会場

植物揮発性物質が駆動する生態系生物間相互作用ネットワーク

Title Plant volatiles drive ecological interaction networks

○高林　純示（京都大・生態研）
○Junji Takabayashi (CER, Kyoto Univ.)

生態系で繰り広げられる食物連鎖は非常に多様である。図の第一層（一番上の層）は、その例として植物１種－植食性昆虫２種－捕食性昆虫２種の連鎖を示した。この連鎖において、(I)植物が植食性昆虫の食害を受けた時、植食性昆虫種に特異的な揮発性物質のブレンドを生産・放出すること、(II)そしてそのブレンドには食害している昆虫の天敵を誘引する機能があること等が明らかになってきている。これは、食害を受けた植物が揮発性のSOSシグナルを出して、植食者の天敵をボディーガードとして雇うという「**植物－天敵間の情報をやり取りする関係**」である（図：第二層）。さらにSOSシグナルを受容した隣接植物が、あたかも食害を受けたかのように誘導的な防衛を開始する現象「**植物間の相互作用**」も様々な植物種において実証されている（図：第三層）。この第二層、第三層は、我々は直接認識できないが、食物連鎖（第一層）を下から支え、それに大きな影響を与える重要な層となっている。

本講演ではこの図を念頭に置きながら、生物間相互作用全体を駆動する植物揮発性物質の実態に関する我々の研究グループの成果について代表して紹介する。

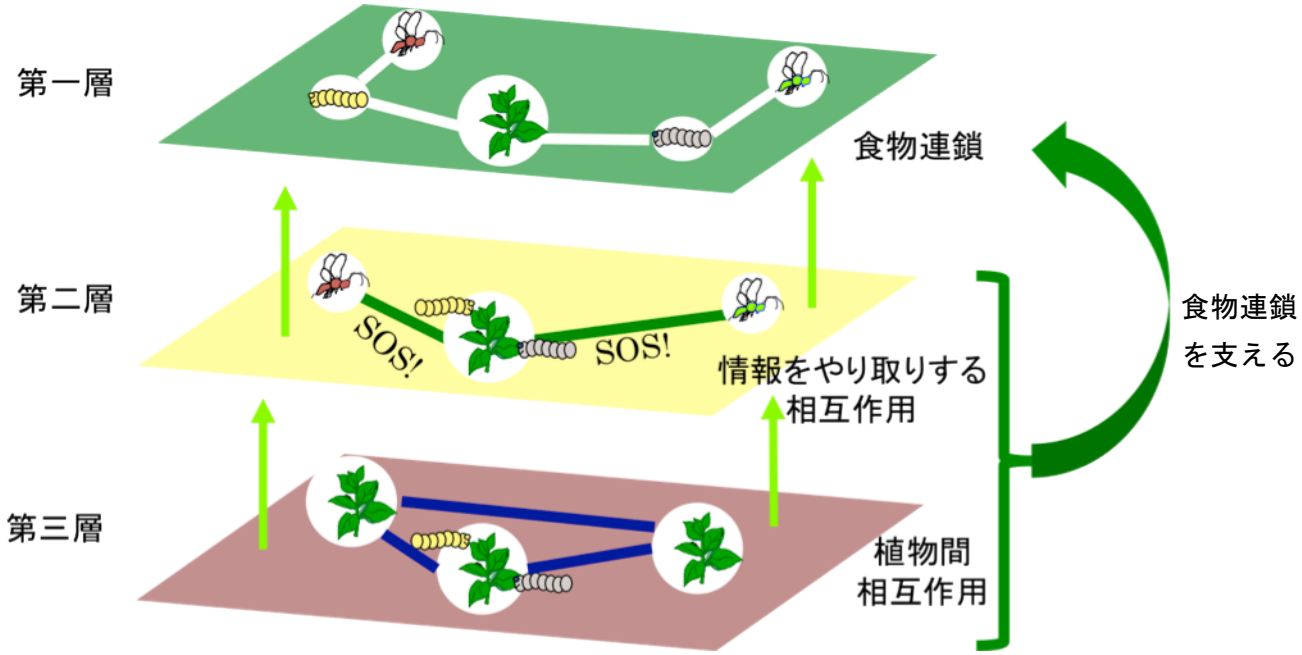


図　植物揮発性物質が駆動する生物間相互作用　第一層の白い線は，食う食われる関係を示す。第二層，第三層の線は植物揮発性物質を情報としてやり取りする関係を示す。第二層、三層が食物連鎖を支えている。

Plant volatiles, interaction networks, parasitic wasps

講演番号：4SY15-5
講演日時、会場：3月25日15:35～ C校舎20会場

嗅覚受容体のナチュラルリガンドとして包皮腺由来の長鎖不飽和アルコールの同定

Unsaturated C14 alcohol secreted from the preputial gland as a natural ligand for a mouse olfactory receptor

○東原和成（東大・院農生科・応生化）
○Kazushige Touhara (Dept. Agri. Biol. Chem., The University of Tokyo)

生態系は、多様な匂い物質やフェロモンで充満しているが、生物は、その複雑情報のなかから、仲間、敵、異性などの信号を正確にキャッチして識別する能力をもつ。1991 年の Buck & Axel の嗅覚受容体の発見以来、匂い受容機能に関する研究は飛躍的に進み、培養細胞での発現も難しかった嗅覚受容体のアッセイ系も確立された。しかし、現在までに、1000 種類近くあるマウス嗅覚受容体のうち、10%に満たない受容体のリガンドしか見つかっていない。残りの多くの嗅覚受容体は何を認識しているのか。一方、リガンドスクリーニングに使う匂い物質は、合成香料や試薬会社が販売する揮発性物質であるが、実際にマウスが自然界で感じる匂い物質は、他個体から発するものや、自然生態系由来の匂いであり、それらは全く異なるものであることが予想される。そこで、我々は、マウスが自然界で感じる匂い物質を同定するために、クルードなサンプルから嗅覚受容体リガンドをスクリーニングすることができるアッセイ系を確立し、マウス個体から分泌され、嗅覚受容体で認識される物質を精製・構造決定する手法を開発した。本講演では、その一例として、オスマウスの包皮腺から分泌される脂肪酸由来の炭素数 14 の不飽和アルコールを同定した結果を報告する。この物質は哺乳類で初めて見つかった物質であり、現在、その機能を解析している。本アプローチを用いて、嗅覚受容体のナチュラル匂いリガンド（フェロモンでもありうる）の同定が飛躍的に進み、現在汎用されている偏った合成リガンドレパートリーではなくて、生理的に意味のある「匂い―受容体の組合せマトリクス」ができることが期待される。

Olfactory, Receptor, Mouse

講演番号：4SY15-6
講演日時、会場：3月25日16:05～ C校舎20会場

脂質メディエーターとその受容体研究の創薬に向けた新展開

New insight into lipid mediators and their cognate receptors

○中村元直、清水孝雄（東大・医、細胞情報学）

○Motonao Nakamura, Takao Shimizu (The Univ. of Tokyo)

多種多様なリン脂質の秩序立った非対称配置により構成される細胞膜は、細胞の構成に不可欠なものであると同時に、脂質メディエーター産生のための材料貯蔵の場でもある。産生された各種脂質メディエーター（ロイコトリエン類、プロスタグランジン類、リゾリン脂質類、血小板活性化因子[Platelet-activating factor; PAF]など）は、それぞれが細胞膜に局在する特異的受容体を介してその生理作用を発揮する。これら特異的受容体はそのほとんどが G タンパク質共役型受容体、（GPCR）である。我々は、この魅力的な細胞膜を研究対象とし、リン脂質多様性の形成機序（リモデリング機構）、脂質メディエーターの産生制御と質量分析法による一斉定量、そしてそれらの特異的受容体に関する研究を進めている。本シンポジウムでは、膜リン脂質のリモデリング機構研究における新展開、および、GPCR の形質膜への輸送に関する最新知見について報告する。いずれの研究成果も今後、創薬に繋がることを期待する。

最近、我々はリゾリン脂質アシル基転移酵素ファミリーの実態に明らかにし、約 50 年前にミシガン大学のランズ博士により提唱された膜リン脂質リモデリング説（ランズサイクル）が大きく進展した。今回、このファミリー酵素の１つ、リゾホスファチジルコリンアシル基転移酵素２（Lysophosphatidylcholine acyltransferase-2; LPCAT2）について紹介する。この酵素は、マクロファージでのリン脂質リモデリングを担うのみならず、強力な生理活性を有する脂質メディエーターである PAF の産生酵素であることも明らかとなった。即ち、この酵素の制御により PAF 産生をコントロールできる可能性が出てきた。今回は、この LPCAT2 の諸性質と PAF 産生のための制御機構について最新の成果を紹介する。一方、GPCR の細胞内輸送制御を作用機序とする創薬についても新しい知見をふまえて紹介する。小胞体（ER）で合成された GPCR は構造（品質）評価を受け、ここで欠陥品と判断されたものはゴルジ体に配送されること無く ERAD 機構により分解処理される。ところで、バソプレシン V2 受容体の遺伝的変異は腎性尿崩症の病因の１つであることが知られている。これら変異受容体の中には正常な機能を有するにも関わらず、構造的変化から ER で欠陥品とみなされて分解処理されてしまうものもあるが、こうした変異 GPCR は、特異的リガンドをシャペロンとして作用させれば形質膜へと配送できることが近年明らかにされた。我々は、ロドプシン型 GPCR 間に共通したアミノ酸残基の点変異でも同様の ER 蓄積を起こし、さらに、これら変異 GPCR も膜透過性の特異的リガンドをシャペロンとして作用させれば形質膜へと輸送されることを明らかにした。評価した変異 GPCR の中には輸送後の形質膜上で野生型と差異無く機能するものも多く存在した。こうした知見から、特定の GPCR のみならず、多くの GPCR において、その変異体が薬理学的シャペロンによって形質膜へと移送でき、正常な受容体として機能させることができるという新たな創薬コンセプトが提唱できる。本シンポジウムでは、以上の２つの研究成果について報告する。

Lipid mediator, G-protein coupled receptor, signaling

講演番号：4SY16-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ C校舎21会場

単離操作を経ない生体分子群および微生物叢複合系解析がもたらすインパクト

Impact from analytical methods for molecular mixture and microbiota without isolation procedures

○菊地　淳[1,2,3]（理研・PSC、[1]理研・BMEP、2名大院・生命農、3横市院・生命）
○Jun Kikuchi[1,2,3] (RIKEN PSC, [1]RIKEN BMEP, [2]Grad. Sch. Bioagri., Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. Bionano., Yokohama City Univ.)

今から思い出せば京浜工業地帯の真ん中に研究所を創ろうとした1998年当時、理研に発足したゲノム科学総合研究センターの“ゲノム”という言葉は殆ど認知されていなかった。一般社会からは言うまでもなく、周囲の多くの研究者からも、聞き慣れない言葉への戸惑いと、嫌味とも捉えられそうな言葉を浴びて失意したことも記憶している。しかし、英米の大統領まで巻き込んだヒトゲノムのドラフト解読報道で迎えた21世紀、DNA配列を一斉計測して情報をデータベース化したり、その計測機器や解析ツールが一大産業にまで発展したことは疑う余地もない。また、生体分子群を一斉計測するというコンセプトは、DNAやRNAの核酸のみならず、蛋白質や代謝物にまで展開し、先端的な技術開発が日進月歩で進められている。筆者らはここ数年、動物・植物・微生物の多様な系について代謝物群の一斉解析を推進してきたが[1]、今後はイオンやバイオマス高分子群の混合物解析へと展開すべく[2]、その方法構築を模索している。

また、同様にここ10年程で著しい進歩があった先端技術としては、生物群集として複合系のまま一斉解析するメタ・オミクス手法であろう。特に微生物社会では共代謝で生き永らえている難培養性微生物の割合が高く、単離培養を経ないで直接複合系を一斉解析することで、腸内から自然環境に至る広範な系について、一流誌を賑わす成果が報告されてきた。さらに言えば、こうした複合微生物群とも共生することで、我々動物や植物は自然環境の変動に適応できている。こうした背景から、複合系の解析技術は学術的なパラダイム・シフトに留まらず、現実の産業プロセスや自然環境の状態により近いため、実学面での波及効果も高いと予想される。本シンポジウムでは筆者らの環境生物叢に対する試みは最小限の紹介に留め[3]、水圏・陸圏・産業プロセス等に関わる複合系に挑む研究者らのアプローチについて堪能できればと考えている。

＜参考文献＞

[1] Kikuchi & Hirayama (2007) ***Method Mol. Biol***. 358, 273-286; Sekiyama & Kikuchi (2007) ***Phytochemistry*** 68, 2320-2329; Tian et al., (2007) ***J. Biol. Chem***. 282, 18532-18541; Chikayama et al.(2008) ***PLoS ONE*** 3, e3805; Mochida et al. (2009) ***BMC Genomics***. 10, e563; Fukuda et al. (2009) ***PLoS ONE*** 4, e4893; Sekiyama et al. (2010) ***Anal. Chem***. 82, 1643-1652; Chikayama et al. (2010) ***Anal. Chem***. 82, 1653-1658; Nakanishi et al. (2011) ***J. Proteome Res***. 10, 824-831; Fukuda et al. (2011) ***Nature*** 469, 543-547.
[2] Kikuchi et al. (2011) ***J. Ecosys. Ecogr.*** S2 e001; Sekiyama et al. (2011) ***Anal. Chem***. 83, 719-726.
[3] Date et al. (2010) ***J. Biosci. Bioeng***. 110, 87-93 (2010); Everroad et al.. ***J. Vis. Exp***. (in press).

Molecular mixture, Bioconsortia, Meta-omics

講演番号：4SY16-2
講演日時、会場：3月25日13:45～ C校舎21会場

次世代シーケンサーによる small RNA の解析と水圏複合微生物系への展開

Metatranscriptomics reveals functional small RNAs in total RNAs extracted directly from the natural microbial assemblages

○木村 浩之（静岡大・理）
○Hiroyuki Kimura (Shizuoka Univ.)

Small RNA（sRNA）は、ゲノム上のIntergenic regionにコードされた長さ50-500塩基のRNAである。sRNAは、微生物の細胞内にてヘアピンループ構造を作ることで知られている。近年の微生物のゲノム解析により、菌株に由来するsRNAの多様性やその生理機能が明らかにされつつある。一方、sRNAは保存された共通の塩基配列領域が乏しく、その遺伝子を特異的に増幅させるためのPCRプライマーをデザインすることが困難であることから、環境微生物のsRNAの多様性や生理機能を解明することを目的とした研究例は非常に少ない。

近年、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子応答解析（メタトランスクリプトーム）によって、海洋の細菌群集に由来するsRNAの多様性が報告された（Shi *et al.*, 2009, Nature）。また、貧栄養から富栄養まで幅広い栄養条件下で培養された海洋細菌をターゲットとしたトランスクリプトーム解析において、貧栄養環境で大量のsRNAが発現することが明らかとなった（Kimura *et al.*, 2011）。中でも、sRNAの一種であるtransfer-messenger RNA（tmRNA）は、全RNAリード数の40パーセント以上に達することが報告された。tmRNAはtRNAとmRNAの両方の性質を持つキメラ状のRNAとして知られており、アミノ酸不足や核酸不足によるmRNAの3’末端の欠損が原因で翻訳が停滞した際に、独自の終止コドンを用いて停滞した翻訳を強制終了さる機能を持つ。そして、翻訳の停滞により“スタック”していたリボソームを救出することによって、細胞全体での翻訳の効率化を図る役割を担っていることが考えられる。

本発表では、天然海域の細菌に由来するsRNAの多様性やその機能について紹介すると共に、sRNAの発現量を環境の栄養状態の把握や放射能汚染に対する影響評価のためのバイオマーカーとして利用できる可能性について言及する。

【参考文献】

Shi Y, Tyson GW, DeLong EF. (2009) Nature 459, 266-269.
Kimura H, Young CR, Martinez A, DeLong EF. (2011) The ISME Journal 5, 1641-1651.

small RNA, transfer-messenger RNA, metatranscriptomics

講演番号：4SY16-3
講演日時、会場：3月25日14:10～ C校舎21会場

海洋の菌様原生生物，ラビリンチュラ類とウイルスのモニタリング技術による新たな水圏生態系の認識

Newly recognized ecological role of marine fungoid protists, labyrinthulomycetes.

○本多 大輔，上田 真由美[1]，高尾 祥丈[2]，長崎 慶三[3]（甲南大・理工，[1]甲南大院・自然科学，[2]福井県大・海洋生物資源，[3]瀬戸内水研），

○Daiske Honda, Mayumi Ueda[1], Yoshitake Takao[2], Keizo Nagasaki[3] (Fac. Sci. Engineer., Konan Univ., [1]Grad. Sch. Nat. Sci., Konan Univ., [2]Dep. Mar. Biosci., Fukui Pref. Univ., [3]Nat. Res. Inst. Fish. Environ. Inland Sea, Fish. Res. Agency)

海洋の生態系においては，一次生産者の植物プランクトンを起点として，植食性動物プランクトン，肉食性動物プランクトン，さらに高次の捕食者へとつながる生食食物連鎖だけでなく，このような生物や陸源生物から放出，排泄される有機物を起点として，従属栄養性細菌，微小動物プランクトンを経て，生食食物連鎖へつながる経路である微生物ループが合わさって，全体を支えていることが知られてきている。実際に，海洋の物質循環や流量などの把握においては，植物プランクトンや従属栄養性細菌のモニタリングの情報をベースにして推定されており，全地球レベルの炭素循環についても，このような知見の蓄積から考察されている。しかしながら，果たして上記のような生物だけで十分な理解ができていることになっているかというと，まだまだ疑問の余地があると言わざるを得ない。特に，微生物ループの起点となる従属栄養性細菌の役割を考えた時に，同じニッチで競合すると思われる真核生物についての知見があまりにも少なく，その関与の度合いについて未解明のままである。

ラビリンチュラ類は主に海洋に生息する5-20 μmの単細胞原生生物である。分布域は熱帯から極域の沿岸から外洋と幅広く，深海から分離された記録もある。細胞の一部から仮足状の外質ネットを伸長させ，消化酵素を分泌して分解された有機物を吸収する栄養様式をもつ。この生物の植物性多糖質への走化性を応用して，松花粉を釣り餌とすることで特異的に分離する方法とMPN (most probable number)法を組み合わせて，ラビリンチュラ類の継続的なモニタリングを実施したところ，春から夏にかけて海洋中に存在する細胞数の明瞭な２つの極大が観察された。またラビリンチュラ類を宿主とするウイルス量についても，MPN法によってモニタリングしたところ，ラビリンチュラ類の増減に影響を及ぼしている可能性が示唆された。 また，ラビリンチュラ類の中で，構成種の季節的変動が観察され，前述の明瞭な極大を構成する種も，年によって変化していることも観察されている。さらに，ラビリンチュラ類とバクテリアの細胞数を炭素量に換算して比較すると，極大が見られた年の春から夏の平均値は，ラビリンチュラ類がバクテリアの30-50%に相当する一方で，極大が見られなかった年は，約5%にとどまった。今後もモニタリングを継続すると共に，リアルタイムPCR法などの現存量調査法も適用し，さらに物質のフラックスについての知見も蓄積することで結論を得たいと考えている。

thraustochytrids, microbial loop, virus

講演番号：4SY16-4
講演日時、会場：3月25日14:35～ C校舎21会場

水圏生態系における物質生産様式をプロファイル化する
～特に藻類・プロティスト複合系に着目して～

Attempt to the profiling of the organic substances in aquatic ecosystem: focusing on the algae-protist complex.

○横山亜紀子（筑波大・生命環境）
○[1]Akiko Yokoyama, (Life & Env. Sci., Univ.of Tsukuba)

水圏生態系には、細菌からクジラに至るまで、実に様々な細胞サイズの生物が存在するが、その一次生産の大半を支えているのは，独立栄養生物である光合成生物（特に微細藻類）と化学合成細菌類である。これらの独立栄養生物の生物量の制限要因が，水温，光の量や質，CO_2やCH_4などのガス分圧，あるいは無機栄養塩量であることは古くから知られている。ところが，生物界における有機物質の産生は，無機物を有機物へと変換させる一次生産だけではない。一次生産者を利用する生物による分解，あるいは様々な代謝過程でも多種多様に生じる。さらには，生物によって排泄・分泌された溶存態有機物が，微生物食物連鎖網（マイクロビアルループ）における重要な役割を担っていることもよく知られている。したがって，水圏生態系における物質生産を理解するには，これらのプレーヤーの実態を把握することが重要である。しかし，そこには多くの困難を伴う。それは，生物の捕食−非捕食関係は１対１のような単純なものではない上，捕食様式や栄養獲得様式は極めて多様であり，その生態が明らかとなっている生物は決して多くはないからである。また，非接触性の生物間相互作用（アレロパシー）のように，原因となるアレロパシー物質の種類が非常に多岐に渡り，濃度や対象生物ごとにその作用が全く異なるなど，水圏生態系における生物変動のパターンを把握することは，生物量を決定する要因はきわめて複雑である。さらに，従属栄養性のプロティストが，捕食者あるいは寄生者として，他の生物の消長に与える影響が大きいことは自明の理であるが，分類学的な知見も大きく欠落している上，光合成色素のようなマーカー物質を持たず，固定サンプルにも残りづらく，その生物量の把握も困難なのが実情である。しかし近年の塩基配列決定技術の発達は，生物の系統分類学的知見を指数関数的に増大させ，生物多様性の解明や未知生物の発見に大きく貢献した。難培養あるいはピコプランクトンなどの微細な真核生物の存在が次々に解明され，真核生物の系統分類学が日々刷新されている。単細胞生物をそのまま遺伝子増幅するWGA(whole genome amplification)や第２世代のシーケンス技術は，培養を経ずに生物ゲノムを取得可能にした。微量な物質の検出技術や同定方法も日々向上している。そこで，これらの技術を包括的に利用することで，生物の多様性や消長に関わる物質要因を探ることが可能となってきた。我々の研究チームでは，水圏生態系の藻類・プロティスト複合系に注目して，生物観察と環境メタゲノム解析などによるコミュニティー構造解析と核磁気共鳴分光法によるメタボローム解析とを相関解析し，生物の消長に関わる有機物質の挙動を包括的に探る試みを行っている。本講演では，この取り組みについても紹介する。

protist, algae, metabolome

講演番号：4SY16-5
講演日時、会場：3月25日15:00～ C校舎21会場

環境メタゲノミクス

Environmental metagenomics

○黒川 顕（東工大・生命理工）
○Ken Kurokawa (TITECH)

細菌は地球上のあらゆる環境において，多種多様な個体が群集を形成し棲息することで，その環境における物質循環の基盤を担っている．したがって，ある環境の生態系を理解し，生物間の相互作用や物質循環のプロセスをモデル化するためには，環境中の細菌群集についての詳細な理解が必須となる．しかしながら，環境中の細菌のほとんどは培養することが困難なため，群集を構成する種の組成はもちろんのこと，それらの生態や機能については未解明な部分が多い．

コンピュータの発展ならびに超高速シークエンサーの登場により，これまで全体像の理解が困難であった自然界における遺伝子動態を，環境中に存在する微生物を群集まるごとゲノム解析するメタゲノム解析により理解できる時代に突入した．しかしメタゲノム解析は，全ゲノム情報を捉えられないという点でゲノム解析とは大きく概念が異なるため，これまで培ったゲノム解析の手法を単純に応用することが困難である．特に母集団を明確に定義できない情報を統計的に扱う場合の解析手法の開発や，可視化ツールの開発などは，結果を解釈する上で欠く事ができず，メタゲノム解析により自然界における遺伝子の動態や生物の集団内相互作用などを明らかにすることは，非常に困難な課題である．メタゲノムインフォマティクスの技術を開発することで，自然界での遺伝子の動態，細菌叢と上位の生物群との相互作用，さらには生物と環境との相互作用などに焦点を絞った研究が可能となる．

ヒトメタゲノム研究では，病気との関連性が最重要課題となり，特定の遺伝子発見のみならず，創薬や健康食品開発，プロバイオティクスなど，健康維持・増進に貢献することが大きな目標となる．同様に，環境メタゲノム情報と環境因子との相互作用を明らかにすることにより，環境を評価するだけではなく，積極的な生命環境デザインが大きな目標となる．そのためには，環境中の遺伝子だけではなく，どのような因子が生命環境において重要であるかを議論した上で，それらを蓄積し将来の基盤とする「地球データベース」を構築することこそが直近の目標になると考えている．

本講演では，現在取り組んでいる新型シーケンサーを利用した環境メタゲノム解析について紹介する．

metagenome, next-gen sequencer, bioinformatics

講演番号：4SY16-6
講演日時、会場：3月25日15:25～ C校舎21会場

微生物生態系の成立様式を電子の流れで理解する

Exploration of electron cycling within microbial ecosystems

○春田伸、大滝宏代、諸星聖、松浦克美（首都大・理）
○Shin Haruta, Hiroyo Otaki, Sho Morohoshi, Katsumi Matsuura (Tokyo Metropolitan Univ.)

生態系における代謝の流れを明らかにしていく上で、特に炭素化合物に注目してその物質変換を追跡していく試みがある。そんななかで系全体のエネルギーの流れを明らかにするには、電子の流れを捉えることが重要であると考えている。我々は、温泉流水中に発達する微生物マットを対象にその成立様式の解析を進めている。この温泉微生物マットは、酸素非発生型光合成細菌を中心として、複数の細菌が共存するミクロな生態系である。無酸素下で光エネルギーを捕捉・利用しており、エネルギーの分配様式を探るのに有効な微生物生態系である。

環境中から採取した微生物マットの物質生産や消費の活性を測定し、電子の流れに注目して各構成種の役割および微生物生態系の全体像に迫る。それにより、未培養の細菌群の活性や純粋培養条件では未同定の代謝活性を検出することに成功している。1）硫化水素の光酸化と炭酸固定＝添加した硫化水素は光依存的に減少する、またその減少は炭酸塩の添加によって促進される。2）硫酸塩/硫黄還元＝硫酸塩または硫黄を添加すると、硫化水素を生成する。3）水素発生＝硫酸塩還元の阻害剤を添加すると、嫌気・暗条件で水素を生成する。

これを微生物マットの構成種と物質循環の観点でみると、光合成による二酸化炭素の固定と発酵細菌による有機物の利用という炭素化合物の循環だけでなく、次のような硫黄化合物の循環がみてとれる；硫化水素の光酸化と硫黄の生成（光合成細菌）、硫黄の還元と硫化水素の生成（硫黄還元細菌）、硫酸塩の還元と硫化水素の生成（硫酸塩還元細菌）。一部の硫化水素はマット表層の好気性細菌によって硫酸塩まで酸化され、その酸素消費によって嫌気環境が形成されている。これら化合物の変換過程は一見、独立しているようであるが、発酵細菌による水素生成と他種による水素消費を通した電子の流れでつながっている。すなわち電子は、光合成細菌から炭素化合物を通して発酵細菌に、発酵細菌から水素を通して硫酸塩/硫黄還元細菌に、硫酸塩/硫黄還元細菌から硫化水素を通して光合成細菌にと、循環している。このように電子循環という視点から生態系を俯瞰することで、生態系全体のエネルギーの流れを捉えることができると考える。

また微生物マット内の水素を介した電子伝達には、密な細胞凝集が必要であり、この凝集形成には、本系の優占種である糸状性光合成細菌の滑走運動が寄与している。この滑走運動は、共存する他の従属栄養細菌による細胞外分泌因子によって促進される。このように光合成で捕捉したエネルギーの一部は、細胞凝集の形成およびその制御にも利用され、結果として電子伝達を促進している。

＜参考文献＞

Haruta, S. et al. (2009) Environ. Microbiol., 11:2963-2969
Kubo, K. et al. (2011) System. Appl. Microbiol., 34:293-302

microbial ecosystem, inter-species interaction, electron cycling

講演番号：4SY16-7
講演日時、会場：3月25日15:50～ C校舎21会場

複合微生物叢のデータマイニング技術

Data-mining method for evaluation of various microbial ecosystems.

○山澤 哲[1,2]、伊達 康博[2,3]、菊地 淳[2,3,4,5]（[1]鹿島技研、[2]横市院生命、[3]理研PSC、[4]理研BMEP、[5]名大院生命農）

○Akira YAMAZAWA[1,2], Yasuhiro DATE[2,3], Jun KIKUCHI[2,3,4,5]([1]Kajima Tech. Res. Ins., [2]Grad. Sch. Nanobiosci., Yokohama City Univ., [3]RIKEN PSC, [4]RIKEN BMEP, [5]Grad. Sch. Biol. Agrc. Sci., Nagoya Univ.)

多様な複雑微生物系が超有機体として共役しながら化学反応を触媒するバイオプロセスはますます重要性を増しており、ある種の分野、例えば有機塩素化合物を標的とした土壌地下水浄化のバイオレメディエーション分野では、特定の微生物種や特定機能遺伝子に着目した遺伝子評価手法が一般化している[1,2]。その一方で、そのバイオプロセス中には未知種を含む多様な微生物叢が存在し、実際の代謝プロセスは代謝物の種類や濃度の変動に大きく影響される複雑なネットワークを構成するが、その理解はまだまだ十分とは言えない。たとえば、既知の機能遺伝子の定量解析からは、既知の化学反応の触媒能について推定することが出来るが、しかし、未知遺伝子や未知微生物を含む複雑微生物系全体の代謝反応を議論することは困難である。従って、これらを網羅的に解析し、まだ知られていない埋もれた情報を発掘（データマイニング）できるとすれば、新たな知見の創出につながることが期待される。言い換えれば、このような試みは、バイオレメディエーションのみならず廃水処理などを含む多様な複雑微生物系プロセスへの適用可能性があることから、バイオエンジニアリング分野のイノベーションに通じる基幹技術として期待が高まっている[3,4,5]。

本講演では、モデル系として塩素化エチレンの嫌気性バイオレメディエーション系、あるいはセルロースの嫌気消化系などについて、データマイニング手法を適用した結果を紹介したい。代謝物の定量分析と同時に、DGGEによる微生物叢の変動プロファイル解析を行い、これらを数値化及びマトリックス化することによって、多変量解析データマイニングを適用可能とした。その結果、特徴的なDGGEバンドについて特定代謝物の分解過程との時系列変動を関係付けることに成功し、既知遺伝子の定量解析などによらない未知微生物の機能推定が可能となった。更に、嫌気消化系では異なる基質でも同様の多変量解析を適用し、それぞれの基質ごとに複雑微生物系としての代謝シーケンスを特徴づけ、それらの違いについて議論することができた[5]。

複雑微生物叢による有用なバイオプロセスは数多く、今後、次世代シーケンサーなどがより身近になれば、更に幅広い展開が期待できる手法となるだろう[6]。

1) Johnson, D. R. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3866-71, (2005), 2) Ritalahti, K. M. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2765-74, (2006), 3) Date, Y. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 110, 87-93, (2010), 4) Everroad, C. R. *et al.*, *J. Vis. Exp.*, (in press), 5) Date, Y. *et al.*, *J. Proteome Res.*, (submitted), 6) Ogata, Y. *et al.*, *PLoS ONE.*, (revised)

microflora, bioprocess, multivariate statistical analysis

講演番号：4SY16-8
講演日時、会場：3月25日16:15～ C校舎21会場

環境微生物叢の解析技術進展への期待

Expectation for technology progress of analytical methods for environmental microbiota.

○石田亘広、光川典宏（㈱豊田中央研究所）
○Nobuhiro Ishida, Norihiro Mitsukawa (Toyota Central R&D Labs.)

生命現象の追及や新しい産業の創生には、斬新なアイデアに基づいた革新技術の発展とその応用展開が不可欠である。本シンポジウムのテーマである複合系微生物叢の解析技術についても、1960-70年代の分子生物学の幕開けに始まり、遺伝子・タンパク質の機能・構造解明から、代謝系に基づく複数酵素のネットワーク解明を経て、オミックス解析・メタオミックス解析を中心とする複合系制御技術へと発展する“うねり”の中にあると考えられる。

一方で、“微生物による物質生産”という応用的側面でとらえると、我々も乳酸生産等で実施した[1, 2]、遺伝子・代謝工学による鍵酵素の改変を中心としたターゲット物質の高効率生産の流れから、制御系ゲノム全体の改変を目指した“合成生物工学”や、複合微生物叢組成の改変を目的とした“環境工学”へと移行する技術転換期にあるのかもしれない（Fig.1）。

本シンポジウムでは、水圏・陸圏・産業プロセス等に関わる環境微生物叢に挑む新進気鋭の先生方の斬新なアプローチを御紹介いただいた。環境微生物叢として複合系のまま一斉解析するメタオミックスを中心とする先端技術の更なる進展につながる議論ができれば幸いである。

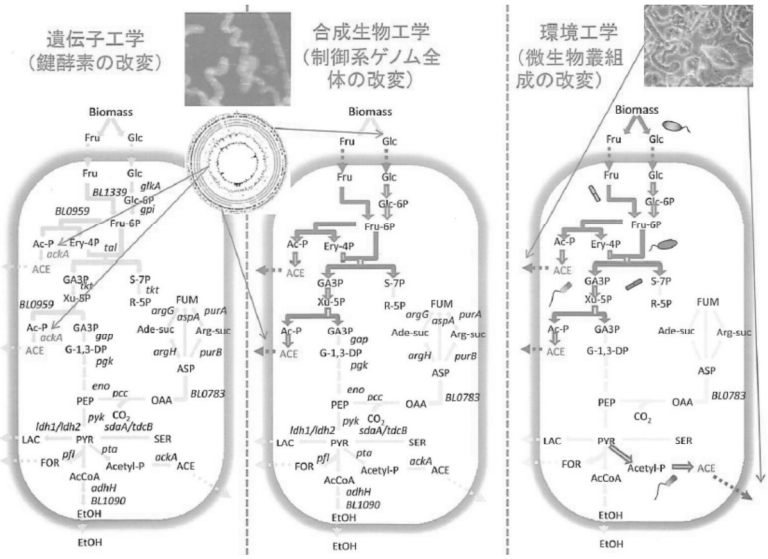


Fig.1 単離微生物と複合微生物の物質生産制御手法の違い[3]

1) 石田亘広・大西徹・高橋治雄、化学と生物、Vol. 46, p 8-10 (2008).
2）石田亘広、バイオインダストリー、Vol. 27, p 45-50 (2010).
3）作図；理研　菊地淳

Microbiota, Meta-omics, Bioconversion

講演番号：4SY17-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ C校舎24会場

昆虫の摂食行動を作るペプチドホルモン群による調節機構

Regulatory mechanisms of insect feeding behavior by peptide hormones

○永田 晋治（東大院・農生科・応生化）
○Shinji Nagata (The University of Tokyo)

植物を食べる昆虫（植食性昆虫）は、餌の上で生活しているにも関わらず、常に食べ続けているわけではない。これは、摂食行動のメカニズムが餌などの外部からの刺激だけにより決定されていないということだけでなく、摂食行動が内因性の調節機構で支配されていることも意味する(Nagata and Nagasawa, 2006)。我々の研究は、この昆虫の摂食行動の内因性制御メカニズムを明らかにすることを目的としている。これまでに、カイコ（*Bombyx mori*）から、摂食行動に関連する様々なペプチド性因子を同定してきた（Nagata *et al.*, 2011a-d; Morooka et al*., 2011*）。*その中には、アラタ体制御ペプチドとして同定されているアラトトロピン、アラトスタチン、*FMRF アミド関連ペプチドが含まれていた。この摂食行動調節因子群の発現部位は、主に脳と脳から連絡する神経節（食道下神経節、前額神経球 Frontal ganglion, FG）である。面白いことに、この摂食行動調節因子群の発現領域は、これまで生理学的な研究で示唆されている摂食行動の調節領域と一致した。特に、前腸の蠕動運動や顎の運動を作る Central pattern generator である FG では、その摂食調節因子群の発現が集中していた。

一方、これら摂食行動調節因子群の受容体の発現量を RT-PCR などを用いて解析したところ、摂食状態により、大きく変動していることが分かった。例えば、アラトトロピンの受容体は主に腸管で発現しており、絶食によるとその発現量が著しく減少する。これまで、ペプチド性ホルモンの調節には、そのホルモン分泌量や転写量で制御されていると考えられてきたが、受容体の転写レベルでの制御も重要であることが分かってきた。摂食行動を調節する脳神経回路でのペプチドホルモンネットワークと、代謝に応答する受容体レベルでの調節が摂食行動の制御メカニズムに重要であることが見えてきた。

Nagata and Nagasawa, 2006. *J. Insect Physiol.* 52. 807-815.
Nagata *et al.*, 2011a. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172. 90-95.
Nagata *et al.*, 2011b. *J. Biol. Chem.* 286. 7161-7170.
Nagata *et al.*, 2011c. *Peptides.* in press.
Nagata *et al.*, 2011d. *Front. Exp. Endocrinol.* in press.
Morooka *et al.*, 2011. *FEBS J. 2011.* in press.

Insect, Feeding behavior, Peptide

講演番号：4SY17-2
講演日時、会場：3月25日14:00～ C校舎24会場

多糸染色体から理解するクロマチン構造調節を介したゲノムデコード
－新規ヒストンシャペロン*Drosophila* DEKによるエクダイソン受容体転写機構の解明－

A novel histone chaperone DEK transcriptionally coactivating a nuclear receptor

○沢津橋 俊、武山 健一[1]、加藤 茂明[1]（群馬大・生調研、[1]東大・分生研）
○Shun Sawatsubashi, Ken-ichi Takeyama[1], Shigeaki Kato[1] (Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma Univ., [1]Institute of Molecular and Cellular Biosciences, Univ. of Tokyo)

エピゲノム制御は、多細胞生物の遺伝情報であるゲノムDNAからの選択的な遺伝子発現を可能としており、DNAとヒストンなどのタンパク質で構成されるクロマチンのダイナミックな構造調節が必要とされる。近年、DNAのメチル化、ヒストンの翻訳後修飾、クロマチンリモデリングといった制御が、生物種を超えて、このクロマチン構造調節機構において重要な分子基盤であることが明らかになりつつある。また、エピゲノム制御の破綻は、細胞種固有の形質が損なわれる為、癌をはじめとする疾患の観点からも重要な問題である。しかしながら、ヒストン修飾解析を中心とした研究は精力的に展開されているのに比べて、生体内でダイナミックに行われるクロマチン構造調節の分子機構に対する知見は乏しいのが現状である。

このような転写制御における動的なクロマチン構造調節機構を理解するモデルシステムとして、古くからショウジョウバエ唾腺多糸染色体に視られるエクダイソンパフが用いられてきた。このパフ形成を誘起するステロイドホルモンの一種であるエクダイソンは、脱皮・変態を制御する核内受容体型転写因子エクダイソン受容体のリガンドとして機能を発揮する。我々は、GFPプロテイントラップ系統ライブラリーを利用した新たな分子遺伝学的スクリーニング系を構築し、エクダイソンパフに局在化するクロマチン構造調節因子の探索を試みたところ、*Drosophila* DEK (dDEK)の同定に成功した。dDEKはエクダイソン標的遺伝子の発現に必要な転写共役因子であり、カゼインキナーゼ(CK)2と複合体を形成することで、新規ヒストンシャペロンとして機能することを明らかとした。さらに、生体内においてこの機能は、パフ形成時のクロマチン構造調節過程でのヒストンバリアントH3.3への置換反応を促進させ、活性化クロマチン構造の形成に関与していた。これにより、核内受容体の新たな転写制御複合体としてヒストンシャペロンの存在を見出し、転写制御にヒストン置換反応が関与することをつきとめた（Genes & Development, 2010)。また、ヒトDEKは白血病患者での転座変異(DEK-CAN)や癌組織での発現亢進が報告されているが、その分子機能についてはほとんど解析が進んでいない。驚くべきことに、変異型DEK-CAN融合タンパク質はDEK-CK2複合体形成ができず、そのヒストンシャペロン機能を失うことが推察され、この機能破綻が白血病等の疾患に繋がる可能性を示唆している。本講演では、多糸染色体を利用した分子遺伝学的スクリーニングから明らかになりつつあるステロイドホルモンによる遺伝子発現制御の新たな分子機構について議論したい。

Ecdysone, Nuclear receptor, Chromatin

講演番号：4SY17-3
講演日時、会場：3月25日14:30～ C校舎24会場

クロマチン構造調節を担う新規メゾスケール複合体の解析

A novel mesoscale regulatory unit, MERU, reorganizes chromatin structure

○藤山（中村）沙理, 沢津橋 俊, 伊藤（上田）紗弥, 鈴木（松浦）絵里子, 木村 周平, 武山 健一, 加藤 茂明（東大・分生研）

○ Sally FUJIYAMA-NAKAMURA, Shun SAWATSUBASHI, Saya ITO-UEDA, Eriko SUZUKI-MATSUURA, Shuhei KIMURA, Ken-ichi TAKEYAMA, Shigeaki KATO (University of Tokyo, IMCB)

真核生物における遺伝子の転写・ゲノムDNAの複製・修復等の反応はクロマチン構造調節を介して厳密に制御されている。これまでに種々のヒストン修飾酵素やクロマチンリモデリング因子などから成る、クロマチン構造調節に関わる様々な機能複合体群が多数報告されている。一方で、これら多種多様な複合体群がどのようにして標的遺伝子領域のクロマチン上に集まり、多段階的に各々の複合体機能を発揮するのか、その詳細な制御メカニズムはほとんど分かっていない。そこで本研究では、クロマチン構造調節を統合的に制御する高次複合体の探索を試みた。

想定した高次複合体は、既知複合体群よりも分子量が大きく細胞内での存在量も極微量であり、従来の生化学的手法のみではそのような複合体の精製は困難であると考えた。そこで我々は、機能プロテオミクスによる複合体精製の手法にショウジョウバエ分子遺伝学による生体内相互作用解析を組み合わせることで、新たな複合体の取得を試みた。その結果、真核生物の80S リボソームより大きな超巨大分子量（メゾスケール）複合体MERU（Mesoscale epigenetic regulatory unit, 分子量5 MDa以上）の同定に成功した。MERUはヒストンアセチル化酵素複合体ATACとクロマチンリモデリング因子複合体NURFを含む70種類の構成因子から成る複合体であった。また、転写因子AP-1活性化刺激依存的に複合体間架橋因子群を介して一過的にMERUの形成が促進されること、さらにAP-1標的遺伝子領域においてクロマチン構造変換を介した転写制御を担う事も明らかとなった。

以上本研究では、従来の生化学的複合体精製法にショウジョウバエ分子遺伝学を組み合わせる事で、分子量5 MDa以上と推測される新規メゾスケール複合体MERUの単離･同定に成功した。さらにショウジョウバエAP-1標的遺伝子領域のクロマチン構造は、転写活性化刺激に応答して種々の複合体群が会合し一過的にMERUを形成することによって厳密に制御されていると考えられた。

chromatin structure, Drosophila genetics, mesoscale complex

講演番号：4SY17-4
講演日時、会場：3月25日15:00～ C校舎24会場

ミツバチの女王蜂分化誘導因子ロイヤラクチンの発見

Royalactin induces queen differentiation in honeybees

○鎌倉 昌樹（富山県大工・生物工）
○Masaki Kamakura (Dept. of Biotechnol., Fac. of Engin., Toyama Pref. Univ.)

ミツバチは女王蜂と働き蜂からなる階級社会（カースト）を形成しており、幼虫の間に働き蜂が分泌するローヤルゼリー（RJ）を摂取した個体のみが女王蜂へと分化している。これまでにこの女王蜂への分化のしくみについてはまったく明らかになっていなかった。そこで、本研究においてミツバチの女王蜂分化誘導機構を解析した結果、RJ 中に含まれる成分「ロイヤラクチン」が女王蜂の分化を誘導する因子であることを明らかにした。さらに、驚くべきことにロイヤラクチンをショウジョウバエに投与或いは過剰発現させた場合にも、女王蜂と同じような体サイズ、産卵数、寿命の増加が見られた。ショウジョウバエ及びミツバチを用いた詳細な解析から、ロイヤラクチンは上皮増殖因子受容体（EGFR）シグナルを活性化し、女王蜂分化を誘導していることが明らかとなった。これらの結果は、ロイヤラクチンがミツバチだけなく種を超えてハエにまで作用する因子であり、同じ遺伝子型をもつ個体を全く異なる表現型をもつ個体へと誘導するエピジェネティックな因子であることを示しており、ミツバチのように生育環境が形質を変化させるという現象が生物に普遍に存在することを強く示唆している。本講演では、ロイヤラクチンの生理的機能だけでなく、ロイヤラクチン発見までの経緯やこれまでの他のミツバチのカースト分化に関する研究との関連性も含め詳しく解説する。

honeybee, Drosophila, royal jelly

講演番号：4SY17-5
講演日時、会場：3月25日15:30～ C校舎24会場

昆虫の生命維持機構を利用した新奇害虫防除法の開発

Development of a novel pesticide using programed cell death machinery

○新美 輝幸、佐藤　豊、吉岡　博文、柳沼　利信（名大・院生命農）
○Teruyuki Niimi, Yutaka Sato, Hirofumi Yoshioka, Toshinobu Yaginuma (Nagoya Univ.)

昆虫の生命維持には様々なメカニズムが関与する。演者らは、昆虫に限らず進化的に保存された現象としてプログラム細胞死およびRNA干渉（RNAi）に焦点をあて、昆虫における分子メカニズムの解明およびこれらの現象を利用した新奇害虫防除法の開発を行っている。

爆発的な人口増加に伴い世界規模での食糧不足が緊迫するなか、農作物の約３分の１が病害虫により消失している。従って、世界規模での食糧増産を果たす上で、いかに害虫を管理するかは重要な問題である。その対策として、従来の害虫防除法では主に化学農薬が使用されてきた。しかしながら、化学農薬は害虫に対する特異性が低く、人間や家畜に対する安全上の問題および環境に対する負荷が大きい。また、害虫は化学農薬に対する耐性を短期間のうちに獲得するため、次々と新たな作用点を持つ薬剤の開発を余儀なくされている。持続的な農業生産を目指す上で、既存の害虫防除法の限界を打破するためには、全く異なる原理に基づく新たな害虫防除法の開発を行う必要がある。演者らは、二本鎖RNAを害虫に摂食させることにより害虫にRNAiを誘導する画期的な方法を発明し、RNAiに基づき生存に必須の遺伝子の機能阻害をもたらすRNAを“RNA農薬”と命名した。そこで、害虫制御のRNAiのターゲットとして、プログラム細胞死を抑制し生存に必須のアポトーシス阻害因子（inhibitor of apoptosis; IAP）に着目し、*iap*遺伝子をジャガイモ害虫であるニジュウヤホシテントウからクローニングした。その配列に基づいて合成した二本鎖RNA（dsRNA）を塗布したジャガイモ葉を摂食した幼虫は、摂食が迅速に停止し、早期に致死に至ることが明らかとなった。RNA農薬は、RNAiに基づく配列の特異性が厳密であるため、これまで不可能であった種特異的な殺虫剤の開発も可能となる。また、共通した配列の選択、あるいはdsRNAの混合により、ターゲットとする害虫種の適応範囲を任意に設定することも可能である。現在、この現象の分子メカニズムの解析および各種害虫に対するRNA農薬の有効性について検討を行っている。本シンポジウムでは、害虫防除に向けた昆虫におけるRNAi法およびプログラム細胞死に関する最近の解析結果およびRNA農薬の今後の展望について紹介したい。

RNAi, programed cell death, pesticide

講演番号：4SY17-6
講演日時、会場：3月25日16:00～ C校舎24会場

シロアリの繁殖分化制御機構を探る：女王決定に関わる遺伝的要因とフェロモン

Genetic and pheromonal influences on queen determination underlining the asexual queen succession system in termites

○松浦　健二（岡山大院環境・昆虫生態）
○Kenji Matsuura (Okayama University)

近年、これまでの社会性昆虫の繁殖メカニズムに関する理解が大きく変わろうとしている。独立に高度な真社会性を発達させたアリとシロアリにおいて、女王が産雌単為生殖で女王を生産する種が相次いで発見されており、社会性昆虫にとっての「性」の利益とコストを議論する上できわめて重要なテーマとなっている。ヤマトシロアリの創設女王は、二次女王（巣内で生殖を引き継ぐ）を単為生殖で生産し、一方、ワーカーや有翅虫（巣を飛び立って新たな巣を創設する）は有性生殖で生産していることが明らかになった（Matsuura et al. 2009, Science)。この単為生殖による女王継承システムAQS（Asexual Queen Succession)により、創設女王は分身女王を多数生産し、次世代への自分の遺伝的貢献度を全く低下させることなく、同時に、近親交配を完全に回避して大幅に産卵速度を上げている。また、末端融合型オートミクシスによる劣勢有害遺伝子の排除を通じて王や他のメンバーにとっての利益をもたらしている。このシステムが安定的に成立するためには、女王が単為生殖で生産した娘だけが二次女王に分化できることが条件となる。実験下で単為生殖の娘を除去すれば、有性生殖で作られた娘にも二次女王への分化能力は存在するにもかかわらず、自然状態では単為生殖で作られた娘だけが二次女王の座を占めている。二次女王分化に関してホモ接合型が有利となるような複数の遺伝子座が存在することが示唆されており、なぜ完全ホモになるオートミクシス型単為生殖の娘が優位に二次女王に分化できるのか合理的に説明できる。

繁殖分化には遺伝的要因だけでなく、女王の数や産卵速度はフェロモンによって厳密に制御されている。シロアリのように社会生活を営む昆虫では、繁殖と労働の分業が発達しており、現役の女王はフェロモンによって他の雌個体が女王に分化して産卵するのを抑制している。近年、講演者らは、ヤマトシロアリの女王フェロモンの成分が２-メチル１-ブタノールとn-ブチルn-ブチレートの２つの揮発性化学物質であることを特定した（Matsuura et al. 2010, PNAS)。女王フェロモンが特定できたことにより、その機能に関する様々な操作実験が可能となり、繁殖分業やフェロモンの進化プロセスを理解する上でも重要な知見が得られるようになった。まず、女王フェロモンと全く同じ揮発性物質が卵からも放出されており、この卵揮発物質はワーカーが卵を育室に運搬・保護する際の定位フェロモンとしても機能していることが分かった。また、女王が複数存在するコロニー内では、女王フェロモンが女王間の産卵シグナルとして働き、コロニーレベルの卵生産量の調節に重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、ワーカーの唾液腺で作られるリゾチームには、卵の抗菌機能と卵認識フェロモンの機能があるが、女王フェロモンに暴露したワーカーでは有意に唾液腺リゾチーム量が増加することが分かった。シロアリの女王フェロモンの多面的機能の進化プロセスについても議論する。

termite, caste differentiation, asexual queen succession

講演番号：4SY18-1
講演日時、会場：3月25日13:35～ C校舎26会場

X-Ray Crystallography of a Multidrug Exporter-type ABC Transporter

○ Hiroaki KATO[1,2] ([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto UNIV, [2]RIKEN/SPring-8)

P-glycoprotein (Pgp; MDR1; ABCB1) is a transmembrane protein that belongs to an ABC (ATP Binding Cassette) transporter super family, and effluxes diverse chemical compounds from the cell. Pgp expression in human cancers causes the multidrug resistance to chemotherapeutic drugs. Pgp also functions to protect from toxic xenobiotics in the intestine and in the blood brain barrier. To understand the molecular mechanism of Pgp based on the structure, we explored Pgp homologues suitable for crystallographic analysis. We discovered a candidate from a unicellular eukaryote. Its amino acid sequence was the most similar to that of human Pgp than others in this organism. A multidrug resistance phenotype was observed when the gene was expressed in *Saccharomyces serevisiae* AD-8u$^-$ in which 7 types of endogenous ABC exporters had been deleted. The purified preparation of the recombinant transporter exhibited a typical behavior of ATPase kinetics of ABC exporters with respect to some Pgp substrates, such as rhodamine 6G and verapamil. A large amount of the recombinant transporter was produced from *Pichia pastoris* cells by high-density fed-batch fermentation. The recombinant protein was stable and its crystals diffracted to high resolution. We solved its crystal structure and constructed an accurate molecular model. The structure analysis provided an insight into a mechanism of the multidrug ABC exporter.

ABC transporter, membrane protein, X-ray crystallography

講演番号：4SY18-2
講演日時、会場：3月25日14:00～ C校舎26会場

電子線結晶構造解析による膜タンパク質の投影像と機能

Structural analysis and functional implications from projection structures of membrane proteins

○光岡　薫（産総研・バイオメディシナル情報研究センター）
○Kaoru Mitsuoka (AIST)

Electron crystallography using two-dimensional crystals of membrane protein can provide high-resolution structure of a membrane protein within a lipid bilayer. Thus, the structure close to the native environment can be determined using this method. In addition, lipid environment is essential for the function of some membrane proteins, and electron crystallography is thought to be a suitable method to elucidate the relationship between the function and the structure in those cases. In the talk, I would like to show two examples of structural analysis of membrane proteins, V-ATPase and aquaporin, using electron crystallography. In both cases we determined the projection structure, and functional implications from the projections will be discussed.

Members of the FoF1 and V-ATPase superfamily (rotary ATPase/synthase) use a rotary catalytic mechanism to perform their specific function. V-ATPases exist in the endomembranes of all eukaryotic cells and in the plasma membrane of some specific eukaryotic cells functioning as a proton pump with a variety of cellular functions. V-ATPase from the thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus* catalyzes ATP synthesis and it has the simplest known subunit structure and is thus an excellent model for studying the mechanism of action of these important molecules. Cryo-electron micrograph images of 2D crystals of the membrane-bound rotor ring of the V-ATPase at 7.0-Å resolution showed the presence of 12 Vo-c subunits, each composed of two transmembrane helices. This result clearly indicates that symmetry mismatch between the rotor and catalytic domains is not obligatory for rotary ATPases/synthases. From an additional functional analysis, the implication of different Vo-c subunit numbers in various organisms will be discussed.

The aquaporins are a family of water channels that facilitate efficient transport of water and small solutes across cell plasma membranes. They are divided into two subfamilies on the basis of their permeability, the aquaporin and the aquaglyceroporin subfamilies. Members of the former are highly specific for water, but members of the latter are permeated by water and small molecules such as glycerol and urea. AQP3, one of aquaglyceroporins, conducts glycerol as well as water. Here we present an electron microscopic analysis of the mammalian aquaglyceroporin-3 (AQP3). A recombinant his-tagged rat AQP3 has been overexpressed a few mg of in the baculovirus/Sf9 insect cell system and purified to homofenieity. The purified AQP3 solubilized in n-decyl-β-D-maltopyranoside is a tetrameric particle that assembles into highly ordered two-dimensional crystals, which diffracted electrons to 3.8 Å resolution. Cryo-electron microscopy provided a 7 Å projection map exhibiting a unit cell comprised of two tetramers, and the functional implications from the projection structure will be discussed.

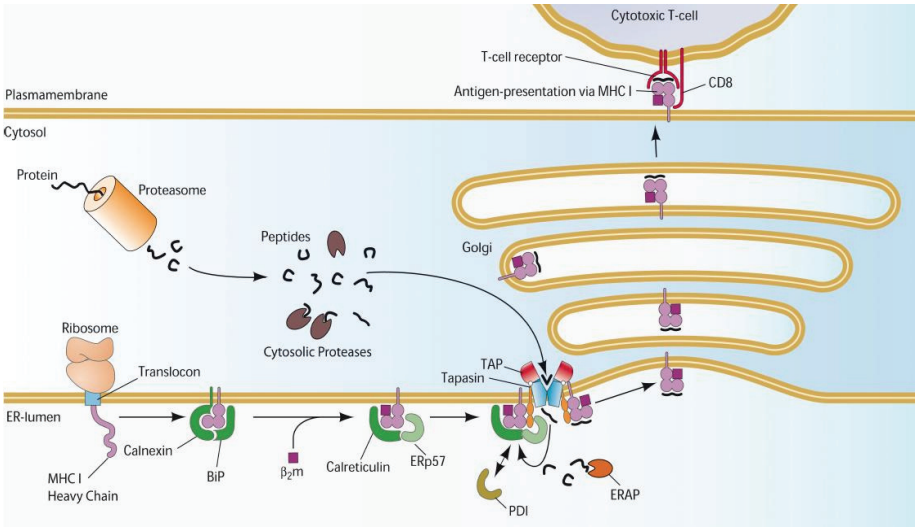
electron crystallography, V-ATPase, aquaporin

講演番号：4SY18-3
講演日時、会場：3月25日14:25～ C校舎26会場

Mechanism of ABC Transporters in Adaptive Immunity and Virus Escape

○Robert Tampé (Institute of Biochemistry, Biocenter, Goethe-University Frankfurt; Center for Membrane Proteomics (CMP); Cluster of Excellence (CEF) – Macromolecular Complexes)

Adaptive immunity plays an essential role in the protection of vertebrates against a broad range of pathogens and cancer. The major histocompatibility complex (MHC) class I-dependent pathway of antigen presentation represents a sophisticated strategy to recognize and eliminate infected or malignantly transformed cells, taking advantage of the constant turnover of the cellular proteome. The ABC transporter associated with antigen processing (TAP) is a key component of this pathway and catalyzes the translocation and loading of antigens onto MHC I molecules in the lumen of the endoplasmic reticulum. The heterodimeric TAP complex is the cornerstone of a macromolecular MHC I loading machinery (1 MDa), consisting of TAP1/2, MHC I, calreticulin, the disulfide isomerase ERp57, as well as the critical adapter protein tapasin. The molecular mechanism of the antigen translocation machinery, the structural organization of the macromolecular peptide-loading complex, and various modes of regulation by newly identified viral factor shall be discussed.



Further reading:

1) Parcej & Tampé (2010) *Nature Chem Biol* 6, 572-80.
2) Wycisk *et al.* (2011) *J Biol Chem*, Epub ahead.
3) Schölz *et al.* (2011) *J Biol Chem* 286, 3228-33.
4) Herget *et al.* (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 1349-54.
5) Baldauf *et al.* (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 9135-40.
6) Oancea *et al.* (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 5551-6.

ABC transporter, transport mechanism, immunology

講演番号：4SY18-4
講演日時、会場：3月25日15:10～ C校舎26会場

ヒトG蛋白共役受容体の構造解析

Structural studies of human G-protein coupled receptors

○岩田　想（京大・医）

○So Iwata(Kyoto Univ.)

Membrane proteins are the supreme example where more effort is needed in structural biology. In spite of their abundance and importance, of the more than 70,000 protein structures in the Protein Data Bank, only some 300 of these structures represent unique membrane proteins. Many major questions remain unanswered; these include the signal transduction mechanism of receptors, the gating mechanisms of ion channels and the molecular transport mechanism of transporters. Our group is developing techniques to solve the bottlenecks in membrane protein crystallography. We are currently focusing on the structural studies on the mammalian G-protein coupled receptors and transporters, which are the membrane proteins with medical or pharmacological relevance and are the measure drug targets. In the symposium, I will present the structures of the human histamine H_1 receptor and the human adenosine A_{2a} receptor complex with an antibody Fab fragment and will discuss structures and mechanisms of these receptors.

Membrane proteins, Protein crystallography, GPCRs

講演番号：4SY18-5
講演日時、会場：3月25日15:35～ C校舎26会場

蛋白質のフォールディングと凝集の統一原理の解明を目指して

Toward understanding a unifying principle of protein folding and aggregation

○後藤　祐児（阪大・蛋白研）
○Yuji Goto (Institute for Protein Research, Osaka University)

Amyloid fibrils are associated with over 30 degenerative diseases including Alzheimer's disease, and dialysis-related amyloidosis. To study amyloid fibrils, we developed three types of unique techniques.

First, we present that ultrasonication is one of the best means of accelerating amyloid nucleation and thus the formation of fibrils [1]. Combining the use of ultrasonication and a microplate reader, we propose an efficient approach to studying the potential of proteins to form amyloid fibrils (Fig. 1) [2]. The results indicate that the solutions of denatured proteins are often supersaturated above the solubility limit and ultrasonic agitations release the supersaturation effectively, excluding solvated monomers to form fibrils. Second, to visualize the growth of fibrils in real time at the single fibril level, we combined total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) with amyloid-specific thioflavin T (ThT) fluorescence [3]. Third, we developed a hydrogen/deuterium (H/D) exchange method that allows mapping of the core region of the amyloid fibrils at single-residue resolution [4]. This approach has been applied to the kinetic intermediate of fibril formation.

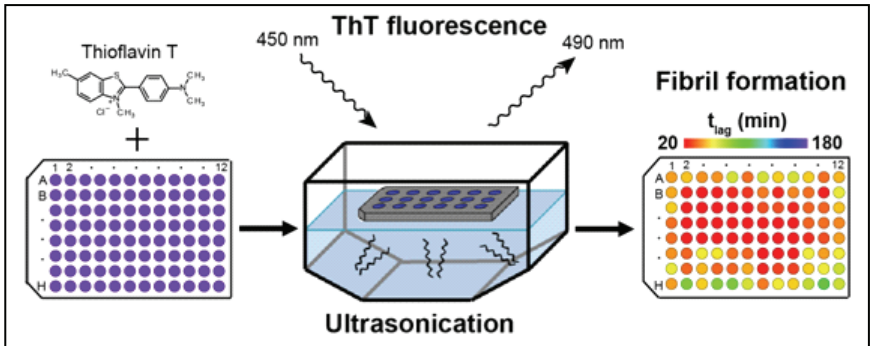


Fig. 1. Ultrasonication-dependent acceleration of amyloid fibrils.

With these techniques, we compare the mechanisms of protein folding and misfolding, proposing a general view of how the structure of precipitates varies dramatically from single crystals to amyloid fibrils and amorphous aggregates (Fig. 2).

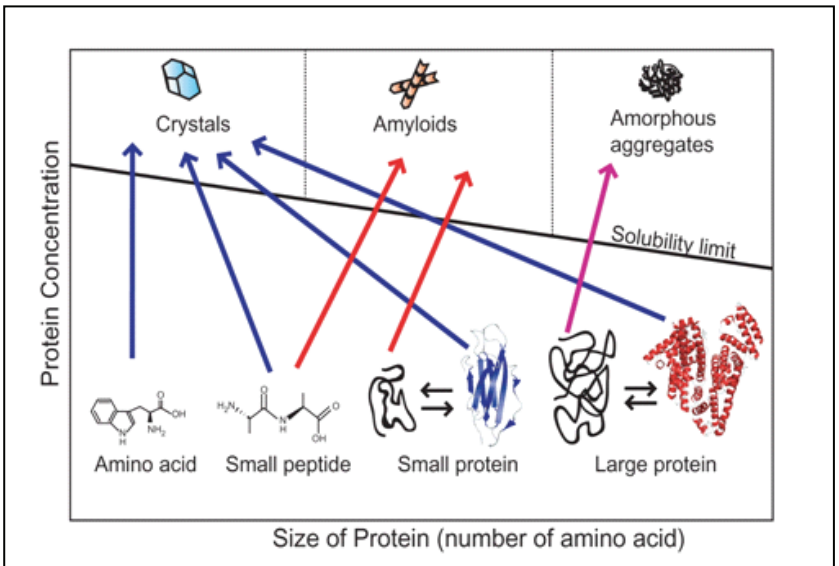


Fig. 2. General phase diagram of the length- and concentration-dependent conformational transition of peptides and proteins.

References: [1] Chatani, E. et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 11119. [2] So et al. (2011) J. Mol. Biol. 412, 568. [3] Ban, T. et al. (2006) Acc. Chem. Res. 39, 663. [4] Hoshino, M. et al. (2002) Nat. Struct. Biol. 9, 332.

Protein folding, Aggregation, Amyloids

講演番号:4SY18-6
講演日時、会場:3月25日16:00～ C校舎26会場

超好熱菌の低温ストレス誘導型分子シャペロンによる酵素の安定化

Effect of cold-stress inducible chaperonin on specific substrates in hyperthermophile

○藤原伸介（関西学院大・理工）
○Shinsuke Fujiwara (Dept. Biosci.,Kwansei-Gakuin Univ.)

Some hyperthermophiles possess unique cold-stress adaptation mechanisms. *Thermococcus kodakarensis* grown at 85 ˚C optimally survives at lower temperatures (58-100˚C) than *Pyrococcus* spp. (67-103˚C), both of which are in the Thermococcales order. To achieve cell growth at lower temperature range, unique factors such as prefoldins[1], DEAD-box helicase [2], and membrane components [3] are considered to play an important role. Besides them, *T. kodakarensis* possesses a unique cold-inducible chaperonin, CpkA, in addition to a conventional heat-inducible one [4]. The expressions of CpkA and CpkB are respectively induced by a temperature down-shift to 60 ˚C and up-shift to 93 ˚C [4,5]. The *cpkA* disruptant DA1 (Δ*pyr*, Δ*cpkA*) showed poor cell growth at 60˚C but no significant defects at 85˚C and 93˚C. On the other hand, *cpkB* disruption DB1 (Δ*pyrF*, Δ*cpkB*) led to growth defects at 93˚C but no significant defects at 60˚C and 85˚C. The mutant strain DB2 (Δ*cpkA*::*cpkB*, Δ*cpkB*), whose *cpkB* gene was expressed only under *cpkA* promoter control, did not grow at 60˚C. In contrast, the mutant DB3 (Δ*cpkA1-524*:: *cpkB1-524*, Δ*cpkB*), whose amino acid residues in CpkA 1 to 524 were replaced with corresponding residues in CpkB under *cpkA* promoter regulation, was resuscitated at 60˚C, implying that the C-terminal region plays a key role in Cpk function and the existence of specific CpkA targets. We focused on specific targets of cold-inducible CpkA and screened. Comparative pull-down studies were performed using soluble cytoplasmic fractions from DA1 or DB1 with Anti-Cpk. Several proteins were specifically recognized by CpkA. One of the most significant candidates was indole-3-glycerol-phosphate synthase (EC 4.1.1.48), *Tk*-TrpC, encoded by *trpC* gene locates at the first of *trpCDEGFBA* operon. *Tk*-TrpC was obtained as a recombinant form, and the effects of Cpks on *Tk*-TrpC were examined. Both CpkA and CpkB enhanced the thermostability of *Tk*-TrpC while only CpkA prevented the thermal aggregation of *Tk*-TrpC. The refolding of denatured *Tk*-TrpC was accelerated only in the presence of CpkA. The obtained results indicate that *Tk*-TrpC is a specific target for CpkA.

[1] Danno,A. et al., J.Mol.Biol., 382, 298-311 (2008), [2] Shimada,Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 389, 622-627 (2009), [3] Matsuno,Y. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.73/1, 104-108 (2009), [4] Fujiwara,S. et al., Appl. Environ. Microbiol.,74/23, 7306-7312 (2008), [5] Kanai,T. et al., J.Biochem., 147/3, 361-370 (2010)

archaea, cold stress, chaperonin

講演番号：4SY18-7
講演日時、会場：3月25日16:25～ C校舎26会場

Unique maturation mechanism of Tk-subtilisin from a hyperthermophilic archaeon

Shigenori Kanaya（Dep. of Mat. and Life Sci., Grad. Sch. of Eng., Osaka University）

Subtilisins are extracellular alkaline serine proteases with the catalytic triad consisting of Asp, His, and Ser. Because of the broad substrate specificity and ease of the large-scale preparation, subtilisins are widely used for industrial purposes, especially as additives of detergents[1)]. Tk-subtilisin from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* is a highly thermostable enzyme with the optimum temperature for activity of 90°C and half-life at 100°C of 50 min[2)]. This protease has a great advantage over other proteases in high stability and therefore to have great potential for biotechnological applications. Tk-subtilisin is synthesized as Prepro-Tk-subtilisin, in which a signal peptide and a propeptide (Tk-propeptide) are attached to the N-terminus of the mature domain, secreted to the external medium as Pro-Tk-subtilisin with the assistance of a signal peptide, and matured by three steps: 1) folding of Pro-Tk-subtilisin, 2) autoprocessing of Tk-propeptide, and 3) degradation of Tk-propeptide[2)], as bacterial subtilisins do[3)]. However, its folding mechanism is different from that of bacterial subtilisins in terms of the requirement of Ca^{2+} for folding[2,4)]. Bacterial subtilisins do not require Ca^{2+} for folding, but require propeptide for it. In contrast, Tk-subtilisin does not require propeptide, but requires Ca^{2+} for folding. Then, the question arises as to whether Tk-subtilisin has unique Ca^{2+}-binding sites required for folding. The crystallographic studies indicate that the structure of Tk-subtilisin is highly similar to those of bacterial subtilisins, except that Tk-subtilisin contains seven, instead of two, Ca^{2+}-binding sites (Ca1-Ca7)[4,5)]. This number is the highest among those so far reported for various subtilisin-like serine proteases. All Ca^{2+}-binding sites are located at the surface loops far from the active site. The Ca1 site is conserved in bacterial subtilisins (site 1 or site A), while the other sites are unique to Tk-subtilisin. Construction of the mutant proteins lacking either one of these Ca^{2+}-binding sites, followed by the determination of their folding rates and stability indicate that the Ca^{2+}-binding loop containing the Ca2-Ca5 sites is required for folding and the other sites are required for stability[6)]. The crystallographic studies also indicate that, unlike bacterial subtilisins, Pro-Tk-subtilisin is almost fully folded prior to autoprocessing due to the presence of an insertion sequence at the autoprocessing site[5)]. Tk-propeptide is not required for folding of Tk-subtilisin, but is required for acceleration of folding rate of Tk-subtilisin[7)]. It is also a strong slow-binding inhibitor of Tk-subtilisin[8)]. Based on these results, we discuss the unique maturation mechanism of Tk-subtilisin and its possible application.

1) Schäfer, T. *et al*. (2007) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. **105**, 59-131. 2) Pulido, M. et al. (2006) *Appl. Environ. Microbiol*. **72**, 4154-4162. 3) Shinde, U. & Inouye, M. (1996) *Adv. Exp. Med. Biol*. **379**, 147-154. 4) Tanaka, S. *et al*. (2007) *J. Biol. Chem*. **282**, 8246-8255. 5) Tanaka, S. *et al*. (2007) *J. Mol. Biol*. **372**, 1055-1069. 6) Takeuchi, Y. *et al*. (2009) *Biochemistry* **48**, 10637-10643. 7) Tanaka, S. *et al*. (2008) *FEBS Lett*. **582**, 3875-3878. 8) Pulido, M. et al. (2007) *J. Mol. Biol*. **374**, 1359-1373.

Tk-subtilisin, hyperthermophilic archaeon, maturation mechanism

講演番号:4SY19-1
講演日時、会場:3月25日13:30～ C校舎27会場

微生物ゲノム塩基組成の深遠さ

Profoundness of microbial genome base composition

○西田 洋巳（東大院農生科・アグリバイオ）
○Hiromi Nishida (Univ. Tokyo)

外来性のDNA挿入領域からの遺伝子発現を制御することはゲノム設計において極めて重要な課題である。AT含量に富む外来性のDNA挿入領域にヒストン様タンパク質を結合させ、その領域からの遺伝子発現を抑制する機構がサルモネラなど複数のバクテリアで報告されている。そこで「DNAの塩基組成の偏りが意味するものは何か」というテーマで発表する。

さて、グアニンやシトシンの生合成に要するエネルギーはアデニンやチミンの生合成に要するエネルギーより大きいにもかかわらず、微生物ゲノムのGC含量の分布は17%から75%に広く分布している。GC含量の偏りはDNA複製時における点突然変異の偏りに基づくと考えられてきたが、それだけでは説明できないことが近年報告されている。また、コドン使用頻度やアミノ酸組成を調整することによりGC含量が維持されていること、細胞外から染色体DNAに挿入されたDNA断片が修正されて宿主のGC含量に近づけられることが報告されている。

筆者はこれまでにゲノム情報の比較に基づく微生物進化学解析を行い、オルソログの点突然変異の数の違いに基づく比較では進化的要因が強く影響を与え、他方、ゲノムを構成している遺伝子構成の違いに基づく比較では環境的要因が強く影響していること示してきた。広い範囲の微生物進化系統樹におけるゲノムGC含量の偏りは複数箇所に現れ、GC含量の増減が微生物種毎に異なっていることを意味している。これまでにバクテリアのゲノムサイズとGC含量が相関していること、ファージやプラスミドのGC含量がそれらの宿主のクロモソームのGC含量より低いことが示されている。そこで、アーキアにおいてこれらのことを解析した結果、ゲノムサイズとGC含量の相関はとても低く、プラスミドのGC含量がその宿主クロモソームのGC含量より低いことは顕著であった。また、バクテリアにおいてはプラスミドの宿主クロモソームのGC含量は広く分布しているのに対し、アーキアでは高GC含量のゲノムを持つ宿主に偏ってプラスミドを持つ傾向が見られた。興味深いことには、プラスミドのGC含量とその宿主クロモソームのGC含量の差は5%程度であり、大きく違ってはいない。この結果は外来性のDNA挿入領域がその他の領域よりもAT含量に富むことに関係していると考えられる。

GC含量とゲノムシグニチャー（数塩基配列のゲノムにおける出現頻度プロファイル）は強い相関が見られ、オリゴ塩基の出現プロファイルは各生物種でランダムになっておらず、高GCゲノムにおけるオリゴ塩基出現プロファイルは異なる生物種間において極めて類似しており、高ATゲノムにおけるプロファイルについても同様であることが報告された（もちろん、高GCゲノムと低GCゲノムにおけるプロファイルは大きく異なっている）。このことは微生物におけるゲノムのGC含量の維持は特定のオリゴ塩基の出現パターンに基づいていることを示し、ゲノムシグニチャー比較に基づく系統関係がGC含量比率に従いクラスターを形成することと一致する。

Microbes, Genome, Evolution

講演番号：4SY19-2
講演日時、会場：3月25日14:00～ C校舎27会場

ゲノム合成のシナリオ

板谷 光泰（慶應大・先端生命研）

Present scenarios for giant DNA synthesis.

Mitsuhiro ITAYA, (Inst. Adv. Biosci. Keio Univ)

生物は全て DNA（ゲノム）を保有しており、ゲノムは数百から数千の遺伝子で構成される細胞内での最大の高分子である。高分子の性質ゆえに最小のバクテリアゲノム Mycoplasma（585 kb、480 遺伝子）でさえも試験管（水溶液）で安定に操作するには巨大すぎて大変困難であったが、枯草菌(1)と酵母(2)で安定にクローニングできる例が報告された。青写真どおりの塩基配列を有するゲノムが有機合成の手法で作れる技術が達成された事実はインパクトがあり(3)、生物の生き様そのものを予測しゲノムをデザインすることが可能になった。ゲノムをデザインするとは、数百を超える遺伝子のリストではなく、実際の塩基配列を書き下ろすことである。即ち遺伝子の並び順だけでなく、方向、遺伝子間の配列等々、ゲノムの塩基配列を書き下ろす作業は現在の我々の知識と経験では大変困難である。実際には、「既存ゲノムの一部デザイン→合成→細胞への導入→有用細胞の再設計」の試行錯誤プロセスの時代が続くだろう。試行錯誤には時として自然に学ぶ方法論が有効で、我々は既存ゲノム構造（塩基配列）と細胞の遺伝子ネットワークに関して独自の切込みを行ってきている(4)。対象が既存ゲノムであれ合成ゲノムであれ、２つの独立した細菌ゲノムを一つの細胞に共存させて、遺伝子ネットワークの切り換えに必要な因子を探る試みである。バクテリアゲノムを丸ごとクローニングできる枯草菌のシステムの有用性をあらためて紹介し、このような合成生物学的なアプローチが逆に現存ゲノムの理解を深化させる点も改めて喚起したい。

【参考文献】

(1)Itaya, et al., PNAS (2005)
(2) Gibson et al., Science (2008, 2010)
(3)板谷光泰：ゲノム合成の起承転結：岩波科学 Vol.80 No.7 (2010)
(4)板谷光泰：「化学合成法による微生物ゲノムの構築の設計」バイオサイエンスとインダストリー、66, No.9, 514-516 (2008)

genome synthesis, genome designing, *Bacillus subtilis*.

講演番号：4SY19-3
講演日時、会場：3月25日14:30～ C校舎27会場

合成生物学の申し子「シアノバチルス1号」のゲノム機能解析

Functional analysis of the first synthetic genome of Cyanobacillus.

○吉川 博文[1]、渡辺 智[1]、志波 優[2]、西田洋巳[3]、板谷光泰[4]（東京農大応生科・バイオ[1]、東京農大・ゲノム解析セ[2]、東大院農生科[3]、慶応大先端生命研[4]）

○Hirofumi Yoshikawa[1], Satoru Watanabe[1], Yuh Shiwa[2], Hiromi Nishida[3], Mitsuhiro Itaya[4] (Dept. Biosci, Tokyo Univ. Agric.[1], Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric.[2], Grad. Sch. Agr. Life Scis., Univ. Tokyo[3], Inst. Adv. Sci., Keio Univ.[4])

枯草菌168株にシアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC6803株の全ゲノムを導入したシアノバチルス1号（1）のゲノム解読を行った結果、いくつかの興味深い現象が観察された。ホストゲノムとしての枯草菌168株は、1958年J. Spizizenによって単離されて以来、世界中の研究者によって植継がれてきたが、今回の解析により、その系譜の一部が読み取れた。すなわちプロファージSPβの欠失や類縁種DNAの形質転換による制限修飾系の脱落が確認された。また、シアノバチルスゲノムの特徴的変異として本来は胞子形成期特異的な反応であるSkinエレメントの脱落が起きていることが明らかとなった。一方、ゲストゲノムとしての6803株も、1968年オークランドで単離されて以来世界各地に配布され、その亜系株の小進化について我々は報告しているが（2）、シアノバチルスゲノムではトランスポゾン領域の大規模欠失が起きていた。このような2カ所の欠失がいつの時点で起きたかは不明であるが、シアノバチルス完成直後には保持していたと考えられ、その後の何らかのストレスが要因であると考えている。

現在、対数増殖期のシアノバチルスにおけるOri/Ter比は２であり、枯草菌の複製様式で増殖している。また、シアノバクテリア領域の遺伝子発現も非常に少ない。当該領域の発現を増やす工夫をいくつか試行しているが、このような操作の結果、十分に解析してきた元々の2つのゲノム領域に起きる変化に注目していきたい。このようなプロセスを通して、世界初の完全合成ゲノムを持つ細胞の進化を追跡し、バクテリアにおける“種”の概念の確定、異種遺伝子発現の問題点として残る“壁”を乗り越える方法論、代謝系合成による新規物質生産への道を開くコンセプト等々の確立に向けた基盤を築きたいと考えている。

（１）Combining two genomes in one cell: stable cloning of the *Synechocystis* PCC6803 genome in the *Bacillus subtilis* 168 genome. Itaya et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (2005) 15971-6

（２）Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Kanesaki et al. DNA Res. *in press*



Cyanobacillus, Synthetic genome, Whole-Genome resequencing

講演番号：4SY19-4
講演日時、会場：3月25日15:00～ C校舎27会場

合成ゲノムベクターを用いたマウス遺伝子改変

Synthetic genome vector as a novel platform for mouse genetics

岩田 哲郎[1]、金子 真也[1]、○廣田 順二[1,2]（[1]東工大院・生命理工、[2]東工大・バイオ研究基盤支援総合センター）

Testuo Iwata[1], Shinya Kaneko[1], ○Junji Hirota[1,2] ([1]Tokyo Inst. of Tech., Grad. School Biosci. Biotech., [2]Tokyo Inst. of Tech., Center for Biological Resources and Informatics)

細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）、P1バクテリオファージ人工染色体（PAC）は、巨大DNAクローニングシステムとして、ゲノムライブラリーの構築やゲノムDNAの機能解析に大きな役割を果たしてきた。これらのシステムは多くの実績がある一方で、扱えるDNAサイズの限界や遺伝子操作性・安定性など解決すべき問題点も多い。本講演では、従来法を超える能力を有する合成ゲノムベクターシステムである枯草菌ゲノム（BGM）ベクターを巨大DNA操作のための新たなプラットフォームとして活用し、それを用いた遺伝子改変マウス作出について従来法と比較しつつ紹介したい。

遺伝子改変マウスを用いた研究は、生体内における遺伝子の機能解析、疾病モデル動物作出、など多岐にわたり、現代のライフサイエンス研究に不可欠な存在となっている。なかでもトランスジェニックマウスは、比較的簡便に作出が可能であることから、幅広く利用されている。巨大ゲノムDNA断片をトランスジーンとして用いた研究は、遺伝子発現解析、エンハンサー・プロモーター解析、疾患原因遺伝子の相補実験などに幅広く適用されている。これまで巨大DNA断片の操作には、主にYAC, BACクローンが用いられてきたが、これらには扱えるDNAサイズ、操作性（回収法、改変操作）や安定性（脱落、キメラ化）などの問題から、その応用範囲に限界がある。BGMベクターシステムは、Mb以上のDNA断片のクローニング能力を有しており、また連続的な遺伝子改変操作が可能であることから、新たな巨大DNA遺伝子操作のプラットフォームとして、今後ゲノムワイドな解析ツールとして活用が期待される。

本講演では、BGMベクターシステムをマウス嗅覚受容体多重遺伝子クラスターの発現制御機構解析に適用し、BGMベクター上での遺伝子操作からトランスジェニックマウス作出までの技術開発について紹介する。

Bacillus subtilis, genome vector, transgenic mouse

講演番号：4SY19-5
講演日時、会場：3月25日15:30～ C校舎27会場

新しい育種技術「不均衡変異導入法」におけるゲノムワイドな変異スペクトル解析

Whole-Genome Profiling of variants obtained by disparity mutagenesis technology

○笠原 堅[1]、志波 優[2]、田中（福島） 早苗[1]、堀内貴之[1]、越智幸三[3]、吉川博文[2,4]（(株) ネオ・モルガン研究所[1]、東農大・ゲノム解析セ[2]、広工大・情報[3]、東農大応生科・バイオ[4]）

○Ken Kasahara[1], Yuh Shiwa[2], Sanae Fukushima-Tanaka[1], Takayuki Horiuchi[1], Kozo Ochi[3], Hirofumi Yoshikawa[2,4] (Neo-Morgan Laboratory Inc. [1], Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric. [2], Hiroshima Institute Technol. [3], Dept. Biosci, Tokyo Univ. Agric. [4])

不均衡進化理論は、ラギング鎖の複製に伴う複製エラーに進化の原動力が潜むという考え方である。我々はこの説に則り、ラギング鎖の複製エラー頻度を高め、進化の原動力を活性化する方法として不均衡変異導入法を確立し、主に微生物の物質生産性能・物質転換性能の向上で実績をあげてきた。

突然変異を導入する方法としては、物理的にDNAを損傷し変異を導入する紫外線やX線照射、化学的にDNAを損傷し変異を導入するN－メチル－N'－ニトロ－N－ニトロソグアニジン（MNNG）やエチルメタンスルホン酸（EMS）などのアルキル化試薬処理もあるが、複製エラー頻度を高める不均衡変異導入法とは変異発生メカニズムが異なるため、変異の質も異なると考えていた。今回、出芽酵母において、不均衡変異株とEMS処理株をそれぞれ非選択圧下でクローン化し、次世代シーケンサーによるゲノムワイドな変異解析により、その本質的な違いについて検証した。

【変異スペクトル】EMS処理によって得られる変異は、GC→ATのトランジションに偏ることはすでに知られていたが、今回も、EMS処理株ではGC→ATへの偏りが確認された。一方、不均衡変異株では、変異の入り方にほとんど偏りがなく、また非同義置換が7割程度あり、高頻度でアミノ酸置換を引き起こしていた。

【見かけの変異頻度と実際の変異頻度】シーケンスした不均衡変異株・EMS処理株、それぞれのクローンを含む元集団を用いた薬剤耐性試験では、EMS処理群より不均衡変異株群の方が高頻度で薬剤耐性株が出現し、変異頻度は不均衡変異株の方が高いと示唆されていたが、実際のシーケンス結果では、EMS処理株の方が高頻度で変異が確認された。

【クローンの重複】不均衡変異株は複製を伴う変異導入法であることから、複製に伴うクローンの重複が懸念されていたが、今回評価した不均衡変異株５クローンには、重複は見られなかった。

つまり、不均衡変異導入法により効率よく多様なクローンを含む集団を調製することで、微生物の能力向上などが実現できたと考えられる。

現在、リボソーム工学と不均衡変異導入法による微生物育種法の開発を進めている。その一環で得られた育種株について、リボソームタンパク質（S12）・RNAポリメラーゼβサブユニット（RpoB）それぞれをコードする遺伝子の変異スペクトルを検証し、合わせて紹介する。

Whole-Genome Profiling, Disparity Mutagenesis, Ribosome Engineering

講演番号：4SY19-6
講演日時、会場：3月25日16:00～ C校舎27会場

分裂酵母の染色体改変技術を利用した異種タンパク質生産法の開発

Production of heterologous proteins by use of chromosome engineering in fission yeast

○竹川　薫（九大・院・農）
○Kaoru Takegawa (Faculty of Agriculture, Kyushu University)

分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）は単細胞真核微生物であり、高等動物の遺伝子機能をよく相補し、特にヒト由来のタンパク質生産に利用することができる有用な異種タンパク質生産宿主のひとつである。安価な培地で生育速度が速く、高密度培養が可能な分裂酵母ではあるが、より効率的に異種タンパク質を生産するために、分子生物学的手法を用いた分裂酵母高生産宿主のさらなる開発が必要である。そこで我々は、異種タンパク質生産に不要な分裂酵母染色体領域を削除することで、より高い生産性を有する分裂酵母への改良を試みた。

生物は様々な環境に対応するために、特殊な条件下のみで発現される多数の遺伝子を有している。これらの遺伝子群は栄養十分で生育環境の整った条件においては不要であり、逆に無駄なエネルギーを消費していることが予想される。様々な機能を導入するための宿主細胞として、物質生産に不要な代謝エネルギーの浪費を抑えたシンプルな細胞の構築が望まれている。我々は分裂酵母を宿主として異種タンパク質生産を効率的に行う目的で、細胞内の無駄なエネルギー消費を出来るだけ抑えるため、通常の培養条件下では生育に影響のない遺伝子を可能な限り削除して、異種タンパク質生産に特化した分裂酵母株を作れないかと考えた。分裂酵母は約4900個の遺伝子を持ち、その約26.1%が必須遺伝子であることが最近報告された。これらの必須遺伝子は、3本の染色体上に満遍なく散在しているが、第1，第2染色体末端付近には比較的広い非必須遺伝子領域が存在している。我々の目的である増殖効率を低下させることなく物質生産宿主としての細胞機能の安定性も確保するため、慎重に削除領域の検討を行い、最終的に660kb 染色体削除株を作成した。一連の操作で得られた各種染色体大規模削除株を宿主として、モデルタンパク質を用いた物質生産評価を実施した。モデルタンパク質として、緑色蛍光タンパク質（EGFP）やヒトトランスフェリンを用いて、タンパク質合成効率や分泌効率を評価した。EGFP生産効率は染色体の削除サイズを増やすごとに高くなり、最終的に660kb削除株は野生株の約1.7倍生産量が高まることがわかった。この結果から染色体末端領域の削除に伴って異種タンパク質の生産量が増加しており、削除した特定の１つの遺伝子が影響しているのではなく、100kb以上の染色体領域の削除により生産性が向上することが示唆された。本シンポジウムでは我々がこれまで分裂酵母の有用物質生産システムをどのように構築してきたのか、さらに今後どのように改良すべきであるか、これまでの成果とともに紹介したい。

Idiris et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 403-417 (2010)
Takegawa et al. Biotechnol. Appl. Biochem. 46, 147-155 (2009)

Schizosaccharomyces pombe, Foreign gene expression, Chromosome engineering

講演番号：4SY20-1
講演日時、会場：3月25日13:35～ C校舎28会場

名古屋議定書の概略とその影響

An outline of the Nagoya Protocol and its influences

○磯崎　博司（上智大学大学院・地球環境学研究科）
○Hiroji Isozaki (Graduate School of Global Environmental Studies, Sophia University)

【目的】生物多様性条約の下の名古屋議定書の概略とその影響について解説する。
【概略】生物多様性条約は、生物多様性の保全、生物多様性の構成要素の持続可能な利用、および、遺伝資源の利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分という３つの目的を定めている。開発途上国は、第３の目的に関連して、遺伝資源の取得利用（Access）と利益配分（Benefit Sharing）（ABS）の確保を重視している。ABSの背景には南北問題がある。開発途上国は、南北問題の解決に不可欠な新たな財源として、また、資源ナショナリズムの一環として、遺伝資源を位置づけている。遺伝資源に対する主権的権利は、派生物を通じて国境を越えて、利用国における利用行為や利用者にまで及ぶと主張してきている。

2010年10月に名古屋で開かれた生物多様性条約COP10においてABSに関する名古屋議定書が採択された。その名古屋議定書については、ABSのための国際ルールを定めているとか、提供国のPIC（事前の情報提供に基づく政府同意）を義務づけているとか、提供者との間に利益配分に関するMAT（相互に合意した条件：当事者間の契約）を結ぶことを義務づけているとかの報道がされているが、それらは正確ではない。ABSのルールやPIC・MATなどの義務づけは、これまでと同様に国内法が定めるものである。

名古屋議定書の特徴は、遺伝資源の提供国の国内法に国境を越えた効力を認めて、その遵守制度を樹立していることである。それは、他国の法律の効果を強制することであり、国家主権原則に反するために、きわめて例外的な制度である。それゆえ、外国法の域外適用に対する多くの限定が付されており、対象となる法令違反は、PICおよびMATに関するものに限定されている。また、利用国が提供国の法令の越境効果を受け入れる条件として、その提供国の法令が手続き面の透明性を確保していることも定められている。そのため、わかりにくい複雑な制度になっている。

名古屋議定書のもう一つの特徴は、提供国の国内法違反の行為者ではなく、その違反に関わる遺伝資源を対象としていることである。したがって、日本国内で外国産の遺伝資源を購入・利用する場合であっても、その遺伝資源の利用者は名古屋議定書の影響を受けることとなる。特に、提供国の国内法による「利用」の定義、当該遺伝資源のPIC（またはその他の許可）に記されていた利用目的、PICによってその資源の利用や転売に付された制限や条件、提供国の国内法によるMAT内容に関する制限などによっては、利用が認められないこともあり得る。そのため、購入者や利用者には、購入利用しようとする資源に関わる外国の法令（先住民の慣習規則を含む）の下のPIC・MAT要件の遵守を再確認することが望まれる。

さらに、名古屋議定書は、遺伝資源に付随する伝統的知識も対象としているため、そのような知識に対しても上記と同様の注意が必要とされる。

Nagoya Protocol, ABS, genetic resources

講演番号：4SY20-2
講演日時、会場：3月25日14:15～ C校舎28会場

二国間協力による海外生物資源へのアクセス

Access to the foreign biological resources by bilateral research cooperation

○鶴海 泰久（NITE-BRC）
○Yasuhisa Tsurumi（NITE-BRC）

かつては「人類共通の財産」だった生物資源は、1993年に発効した生物多様性条約（CBD）によって自国の主権的権利と規定された。したがって生物資源を保有する国の許可を得ずに他国が利用することは、営利目的か学術研究であるかを問わず、現在は認められない。CBDは生物資源の保全とともにその持続的な利用を謳っているが、利益配分の問題について資源の提供国（その多くが発展途上国）と利用国の間で長く議論が続いていた。そして昨年、第10回CBD締約国会議（COP10）で名古屋議定書が採択され、アクセスと利益配分（ABS）における一定の決着がみられた。
このような経緯の中、NITEはバイオ部門の設立当初から、CBDの理念を遵守した海外微生物の国内移転に積極的に取り組んできた。まず、提供国に権威ある微生物保存機関がアクセス窓口として存在する場合は、NBRCとの分離・同定・保存等に関する共同事業を実施し、菌株を交換している。一方、提供国の保存機関の体制が発展途上の場合は、育成支援を基本に据えた二国間協力の契約を締結した。これにより我が国の基礎研究やバイオ産業のために、NITEが窓口となって海外諸国の生物資源を貸与して国内機関へ提供することが可能となった。
2003～2008年に共同事業を行ったインドネシアを例に挙げると、提供国の事前同意（PIC）を得るために技術評価応用庁（BPPT）と事業開始前の２年間交渉を繰り返して、包括的覚書（MOU）を取り交わした（MOU更新時に契約先を生物資源の管轄機関である研究技術省（RISTEK）に変更）。続いて実際に事業を展開するインドネシアの５つの機関と、相互に合意する条件（MAT）を具体的に協議し、材料移転契約（MTA）を含む事業契約（PA）を代表機関のインドネシア科学院（LIPI）と締結した。利益配分について、金銭的利益は日本で菌株を提供した際に生ずる利用料を当て、非金銭的利益は人材育成・技術移転・研究情報・論文共著等を中心とした。収集した菌株は分離源や分離者の情報を明確にし、LIPIとNITEで同じ菌株をそれぞれ保存した。NITEは16S rDNAなどの遺伝子情報を解析してインドネシアの研究者とともに分類研究を行い、日本での菌株利用状況や研究結果を定期的にインドネシアへ報告した。一方、インドネシアでは収集菌株による独自の研究や開発が行われた。同様の枠組みの二国間協力はベトナム、モンゴルでも展開し、国内移転した菌株を提供している。さらにこの両国では国内企業や大学研究者の事業参加が認められており、提供国機関およびNITEとの合同探索を毎年実施している。
日本の民間企業や研究機関はCBDの発効以降、資源提供国の管轄機関や交渉窓口の不明確さ、国内法の未整備、さらには利用者の海賊行為を喧伝する団体の存在などから、海外資源へのアクセスを敬遠する傾向が続いている。名古屋議定書は、締約国にABS国内法や認証・監視制度の整備、権限ある窓口機関の設置などを求めており、今後は希望者がPICやMATなどの手続きをより容易に進められるであろうと期待される。

ABS, CBD, Bioprospecting

講演番号：4SY20-3
講演日時、会場：3月25日14:45～ C校舎28会場

タイトル　ベトナムにおける発酵食品からの微生物の探索

Title　Research and Isolation of Microorganisms from fermented foods in Vietnam

○加戸　久生、脇田　義久、高橋　寿洋、執行　達朗（サッポロビール価値創造フロンティア研究所）

○ Hisao Kado, Yoshihisa Wakita, Toshihiro Takahashi, Tatsuro Shigyo (Frontier Laboratories of Value Creation, SAPPORO BREWERIES LTD.)

ビール会社にとって微生物は重要な研究対象であり、我々サッポロビール社においても、酵母や乳酸菌などを中心に様々な研究開発を行っている。

アルコール発酵に欠かせない酵母においては、その生理学的研究にとどまらず、様々な香味を醸す新たな酵母の研究や、ドラフトワンに始まる新ジャンルの製造技術開発といった成果に繋げてきた。また、乳酸菌においても、ビール醸造工程において増殖し、混濁の危険となりうる乳酸菌の生態研究に端を発し、近年ではお客様の健康生活に資するためのプロバイオティクスの研究開発に取組んでいる。これまでの乳酸菌研究から、ビール混濁を引き起こす乳酸菌の判定法の確立や、腸と肝臓を守る乳酸菌 SBL88 の研究開発において成果を得ている。

一方当社は、グローバル戦略のもと東南アジア地域でのビール事業参画を決定し、2011 年ベトナムに生産拠点を築いた。我々はこれを契機として、ベトナム国内でのネットワークを広げるべく、研究開発の交流も進めていきたいと考えており、その活動のひとつとして、2010 年、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）との共同事業「アジア地域における生物遺伝資源の保全と持続可能な利用に関する共同事業」に参画し、ベトナム国に豊富に存在する発酵食品からの微生物（酵母、乳酸菌）の探索を現地大学との共同テーマとして実施した。

2010 年 11 月 7 日～12 月 24 日の間、ベトナム国家大学ハノイ校の Vietnam Type Culture Collection（VTCC)と共同で、ベトナム北部を中心に、発酵食品を中心とした様々な食品素材から酵母および乳酸菌の分離を行った。入手した食品サンプルからの微生物分離作業は、現地（VTCC）で実施し、乳酸菌約 300 株、酵母約 80 株を単離した後日本国内に持ち込んだ。

持ち込んだ微生物は、r DNA の塩基配列による菌株同定を実施し、属・種から安全と見られる株について、食品や飲料への応用の可能性の追求、あるいは健康機能を対象とした複数のスクリーニングに供している。

今回の活動により、これまで国内中心であった自社保有の微生物資源が拡充でき、このコレクションは、今後酒類や食品開発の可能性をより広げることが可能になると思われる。

将来、その土地でサンプリングした微生物を活かした商品を開発し実用化へと結びつけることで、資源国への利益還元に繋げていきたいと考えている。

Keyword Microorganism, Vietnam, SAPPORO BREWERIES

講演番号：4SY20-4
講演日時、会場：3月25日15:15～ C校舎28会場

醗酵創薬における熱帯微生物の活用について

Tropical microorganisms in natural product based drug discovery.

○村松 秀行（アステラスリサーチテクノロジー・醗酵）
○Hideyuki Muramatsu (Astellas Research Technologies)

【要旨】

微生物産物を含む天然物化合物は創薬研究のソースとして重要であり、醗酵創薬の成功率向上にはスクリーニングソースとなる微生物の系統的多様性の拡大が効果的と考えられる。動植物における経験から、熱帯地方における収集による微生物の系統的多様性拡大の可能性が期待されているが、熱帯微生物の多様性に関する研究は少ない。

アステラスでも東南アジアの微生物資源導入について積極的に取り組んでおり、その過程でマレーシアとベトナムの放線菌の系統的多様性について研究を行ってきた。その結果、熱帯微生物の活用がスクリーニングライブラリの多様性拡大に貢献することがわかってきている。これらの熱帯微生物に由来する医薬品の創出は未だ実現していないが、これまでに複数の新規化合物が得られており、その中にはリード候補化合物として研究が進められているものもある。新規形質転換阻害剤として見出されたT5592物質は、*Actinoallomurus* sp. 645122株が生産する新規Anthracycline化合物であり、フィブロネクチン分泌を阻害する。645122株は独自の新規分離法によってマレーシアの落葉より好酸性放線菌として分離されたものである。*Actinoallomurus*は2009年に提唱された新属であり、新規化合物生産株がこの新規性の高い属であったことは、熱帯微生物活用においても新規分離法などの技術開発が重要であることを示唆している。

以上のことから、熱帯微生物は創薬研究において重要なソースとなりうること、その活用には更なる技術開発が重要であることが明らかになった。そのためには、技術移転や研究交流を通して利用国・資源国の双方において研究を活発化できるような適切な関係を構築することが重要であると考えている。

【参考文献】

Muramatsu, H., *et al.* A comparative study of Malaysian and Japanese actinomycetes using a simple identification method based on partial 16S rDNA sequence. *Actinomycetologica* 17, 33-43 (2003)

Muramatsu, H., *et al.* Phylogenetic diversity of acidophilic actinomycetes from Malaysia. *J. Antibiot.* 64, 621-624 (2011)

tropical actinomycetes, phylogenetic diversity, natural product based drug discovery

講演番号：4SY21-1
講演日時、会場：3月25日13:35～ J校舎11会場

植物代謝データに基づいたシステムバイオロジー基盤技術の開発：植物代謝大規模シミュレーションに向けて

Metabolomics simulation toward a huge number of metabolic reactions

○金谷 重彦(NAIST・情報、理研PSC, CREST)
○Shigehiko Kanaya (NAIST, RIKEN PSC, CREST)

植物代謝大規模シミュレーションにおいて、現状で得られる代謝反応に関する情報をより簡便に代謝の流れを把握することが望まれている。そのためには、反応にかかわる代謝物すべてについての微分方程式を解くこと、あるいは、マルコフ過程を用いた統計的手法により代謝量変化を追跡することのいずれかが考えられる。本研究室では、後者のマルコフ過程を用いた統計的手法を用いた時間軸に沿った代謝量の推定法を、Gillespie アルゴリズムを基盤に開発を進めた。このアルゴリズムは、以下の４ステップからなる。

ステップ 1:シミュレーションに関わる各代謝物の分子数の初期値[Xi](i=1,2,…,n)および化学量論的に代謝反応を定義する。ここで j 番目の反応を

$$m^{(Pre)}{}_{j1}\,X_1 + m^{(Pre)}{}_{j2}\,X_2 +\ldots+ m^{(Pre)}{}_{jn}\,X_n \rightarrow m^{(Post)}{}_{j1}\,X_1 + m^{(Post)}{}_{j2}\,X_2 +\ldots+ m^{(Post)}{}_{jn}\,X_n$$

と定義する。ここで、$m^{(Pre)}{}_{ji}$ および $m^{(Post)}{}_{ji}$ は j 番目の反応における i 番目の代謝物の反応前後における分子の数である。また、j 番目の反応における反応強度を c_j とする。また、反応インデックスは j =1,2,…,R と定義する。

ステップ 2: 各代謝物の分子量、反応様式と反応強度から各々の反応の起こりやすさをパラメータ $h_1, h_2,\ldots, h_R$ を計算する。ここで、$h_1, h_2,\ldots, h_R$ の和を１に規格化する。

ステップ 3: $h_1, h_2,\ldots, h_R$ に基づいて、一様乱数により反応を選択する。選ばれた反応を s とする。この反応の化学量論にもとついて、初期値を以下の式により変更する。

$$[Xi] \leftarrow [Xi] - m^{(Pre)}{}_{si} + m^{(Post)}{}_{s1}$$

ステップ 4: 繰返数を超えていなければステップ２にもどる。

Gillespie アルゴリズムにおいては、各代謝物の分子数のいずれかが０になると反応シミュレーションができない。そこで、本研究では、各代謝物の分子数のいずれかが０になっても反応シミュレーションを行えるように改良を加えた。また、転写因子あるいは RNA ポリメラーゼなどの複数の因子によるプロモータとの相互作用を代謝反応に反応できるように、アルゴリズムの改良も試みた。ユーザーが使いやすくなるように GUI によるインタフェースを備えた形式で Simple Simulation System として構築した。本アルゴリズムは、現在報告されている *Arabidopsis thaliana* における代謝全体においても通常のノート PC で 30 秒以内にシミュレーション結果を得ることができる。そこでこのような大規模代謝解析の例をもとの、ストキャスティック・シュミレーションの今後の展開について述べる。

metabolomics, simulation, bioinformatics

講演番号：4SY21-2
講演日時、会場：3月25日14:10～ J校舎11会場

フラックスバランス解析にもとづく代謝シミュレーション

Metabolic simulation based on flux balance analysis

○松田　史生、近藤　昭彦[1]（神戸大・自然科学、[1]神戸大・工）
○Fumio Matsuda, Akihiko Kondo (Kobe Univ)

代謝経路を大規模に改変し、目的物質の大量生産といった新たな機能を持つ細胞を構築するにあたって、目指す代謝経路の「設計図」をデザインする必要性が強く認識されるようになっている。それには、代謝経路の特性を解析し、目的化合物を大量生産すると全体として都合のよい状態を明らかにすることが必要不可欠である。代謝経路の特性を解析する枠組みには、大きく分けて２つある。生物物理の流れをくむシステムズ生物学では、単一の反応の酵素反応速度論から議論を始め、これを多段階反応へと拡張してゆくことで、代謝系全体のふるまいなどのマクロな事象を取り扱おうとする。この利点は代謝システムの動的な側面を解析できる点にあるが、対象とする代謝システムの規模を大きくすると、代謝中間体の濃度や、酵素の反応速度定数などのパラメーターの数が膨大となり、さらにその*in vivo*での値の決定の困難に直面する。一方、代謝工学分野では、まず物質収支に着目して、代謝システム全体が定常状態にあるという仮定を置き、システムのマクロなふるまいの解析を目指す。ここでいう定常とは、代謝フラックスと、代謝中間体含量が時間変化しない状態を指す。代謝反応ネットワークを化学量論行列として表現し、定常状態という束縛条件下に置くと、実測可能な少数の代謝フラックス情報から、代謝システム中の代謝フラックス分布を決定することが可能となる。このフラックスバランス解析は、動的なコントロールに関する検討は困難であるものの、酵素反応速度定数などのパラメーターの情報がなくても実行可能なため、代謝システムの解析に活用され、近年大きく進展してきた。とくにゲノムスケールでの代謝モデルの構築と、線形計画法を用いた代謝シミュレーション法の開発は、代謝経路の解析と、改変のデザインのための重要なツールとなっている。本講演ではフラックスバランス解析の基本的な考え方を示し、演者らが酵母を用いて進めてきたフラックスバランス解析、それにもとづく代謝シミュレーション、さらに代謝プロファイル分析との統合解析などの試みを紹介する。その上で、解析する問題の性質と代謝モデルの規模との関連について議論したい。

Flux balance analysis, metabolic simulation, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：4SY21-3
講演日時、会場：3月25日14:45～ J校舎11会場

同位体標識を用いた代謝フラックス解析とその応用

Metabolic flux analysis using isotope labeling and its application

○古澤　力（阪大院・情報、理研・生命システム研究センター）
○Chikara Furusawa (Gard. Sch. Info. Sci. Tech., Osaka Univ., QBiC, RIKEN)

ゲノム解析など様々な網羅的解析の進展により、ゲノムスケールの代謝モデルの構築とそれを用いたシミュレーションによる代謝予測が可能となり、その予測に基づく合理的な代謝デザインが注目を集めている。一方で、こうした代謝デザインの実験的な検証や、シミュレーションによる予測精度の向上のためには、細胞内の代謝状態を実験的に定量することが重要となる。こうした代謝状態の定量手段として広く用いられているのが、^{13}C標識基質を用い代謝フラックス解析である。この解析手法では、^{13}C標識基質を用いて細胞を培養し、代謝物質を抽出した後に、GC-MSやCE-MSなどの質量分析器を用いて、それら含まれる同位体比を測定する。この同位対比のデータと適切な代謝モデルを用いることによって、非線形の最適化問題を解くことにより細胞内の代謝フラックスを推定する。本講演では、この^{13}C標識基質を用いた代謝フラックス解析の原理を解説し、幾つかの応用例を示した上で、この手法を発展させるために我々が行っている以下の２つの解析手法の開発について紹介する。

①代謝フラックス解析の汎用化プログラムの開発

代謝フラックス解析では一般に、数十の反応経路を持つ代謝モデルを用いるが、その解析には標識物質の収支を表す数百の方程式群を用いた非線形最適化が必要となり、その収支式群の構築の困難さから、代謝モデルや使用する基質の変更に対応した解析は容易ではなかった。それに対して我々は、簡単な設定ファイルを使い、代謝モデル構築や改変を容易とする、汎用性の高いフラックス解析プログラムの開発を行った。

②中間代謝物質データを用いることによる代謝フラックス解析の時間分解能の向上

現在広く行われている代謝フラックス解析では、代謝状態の定常を仮定した上で、菌体構成タンパク質中のアミノ酸を同位体解析に用いている。そのため、解析時には代謝状態が定常である時間を連続培養などを用いて比較的長く取る必要があった。それに対して我々は、ターンオーバーの速い中間代謝物質を解析に用いる手法や、定常状態を仮定せずに、同位対比のダイナミクスの情報から代謝フラックスを推定する手法を用いて、代謝フラックス解析の時間分解能を向上させる手法を開発している。

Metabolic flux analysis, Carbon isotope, Mass spectroscopy

講演番号：4SY21-4
講演日時、会場：3月25日15:20～ J校舎11会場

バイオケミカルシステム理論をベースにした代謝反応解析

Analysis of Metabolic reactions based on Biochemical Systems Theory

○白石 文秀，宇野 陽美[1]（九大院農院・生機科，[1]九大院生資環・生機科）
○Fumihide Shiraishi, Harumi Uno (Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

【目的】LC-MSのような高性能質量分析装置の開発および性能向上により、細胞内代謝物濃度の網羅的測定が可能となりつつある。これによりトータルシステムの特性はもとより、サブシステム間の調節機構、相互作用などが明らかになるものと期待される。しかしながら、千種類を超える代謝物濃度の時間変化データ（メタボロームデータ）を効率よく解析するための有効な方法が定まっていない。このため、現在、メタボロームデータから数式モデルを作り、コンピューターシミュレーションによってシステムの特性を明らかにする手法づくりが世界的に進行中である。その有望な解析法の一つにバイオケミカルシステム理論（BST）がある。ここでは、Michaelis-Menten型式により構成されたアミノ酸合成に対する数式モデルへBSTを適用し、定常状態解析を行うことにより本代謝反応システムの特性を検討した。また、著者らが開発したSoftCADS（Software for calculation of dynamic sensitivities）により、BST解析の範囲外にある動的感度（時間とともに変化する感度）を計算し、本システムの動的特性を検討した。
【方法】Michaelis-Menten型数式モデルをCOSMOS（Converting software of Michaelis-Menten equations to S-system equations)へ適用し、定常状態における対数ゲイン（相対的感度）を求めた。また、同時に得られるS-system型式への変換データをPLAS（Power Law Analysis and Simulation）へ適用し、固有値を求めた。さらに、Michaelis-Menten型数式モデルをSoftCADSへ適用し、ネットワーク内の各酵素の変動に対する代謝物濃度および流束の応答の時間変化（動的対数ゲイン）を計算した。
【結果】固有値解析により、本システムは局所的に安定であること、硬い微分方程式系を構成することなどがわかった。定常状態における対数ゲインには8程度のものが含まれていたが、その大半は1前後もしくはそれ以下のもので構成されていた。これより本数式モデルは頑健性が高いと判定される。しかし、動的対数ゲインには定常状態に到達するまでに10を超えるものが数多くあった。この結果によれば、本数式モデルは頑健性が高いとは言えないことになり、これより頑健性評価では定常状態解析のみでは不十分であり、動的感度解析が必要であることがわかった。3つのアミノ酸を目的生成物としたボトルネック酵素指標（動的感度と代謝物濃度の積）の時間変化から、時間の経過とともにボトルネックがいくつかの酵素間で変わること、最終的にG6PからFDPの生成に関わる酵素反応がボトルネックとなることがわかった。特定の代謝物プールにおいて計算された流束の対数ゲインに対する代謝物濃度の対数ゲインのプロットから、感度の高い箇所の検出ばかりでなく、複数の流出流束が存在する代謝物プールにおいて代謝物濃度と流束の時間的変化の特性が異なることがわかった。以上から、BSTによる定常状態解析およびSoftCADSによる動的感度解析の有用性が明らかとなった。

Metabolic reaction analysis, Dynamic sensitivity, Biochemical systems theory

講演番号：4SY21-5
講演日時、会場：3月25日15:55～ J校舎11会場

ネットワークから捉える代謝システムの形成と適応

Understanding Formation and Adaptation of Metabolic Systems from a Network Perspective

○竹本 和広（JSTさきがけ、東大・院理）
○Kazuhiro Takemoto（JST-PRESTO, U. Tokyo）

生物は、長い進化過程において代謝システムを変化させることでさまざまな代謝物を合成し、環境に適応してきたと考えられる。このような代謝経路の形成や代謝物組成に働く原理を明らかにすることは、代謝システムの適応機構や制御機構の理解において重要である。

近年、代謝システムをネットワーク（グラフ）として表現し、解析する試みが積極的に行われている。このような解析ではシステムを二項関係で記述するため、それを用いた議論には限界があることは確かであるが、その簡潔さゆえに代謝システムの形成と適応について示唆に富んだ結果が多く得られてきているのも事実である（これについては部分的に[1]でも概説している。適応については[2]も参考になる）。本講演では、発表者がこれまでに得た結果も交えながら、その研究動向を紹介し、代謝システムのモデリングやそれに引き続くシステムの理解とデザインの可能性について議論する。

代謝ネットワーク解析については次の話題に焦点を絞ってお話する：（１）重複遺伝子や水平伝搬した遺伝子の代謝ネットワーク上での分布パタン、（２）生物の生育環境（生育温度や栄養要求など）もしく生育様式が代謝ネットワーク構造に与える影響、（３）代謝物の化学特性やタンパク質（酵素）の進化速度やシャペロン要求性、そしてFunctional Promiscuityといった内在的な特性と代謝ネットワーク構造の関係。

これらの解析結果からは代謝ネットワークの形成機構を窺い知ることができ、それに引き続いて、代謝ネットワーク形成に関する理論（数理モデル）の構築も始まっている。例えば、バクテリアの異化代謝の形成を記述するToolboxモデルや、進化イベントマフコフ過程を考えたより一般的な成長ネットワークモデルが存在し、これらについて言及する。

更に、このような知見や数理モデルから、代謝システムの動態推定についても試みがなされている。まだまだ予備的な結果であることに加え適用限界など不明な点も多いが、モデルの簡略化や、測定が難しい部分の代謝動態の推定にも役立つと考えられる。

[1] 竹本和広. 代謝ネットワーク形成の理解に向けて. 細胞を創る・生命システムを創る（実験医学増刊29巻7号）収録, 羊土社, pp. 180-185 (2011).
[2] Nam, H., Conrad, T.M., Lewis, N.E. The role of cellular objectives and selective pressures in metabolic pathway evolution. Current Opinion in Biotechnology, vol. 22, pp. 595-600 (2011).

Metabolic network analysis, Mathematical model, Evolution

講演番号：4SY22-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ J校舎12会場

“ものとり”・“ものづくり”を基盤としたケミカルバイオロジー研究

Chemical biology-based pharmacology

○掛谷　秀昭（京大・院薬）
○Hideaki, Kakeya (Grad. Sch. Phar. Sci., Kyoto Univ.)

近年、ゲノム科学の勃興を契機に様々なアプローチによって、がんをはじめとした様々な多因子疾患の治療薬・予防薬の開発のための分子標的探索が行われているが、切れ味の鋭い生物活性物質（生物活性小分子）の標的タンパク質や標的シグナルパスウェイを同定することは、創薬標的を見出すことにも繋がる。この方法論は、生物活性物質のケミカルバイオロジー研究の機軸の１つであり、微生物や薬用植物などの天然資源は、合成化合物と並んで、生物活性物質探索研究のための重要な資源である。これまでに、免疫抑制剤 FK506(タクロリムス)や抗がん剤タキソール(パクリタキセル)などをはじめとしたブロックバスター的な生物活性物質は人類の福祉に貢献してきたのみならず、学際領域であるケミカルバイオロジーの発展にも大きく貢献している。

我々の研究グループでは、微生物代謝産物、漢方・薬用植物、海洋無脊椎動物、機能性食品などを探索資源に“ものとり（単離精製・構造解析研究)”と“ものづくり（合成研究・代謝工学研究)”を基盤としたケミカルバイオロジー研究を展開し、創薬科学分野に貢献することを目指している。これらの研究・方法論は、本シンポジウムに関連した「Evidence-based functional foods」の創製にも大きく貢献することを期待している。

本シンポジウムにおいては、がんの発症・悪性化などと深い関連がある TGF-β (transforming growth factor-β)によって活性化される細胞内情報伝達系、ならびに血管新生過程に関連する細胞内情報伝達系を阻害する生物活性天然有機分子に関する最近の成果などを中心に紹介する。

chemical biology, natural products, signal transduction

講演番号：4SY22-2
講演日時、会場：3月25日14:12～ J校舎12会場

サリドマイド催奇性の謎を解明

Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity

○半田 宏（東工大ソリューション研究機構、院生命理工）
○Hiroshi Handa (Tokyo Institute of Technology, Solutions Research Laboratory、Graduate School of Bioscience and Biotechnology)

【目的】

アフィニティクロマト用支持体としてサブミクロンオーダーの磁性（FG）ビーズを独自に開発した。そのビーズ表面に低分子化合物を固定化し、それを用いてタンパク質ライブラリーから固定化した化合物と選択的に結合するタンパク質群をワンステップで単離する画期的なアフィニティ精製技術を確立した。この技術を用いて、まず化合物の標的タンパク質を同定し、次に標的タンパク質の機能や活性調節を理解し、さらに標的タンパク質と関連タンパク質群および化合物との相互作用やその制御機構を明らかにし、得られた研究成果を創薬や食品開発といった実用化に供する。

【方法・結果】

これまで薬剤や食品成分である低分子化合物をリンカーを介して固定化したFGビーズを作製し、それを用いて多くの化合物の標的タンパク質を単離・同定してきた。本学会では、免疫調節薬サリドマイドに焦点を絞り、話題を提供したい。サリドマイドは優れた鎮静催眠剤として開発されながら、催奇性という副作用の為に一時は市場から撤退したにもかかわらず、その後いくつかの難病に対する有効性が評価され、市場に復帰した稀有な薬剤である。我々はアフィニティビーズ技術によって、サリドマイドの標的タンパク質としてセレブロン（CRBN）を同定し、それがE3ユビキチンリガーゼのサブユニットである基質受容体として働くことを明らかにした。また、サリドマイドは選択的にCRBNと結合し、ユビキチンリガーゼ活性を阻害することも明らかにした。さらに、ゼブラフィッシュなどの実験動物を用いて、CRBNがサリドマイド催奇性の原因因子であることを証明した。これまでサリドマイドは光学異性体で、S体とR体を持つことが知られていたが、そのいずれが主作用や副作用に関与するかは未解決であった。CRBNがサリドマイドのターゲットであることがわかったので、CRBNがS体とR体のどちらを認識・結合するかを検討した。その結果、CRBNはR体よりもS体と約10倍強く結合することを明らかにした。また近年、CRBNは副作用だけでなく、多発性骨髄腫の治療効果である主作用にも関与することが示唆されたので、本学会ではその結果についても簡単に紹介する予定である。

affinity magnetic beads, thalidomide, drug target

講演番号：4SY22-3
講演日時、会場：3月25日14:54～ J校舎12会場

レドックス修飾タンパク質の構造と機能

〇内田浩二（名大院生命農・応用分子生命科）
〇Koji Uchida (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

活性酸素・活性窒素種、および親電子性物質などの短寿命活性種の多くは、タンパク質に作用するレドックス制御因子であり、タンパク質の化学修飾を介して、シグナル伝達を惹起する。こうした制御因子の細胞生理学的・病理学的役割を理解する上で、それらの標的タンパク質の同定やシグナル伝達機構の解析は不可欠となる。これまでに内外因性の様々なレドックス制御性因子について、それらを感知するケミカルセンサー（レドックスセンサー）あるいはレセプター蛋白質、さらにはレドックス感知機構に連動して惹起されるシグナル伝達の分子制御機構などに関する先端的研究が行われてきている。私たちの研究グループでは、ROS の主要な標的である脂質の酸化に付随して産生されるレドックス反応性（親電子性）物質に着目し、それらにより化学修飾されたタンパク質に関する研究に従事してきている。特に、タンパク質分子上に形成される修飾構造（付加体）の解明及びそれらの高感度検出法の開発、さらにはそれら付加体をリガンドとして認識する受容体シグナリングに関する研究を行ってきた。本シンポジウムでは、シクロペンテノン型プロスタグランジンなどのレドックス反応性物質を取り上げ、タンパク質との分子間相互作用の仕組みやそのリガンド機能などに関する最新の研究成果を紹介したい。

Electrophiles, Redox sensor mechanism, Oxidized lipids

講演番号：4SY22-4
講演日時、会場：3月25日15:36～ J校舎12会場

フードファクターセンシング：機能性食品因子の生体感知システム

Food factor sensing：Sensory system for functional food factors

○立花　宏文[1]（九大院・農院）
○Hirofumi Tachibana（Kyushu Univ.）

【目的】細菌の侵入はToll様受容体といったセンサーで感知され、自然免疫応答を発動させる。我々は、機能性食品因子も生体内のセンサーに感知されることで生体調節作用を発現しているとのコンセプトに基づき、その感知システムの解明に取り組んでいる。本講演では、1）機能性食品因子の生体感知システム（フードファクターセンシング）、2）フードファクターセンシングの分子疫学的検証、3）フードファクターセンシングを標的とした食品機能の増強法について紹介する。

【方法および結果】

１）緑茶カテキンおよび大豆イソフラボンのセンシングに関与する分子

緑茶カテキン EGCG はその細胞膜上のセンサー分子である 67LR（67kDa laminin receptor）と結合し、抗アレルギー作用、血管内皮障害阻害作用、抗炎症作用、がん細胞に対するアポトーシス作用を発揮する。こうした 67LR 依存的な EGCG センシングには、eEF1A, MYPT1, tollip, PKCδ, acid sphingomyelinase, PP2A, eNOS, cGMP, PDE5 などの分子が各作用発現に関与している。

大豆イソフラボンの機能性発現は、そのエストロゲン受容体との高い親和性に基づくものと理解されているが、エストロゲン受容体に依存しない生理作用も存在する。そこで、エストロゲン受容体非依存的な大豆イソフラボンの活性発現を担う遺伝子を探索し、Papd5を同定した。

２）フードファクターセンシングの分子疫学的検証

静岡県掛川市民を対象としたコホート調査および緑茶の介入試験（掛川スタディ）において、食品因子感知遺伝子を搭載したDNAチップ「食品感受性評価チップ®」（三菱レイヨン（株）との共同開発）を用いた解析から、摂飲する緑茶の品種や食・生活習慣等が機能性食品因子の感知遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが明らかになった。

３）フードファクターセンシングを標的とした食品機能の増強法

67LR を介した EGCG の抗がん作用を増強すべく、67LR の発現増強因子との組み合わせ効果を検討したところ、all-*trans*-retinoic acidは retinoic acid receptorを介してメラノーマの 67LR 発現を促進するとともに、EGCG の抗腫瘍作用を増強することを明らかにした。

EGCGは腫瘍細胞に対して選択的に67LR依存性のアポトーシスを誘導する。しかしながらこのアポトーシスの誘導には比較的高濃度のEGCGが必要である。我々はこのアポトーシス誘導経路にcGMPが仲介因子として働いていること、また、5型ホスホジエステラーゼ特異的阻害薬を組み合わせることで正常細胞を傷害することなく、様々ながん細胞に対して67LR依存的なアポトーシスを強力に誘導できることを見出した。

Food factors, sensing, EGCG

講演番号：4SY22-5
講演日時、会場：3月25日16:18～ J校舎12会場

生体タンパク質との相互作用を介したケミカルトレーニング

Chemical training through interactions with biological proteins

○村上 明、大西康太、大倉伸哉、中畑恵利奈、松本晋也[1]
（京大院大・農・食品生物、[1]京女大・家政・食物栄養）
○Akira Murakami, Kohta Ohnishi, Shinya Ohkura, Erina Nakahata, [1]Shinya Matsumoto
(Food Sci & Biotech, Kyoto Univ, [1]Food & Nutr, Kyoto Women's Univ)

一般的にストレスは悪いものと捉えられている。しかし実際は、その強さと防衛能力とのバランスが重要であり、マイルドなストレスはむしろ適応機構を強化する。一方、栄養素やビタミン類以外のファイトケミカルは本来、動物にとって異物であり、好ましい機能性を示す必然性はない。また、薬剤などと比較して、多くのファイトケミカルの化学構造は単純であり、生体タンパク質に対して非特異的に作用する側面が強いと考えられる。以上から、ファイトケミカルが非特異的相互作用を介して生体タンパク質に何らかのストレスを与えるとの仮説を立てた。

私たちは zerumbone（ハナショウガの主要成分）の多彩な生理活性について報告してきた。本物質は求電子性に富むα,β-不飽和カルボニル基を有しており、また単純な低分子化合物であることからタンパク質システイン残基などに対してランダムに付加することが予想された。そこでまず、zerumbone のビオチン標識体を合成し細胞へ添加すると無数のタンパク質が修飾を受けることが確認できた。また、添加６時間後、培地中のビオチン誘導体を除去すると修飾タンパク質の量は時間依存的に減少した。これは、細胞が修飾タンパク質の生成をストレスと認識し、それに対する適応応答として、何らかの分解機構を活性化させたと推察される。さらに、zerumbone の *N*-acetyl-L-cysteine 付加体に対する抗体を作成し、zerumbone で処理した細胞の免疫染色を行ったところ、付加体は細胞質のみならず核内にまで存在することが明らかとなった。Zerumbone で処理した細胞溶解液を抗 HSP90 抗体で免疫沈降することにより、zerumbone 付加タンパク質が HSP90（主要な構成型分子シャペロン）によって認識されることが示唆された。さらに、zerumbone は転写因子 HSF1 の活性化を介して誘導型 HSP70 の発現量を顕著に増加させた。また、線虫（*C. elegans*）においては、消化管で発現する HSP16.2 や 16.41 の mRNA 発現を誘導し、その熱耐性を強化した。一方、食品成分の HSP70 誘導能を広く精査すると、主に分子疎水性の高いファイトケミカルに活性が認められたが、必須栄養素は一部の例外を除き不活性であった。

以上から、ファイトケミカルの摂取が生体タンパク質への非特異的相互作用を介して HSP 活性を増加させ、変性ストレスに対する耐性を賦与・増強している可能性が示唆された。これは、生体異物や酸化ストレスによって解毒・抗酸化酵素が誘導される現象と同義であろう。HSP などの分子シャペロンは抗炎症、抗糖尿病、寿命延伸作用などを有するとの報告もある。ケミカルストレスが許容能力を越えれば毒性に転じることは自明だが、適度な範囲であれば防御能を高めることができる。こうした、永年に渡る「ケミカルトレーニング」がファイトケミカルによる生体調節機構の本態の一部であると解釈した。

heat shock protein, hormesis, target molecule

講演番号:4SY23-1
講演日時、会場:3月25日13:36～ J校舎13会場

天然変性タンパク質のゲノム規模解析　-生命情報学からのアプローチ

Genome-wide analysis on intrinsically disordered proteins : an approach from bioinformatics.

○福地　佐斗志（前工大・工）
○Satoshi Fukuchi (MIT)

天然変性タンパク質の生命情報学的解析は今世紀初頭より発表されはじめ、予測プログラムのゲノムへの適用は、天然変性タンパク質の性質を理解する上で一つの役割を果たしてきた。天然変性領域はアミノ酸配列に特徴があり、多くの予測プログラムが開発されてきており、二次構造予測と同じ枠組みで実装可能であることから、現在でもある程度の実用性を有している。我々のグループでも立体構造予測と変性予測を組み合わせたシステムDICHOT（ダイコット）を開発している。一般に、天然変性領域は配列保存性が低いが、DICHOTはこの性質を陽に用いた変性領域予測システムである。また、多くの予測プログラムが変性領域のみを予測するのに対し、構造予測を組み合わせたDICHOTはアミノ酸配列を天然変性・球状構造に完全に二分する特徴があり、各プロテームの天然変性領域の割合を見積もることが出来る。DICHOTをヒトのプロテームに適用したところ、残基ベースで35%が天然変性、52%が球状構造で既知構造に類似性を示すもの、13%が球状構造だが既知構造に類似性を示さない（構造未知ドメイン)、と見積もられた。DICHOTをショウジョウバエ、線虫、シロイズナズナ、イネ、出芽酵母、分裂酵母、大腸菌、枯草菌、パイロコッカス（古細菌）に適用し比較解析した結果、変性領域の割合は真核生物では３～４割、原核生物間で１割以下となり真核生物タンパク質は天然変性領域を多く含むことが示唆されている[Fukuchi et al., BMC Str. Biol. 2011]。本講演では、DICHOTを用いたプロテーム解析の詳しい結果を述べるとともに、現在我々が開発を進めている、天然変性タンパク質データベースIDEAL(http://www.ideal.force.cs.is.nagoya-u.ac.jp/IDEAL/)の紹介を合わせて行いたい。

intrinsically disordered protein, bioinformatics, proteome analysis

講演番号：4SY23-2
講演日時、会場：3月25日14:04～ J校舎13会場

天然変性領域を介した蛋白質間相互作用と細胞外環境の感知

Interaction through intrinsic disordered regions is involved in sensing extracellular microenvironment

○木岡　紀幸（京大院・農）
○Noriyuki Kioka (Kyoto Univ)

我々の体の中の細胞は、周囲にあるコラーゲンなどの細胞外マトリックスなどの細胞外環境を感知し、それに応じて自らの生存、増殖、分化などの運命を決定している。最近、細胞外マトリックスの種類だけでなく、細胞外マトリックスの堅さなどの細胞外環境の物理的な性質も細胞の運命決定に重要であることが明らかとなり注目されている。例えば培養する細胞外マトリックスの堅さが柔らかいと間葉系幹細胞は神経に分化し、堅いと骨に分化する。このような細胞外環境の感知には、細胞と細胞外マトリックスの接着装置である細胞接着斑が重要であると考えられているが、そのメカニズムはよくわかっていない。

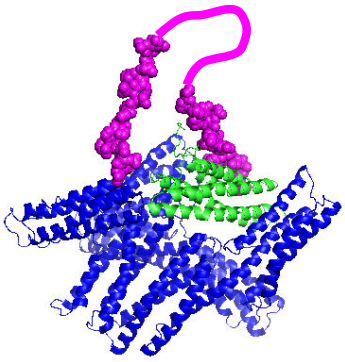


図１ビンキュリンの構造
頭部を青、尾部を緑、天然変性リンカー領域をマゼンダで示す

多種類の蛋白質と相互作用するハブ蛋白質ビンキュリンは、細胞接着斑の主要な構成因子である。ビンキュリンはαヘリックスの束より構成される頭部と尾部、およびそれらをつなぐ折りたたみ構造を取らない変性領域と考えられるリンカー領域から成っている(図1)。我々は以前よりこの天然変性リンカー領域が特定の折りたたみ構造を取らないにもかかわらず線虫からヒトの間でもよく保存されていることに着目し、リンカー領域に結合する蛋白質ビネキシンを単離し機能解析を行ってきた。最近、細胞外マトリックスの堅さの感知に重要な細胞内張力が、細胞接着斑においてこの天然変性リンカー領域にかかっていることが報告され、細胞外マトリックスの堅さの感知(メカノセンス)におけるビンキュリンリンカー領域が注目を集めている。我々はビンキュリンのメカノセンスにおける役割を明らかにするために、アクリルアミドを用いて堅さの異なる培養基盤を作成し、堅い細胞外マトリックス上と柔かい細胞外マトリックス上で培養した細胞でのビンキュリンの挙動を比較した。細胞外マトリックスの堅さにより、ビンキュリンのターンオーバーやアクチン繊維との結合性が変化するなどビンキュリンがメカノセンスに関わることが示された。しかも、これには天然変性リンカー領域を介したビネキシンとの相互作用が必要であることがわかってきた(図2)。さらに、ビネキシン自身もN末側半分が天然変性領域であると考えられている。この天然変性領域の役割も含め、細胞外環境の感知、特に細胞外マトリックスの堅さの感知における天然変性領域を介した蛋白質間相互作用の役割について議論したい。

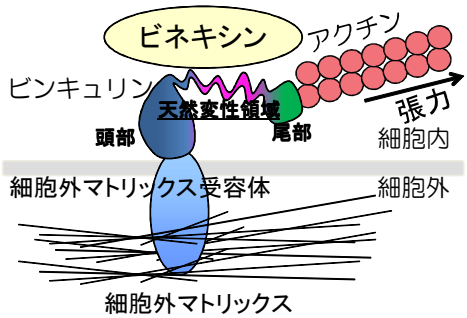


図２　細胞接着斑の模式図

Cell adhesion, signal transduction, vinculin

講演番号：4SY23-3
講演日時、会場：3月25日14:32～ J校舎13会場

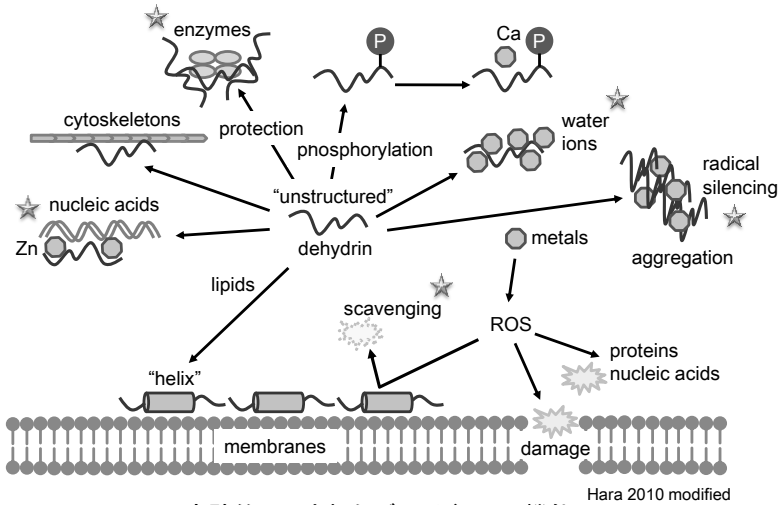
植物のストレス適応に関与する天然変性蛋白質

Intrinsically disordered proteins associating with stress adaptation in plants

○原　正和（静岡大・農）
○Masakazu Hara (Shizuoka Univ)

タンパク質の構造上、特定の立体配置をとらない不定形のポリペプチド鎖からなるタンパク質を天然変性タンパク質、そのような不定形構造をとる領域を天然変性領域という。一般に、錠と鍵モデル(Fisher, 1894年）の提唱以来、タンパク質の立体構造と機能は、高度に構築された立体配置によって説明される。一方、1950年代に、アルブミン研究による立体配置適応説や、カゼインの異常構造が報告され、自然界には、必ずしも固く組み上げられたタンパク質ばかりではない、という認識が広まった。1970年代以後、結晶化しがたいタンパク質の存在が多数報告され、近年、NMR及びバイオインフォマティクス解析が発展し、天然変性蛋白質というパラダイムが提示されている（2000年～）。天然変性タンパク質は、転写、翻訳、情報伝達、細胞分裂、膜生理などの様々な局面で、直接ないしはハブとして機能し、今や、癌やアミロイドーシスを含む重要疾患発症の鍵と目されている。こうした医薬分野における目覚ましい発展の一方、植物における天然変性タンパク質の働きについては、あまり注目されていない。ここでは、われわれが取り組んでいる、植物天然変性タンパク質デハイドリンの機能研究について紹介したい。

解析法や敷居値によるが、植物（シロイヌナズナ）のゲノムにコードされるタンパク質の約半数が天然変性領域をもち、ゲノムコードタンパク質の1～2割が、ほぼ完全に変性状態でありうると推測されている。植物には、乾燥や低温にさらされた時に、または、種子成熟後期に、特異的に生成するタンパク質がある。中でも詳しく調査されているものに、デハイドリン（LEAタンパク質グループ2）がある。デハイドリンは、1980年代後半に発見されて以来、植物のストレス応答マーカーとして広く利用されてきた。しかし、完全な変性状態にあるタンパク質であるため、タンパク質レベルでの機能研究は遅々としていた。われわれは、ミカンの皮で高発現するデハイドリンに関し、生理学的、生化学的な試験を行い、様々な機能を確認してきた。その結果、本ストレスタンパク質の配列特性と変性状態が、植物の生存戦略上、重要な役割を果たす可能性が見えてきた。低温及び重金属ストレスとの関連を中心に、それから想定されるHis型金属結合ペプチド群の存在についても言及したい。



実験的に示されたデハイドリンの機能
全てのデハイドリンが全ての機能を示すとは限らない。

intrinsically disordered protein, dehydrin, stress

講演番号：4SY23-4
講演日時、会場：3月25日15:00～ J校舎13会場

DNA複製フォーク進行停止の修復関連タンパク質に存在する天然変性領域について

Intrinsically disordered regions of the proteins related to stalled replication fork repair

石野良純（九大院・農）
Yoshizumi Ishino (Grad. school of Bioresource & Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

ゲノムがもつ遺伝情報を子孫に伝達するためのDNA複製過程では、多くの関連因子がレプリソームと呼ばれる超分子複合体を形成し、精密に制御されながら複製フォークを進行させる。我々は、複製フォーク進行の分子機構を正確に理解したいと考えて、研究を進めている。超好熱性アーキア（古細菌）のタンパク質は安定性に優れ、レプリソームのような超分子複合体の構造と機能を解析するには、大変優れた実験材料である。我々は、複合体の構造と機能を理解するために、レプリソーム構成因子を高純度に精製し、*in vitro* において複合体を再構築する手法により、これまで多くの知見を得て来た。レプリソーム構成タンパク質の中には、特定の構造を取らず天然変性状態で存在する領域を有するものが種々存在することが予想されている。例えば、複製フォーク進行に重要な働きを担う DNA ポリメラーゼや DNA リガーゼの中にも天然変性状態で存在すると予想される領域があり、それらの機能的役割について大きな興味が持たれる。我々は、特にこのような天然変性領域の機能を解明することによって、分子認識機構の研究の新領域を切り開きたいと考えている。特に注目している事として、停止した複製フォークが修復されるために必要な、フォーク複合体の再編と機能との関係についてであり、それを理解することが重要と考えて実験を進めている。我々は、DNA 複製と協調した修復機構に関わると予想される因子を超好熱性アーキアから発見し、Hef (helicase-associated endonuclease for fork-structured DNA)と名付けた。 このタンパク質はヘリカーゼドメインとヌクレアーゼドメインの間に 100 アミノ酸ほどの長い天然変性領域が存在する。ヒトにおける Hef オルソログは、ファンコニ貧血症の原因遺伝子産物の一つであり、hHef/FancM と呼ばれているが、同様に両ドメインの間の 1200 アミノ酸の領域は天然変性と予想される。我々は、*Thermococcus kodakarensis* を用いて *hef* 遺伝子破壊株を作製することによって、Hef タンパク質が超好熱アーキア細胞中での DNA 修復に重要な役目を果たしていることを証明した。さらに、Hefタンパク質における天然変性領域が、他の関連因子との結合に重要な役割を果たしていると考えて、酵母ツーハイブリッド法を用いて相互作用因子のスクリーニングを行った。天然変性領域を Bait とするスクリーニングで相互作用候補タンパク質をリストアップした。その結果、RecJ 様の 5’-3’エキソヌクレアーゼが得られたので、両者の相互作用について精製タンパク質を用いて確認した。また、ヒト Hef の天然変性領域は顕著に長いので、4つに分断してそれぞれを Bait としてスクリーニングを行った。本シンポジウムでは、アーキアとヒトの Hef/FancM の天然変性領域と相互作用する因子について紹介し、その機能について議論したい。

Intrinsically disordered, DNA replication, molecular recognition

講演番号：4SY23-5
講演日時、会場：3月25日15:28～ J校舎13会場

相同DNA組換反応における天然変性タンパク質の機能

Functions of intrinsically disordered proteins in homologous DNA recombination

○柴田 武彦[1,2]、新井 直人[3]、草野 好司[4]、新宮 良宣[1]、香川 亘[5]、胡桃坂 仁志[5]、伊藤 隆[6]、 美川 務[1]（理研・基幹研、[2]横浜市立大・生体超分子システム科学、[3]日大・生物資源、[4]京都工繊大・遺伝資源キュレーター教育研究センター、[5]早大・理工学術院、[6]首都大・理工）

○Takehiko Shibata[1,2], Naoto Arai[3], Kohji Kusano[4], Wataru Kagawa[5], Hitoshi Kurumizaka[5], Yutaka Ito[6], Tsutomu Mikawa[1] (RIKEN ASI[1], Yokohama City Univ. Supramolecular Sci.[2], Nihon Univ. Applied Bioscience[3], Genetic Resource E&D Kyoto Inst. Technol.[4], Advanced Science and Engineering, Waseda Univ.[5], Chemistry Tokyo Metropolitan Univ.[6])

タンパク質が機能するためには一定の折りたたみ構造が必要であると言われてきた。近年、単体として存在する時には一定の構造を持たないにもかかわらず、特定の相手と特異的に結合し特定の機能を発揮する天然変性タンパク質（IDP）またはそのようなタンパク質部分（天然変性領域，IDR）に注目が集まっている。特に、真核生物の核内タンパク質に多いと言われている。真核生物で普遍的に相同組換に欠かせないRad51とRad52も大きな天然変性領域をもつタンパク質である。相同組換は栄養増殖細胞ではDNA二本鎖切断の修復を行うことでゲノムの安定性に欠かせない。この機能の欠損はゲノムの不安定化を招きガン化などの要因である。最近では組換えホットスポットでの過剰な相同組換は却ってゲノムの不安定化を招き疾患の原因となることも分ってきた。一方、相同組換えは減数分裂での相同染色体分離に欠かせない。その欠損は、異数体の出現や不稔の原因である。交配育種は、相同組換の応用である。また、非生体迅速抗体生産技術ADLib法は、人為的に培養細胞で超高頻度相同組換えを誘導できたことで実現した。Rad51とRad52は、相同組換において、二本鎖切断端から生じる単鎖DNA末端を、それと同じ塩基配列をもつ修復鋳型となる相同二重鎖DNA内部の相補配列と分子間の二重鎖（ヘテロ二重鎖）組換え中間体を作るという相同組換を実現している反応（相同DNA対合）を行う。この反応の中心はRad51がATPの存在下で行う。一方、Rad52はRad51を補佐する仕事を行い、そのC末端側の天然変性領域でRad51と相互作用すると言われている。我々は、Rad52の従来から知られている単鎖DNA結合タンパク質で被われている単鎖DNA部分にRad51を載せる「組換えメディエーター」機能と相補配列をもつ単鎖DNAのアニール活性に加えて、Rad51と共同して、或いは単独で相同DNA対合自身に深く関わっていることを明らかにしている。一方、Rad51は、N末端側に天然変性領域をもつ。本講演では、天然変性領域をもつRad51とRad52との相同組換での機能とその分子機構を紹介する。また、これらの研究で明らかになった知識の技術的な応用について議論する。

Intrinsically disordered protein, Homologous recombination, homologous DNA pairing

講演番号：4SY23-6
講演日時、会場：3月25日15:56～ J校舎13会場

天然変性（ID）領域を介する蛋白間相互作用を標的とする創薬

Drug discovery targeting the protein interaction via "Intrinsically Disordered Interface"

○ 中野洋文 [1, 2] ，小路弘行 [2] （ [1]北里大・生命研、[2] PRISM BioLab ）
○ Hirofumi Nakano[1,2], Hiroyuki Kouji [2] ([1]KITASATOdai, [2]PRISM BioLab)

真核生物のシグナル伝達因子や転写因子などの複合体には"ひらひら"した不定形の（天然変性；Natively Unfolded, Intrinsically Disordered；ID）領域を持つ蛋白が多く含まれ、複数の蛋白質との結合を介して増殖と分化のスイッチなど細胞機能の制御に関与している。 2000年代、ID領域を介する蛋白間相互作用の低分子阻害剤が発見され、新たな創薬分子標的分野が開かれてきた。

☆ PXXP（proline-rich）配列を介する蛋白相互作用の阻害剤：UCS15 （文献 1、2）

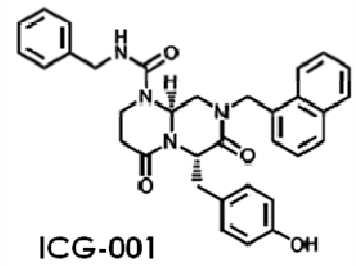
ID領域のモチーフの一つである "proline-rich" 配列はSH3 domainなどとの結合を介して多くの蛋白間相互作用に働いている。 中野らは癌遺伝子Srcの非キナーゼドメインの蛋白間相互作用を阻害する天然物UCS15を見出し、その標的が"proline-rich" 配列であることを明らかにした。 UCS15AはSAM68とSrcファミリー、Grb2とSOS、AMAP1とcortactinなどの蛋白間相互作用を阻害し、破骨細胞の抑制作用や乳癌細胞の浸潤抑制作用が見いだされている。

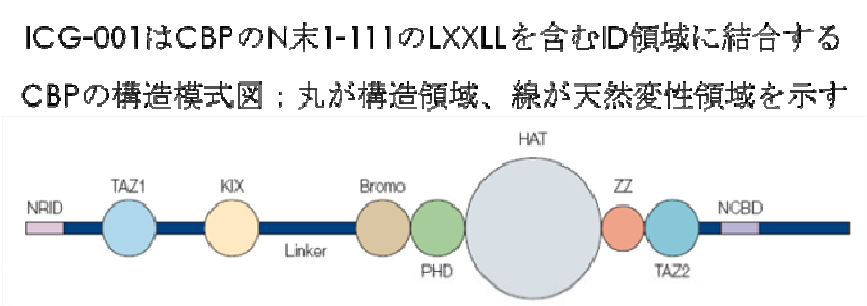
☆ β-カテニンとCBP、β-カテニンとp300の選択的蛋白間相互作用阻害剤（文献 3）

β-カテニン、APCの変異によるWntシグナルの活性化が大腸癌、肝癌などで知られており、Wnt経路を阻害する様々な試みが行われた。 しかし、Wnt経路は多くの組織のホメオスタシス、幹細胞の制御などに働いており、Wnt経路の蛋白を標的とする抗癌剤は副作用が懸念されてきた。

β-カテニンは核内でCBP(CREB-binding protein)またはp300(E1A-binding protein, 300 KDa)のN末天然変性領域に結合し、異なる転写複合体を活性化する。 CBPとp300は高い（93%）アミノ酸配列相同性を持つがPRISM BioLabの小路らはαヘリックス模倣低分子ライブラリーから β-カテニンとCBP、β-カテニンとp300の蛋白相互作用をそれぞれ選択的に阻害できる化合物を見いだした。

β-カテニンとCBPの蛋白相互作用阻害薬(ICG-001の誘導体)は抗癌薬としての臨床試験が進められ、β-カテニンとp300の蛋白相互作用阻害剤は再生医療への利用が試みられている。





(Adapted from P.E. Wright, Nature Rev. Mol. Biol. 2005)

文献 （1）Oncogene 21: 2037, 2002 （2）PNAS 103: 7036, 2006 （3）Future Med. Chem 3: 1745, 2011

Protein Interaction, UCS15, ICG-001

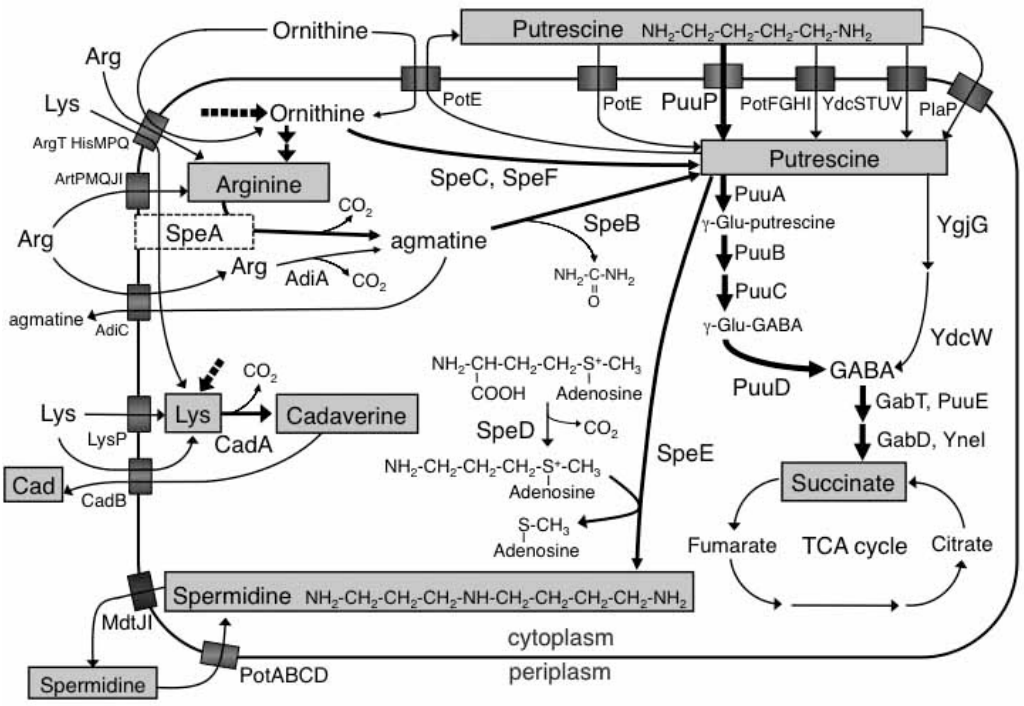
講演番号：4SY24-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ J校舎14会場

モデル生物としての大腸菌のポリアミン代謝

Polyamine metabolism of *Escherichia coli* as a model organism

○鈴木 秀之[1]、栗原 新[2,3,1]（[1]京工繊大工科・応生、[2]エモリー大・医、[3]学振・海外特研）
○Hideyuki Suzuki[1], Shin Kurihara[2,3,1]（[1]KIT, [2]Emory Univ., [3]JSPS）

ポリアミンはアミノ基を複数含む脂肪族アミンであり、多くの生物に見出されている。ポリアミン濃度がガン細胞で高いことやポリアミンの１種であるプトレッシンの生合成酵素であるオルニチン脱炭酸酵素の活性がガン細胞で亢進することから、ポリアミンはガン化と結びつけられてきた。しかし、ポリアミンは翻訳の制御[1)]やタンパク質のポリアミン修飾を通して生物の生理機能を調節しており、[2)]また最近、腸管内のポリアミン濃度の維持が健康維持に重要なことが分かった。[3, 4)]このシンポジウムは、農芸化学的アプローチにより、ひとが健康に長寿社会を生きられる手法を考える機会として企画した。
シンポジウムのイントロを兼ねて、まずモデル生物である大腸菌を例として、これまでに分かっているポリアミン代謝についてまとめて紹介する。



Ref. 1) 五十嵐一衛. **薬学雑誌** 126:455-471 (2006).
2) E. Cordella-Miele *et al.,* **J. Biol. Chem.** 265:17180-17188 (1990).
3) T. Eisenberg *et al.,* **Nat. Cell Biol.** 11:1305-1314 (2009).
4) M. Matsumoto *et al.,* **PLoS One** 6(8):e23652 (2011).

Polyamine, Putrescine, Spermidine

講演番号：4SY24-2
講演日時、会場：3月25日13:45～ J校舎14会場

タイトル　細菌における細胞外シグナルとしてのポリアミンとそのトランスポーター
Title　Transporter of polyamine as a bacterial extracellular signal.

○栗原　新[1,2,3,4]、鈴木　秀之[2]、Philip N. Rather[3]、辨野義己[1]（[1]理研・辨野研、[2]京都工繊大・工芸、[3]エモリー大・医、[4]日本学術振興会 海外特別研究員）
○Shin Kurihara[1,2,3,4], Hideyuki Suzuki[2], Philip N. Rather[3], Yoshimi Benno[1] ([1]Riken, [2]KIT, [3]Emory Univ., [4]JSPS)

細菌は生合成したポリアミン(PA)を細胞外へと放出することが知られている。近年、細胞外へ放出されたPAが細菌間のコミュニケーションに用いられることが明らかとなった。そこで放出されたPAが細菌細胞へと再び取り込まれる際に用いられるトランスポーターに着目し、コミュニケーション阻害を行うことによる病原性細菌の弱毒化を目的として研究を行った。

この研究では遺伝子操作が簡単な大腸菌をモデル生物とし、PA合成系およびPA取り込み系を破壊した大腸菌を用い、大腸菌の表面運動性を指標にして細菌細胞間のコミュニケーションを解析した。得られた知見を尿路感染症菌*Proteus mirabilis*に応用し、swarmingを指標として細菌細胞間のコミュニケーションを解析した。

大腸菌はLB半固形培地上で表面運動性を示す。大腸菌はプトレッシン(Put)とスペルミジン(Spd)の二種類のPAを持ち、SpdはPutから生合成される。Put合成系遺伝子（*speA*、*speB*、*speC*）および、Spd取り込み系遺伝子(*potABCD*)を破壊した大腸菌はLB半固形培地上で表面運動性を失ったが、培地にPutを添加すると再び表面運動性を示した。このPutの取り込み系を同定する目的で、既知のPut取り込み系遺伝子(*potE*、*potFGHI*、*puuP*)、あるいはPut取り込み系をコードすると予想される遺伝子(*ydcSTUV*、*yeeF*）について遺伝子破壊を上記のΔ*speAB* Δ*speC* Δ*potABCD*大腸菌株にそれぞれ導入したところ、Δ*speAB* Δ*speC* Δ*potABCD* Δ*yeeF*大腸菌のみでPutを添加した培地上での表面運動性が失われた。次に*yeeF*遺伝子相補株を作成し、表面運動性およびPut取り込み能を解析した結果、*yeeF*が大腸菌の表面運動性に必要不可欠な新規Put取り込み系であることが明らかとなった。この研究で観察された大腸菌の表面運動性は鞭毛の主要構成タンパクをコードする*fliC*ではなく、タイプ1繊毛の主要構成タンパクである*fimA*に依存することがこれらの遺伝子についての遺伝子破壊および相補実験により明らかとなった。

尿路感染症菌*Proteus mirabilis*は大腸菌の近縁種であり、L固形培地上でswarmingと呼ばれる強い表面運動性を示す。Swarmingには高密度で鞭毛を有することなどが特徴的な遊走型細胞への分化が必要であり、この分化に伴い多くの病原遺伝子が発現することが知られている。これまでの研究で*P. mirabilis*のswarmingにはPutを介した細胞間コミュニケーションが必須であることが知られていたが、Put取り込み系についての知見はなかった。大腸菌の既知取り込み系のアミノ酸配列を用いた相同性検索では、*P. mirabilis*はYeeFのみをPut取り込み系として持っていることが予想された。遺伝子破壊株および遺伝子相補株を用いた解析により、*P. mirabilis*においてもPutを介した細胞間コミュニケーションにYeeFが必須であることが示された。

Polyamine, quorum sensing, surface motility

講演番号：4SY24-3
講演日時、会場：3月25日14:15～ J校舎14会場

トランスグルタミナーゼが触媒するタンパク質のポリアミン修飾による生理機能の調節

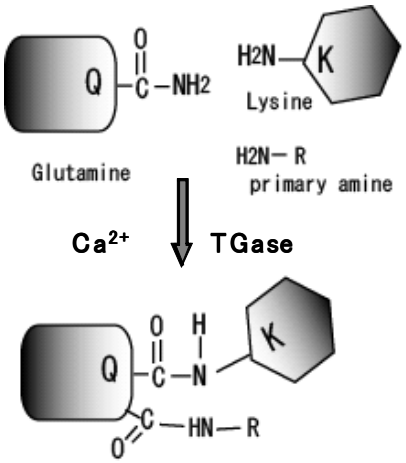
Physiological significance of polyamine modification for proteins by transglutaminase, a cross-linking enzyme

○人見清隆（名大院・生命農学・応用分子生命科）
○Kiyotaka Hitomi (Nagoya Univ. Grad. Sch. Bioagric. Sci.)

生体内に高濃度に存在するポリアミンは、タンパク質架橋化酵素、トランスグルタミナーゼの基質となることが知られている。すなわち、基質となるタンパク質のグルタミン残基とリジン残基の間に形成される架橋反応（イソペプチド結合）において、リジン残基以外に一級アミンがこれに替りうる。そのためポリアミンもこの反応の基質となり、架橋の結果としてタンパク質にポジティブチャージをもたらす反応産物が生まれる事になる。

このようなタンパク質修飾反応は、実際に生体で起こるのかどうかについては、あまり研究例はない。本発表では、現在見つかっている現象を生理機能に関わる可能性のあるものを中心に紹介し、ポリアミンと関連の深い酵素であるトランスグルタミナーゼの最近の研究進捗状況について話題提供したい。

また我々は近年、一級アミンを受け取る側の反応基であるグルタミン残基として、好まれる配列の傾向を明らかにすることを、ファージディスプレイ提示型ペプチドライブラリーを用いて明らかにしてきた。そのようなペプチド配列を、いくつかのアイソザイムごとに同定し、いずれも天然を越える反応生と特異性を有することを示した。これらのペプチドを利用して、生体内に存在するトランスグルタミナーゼの酵素活性測定法の開発を試みてきた。酵素反応において、グルタミン残基受容側の基質としてのリジン残基やポリアミンは、あまり反応についての優劣には差がないものとされてきた。しかし、この過程の中で、我々が得たグルタミン供与基質としてのペプチドでいくつかのポリアミンの反応性を検討した。その結果違いがみられ、最も組織に広汎に存在するTGase 2の場合においてスペルミンとスペルミジンが最も反応性が高いという結果を得た。本発表ではこれらの研究過程と、ポリアミン類の付加修飾に因る生理機能変換を中心にお話したい。



名称	発現部位	関与する主な現象
Factor XIIIa	血漿、血小板、単球マクロファージ	血液凝固
TGase 1	皮膚表皮など上皮組織	表皮形成
TGase 2	広く分布	細胞死、細胞外マトリクスの強化など
TGase 3	皮膚表皮、毛包	表皮形成、毛包形成
TGase 4	前立腺	交尾栓形成（げっ歯類）
TGase 5	広く分布	表皮形成？
TGase 6	不明	不明
TGase 7	広く分布	不明

（１）Sugimura et al. J Biol Chem (2006)
（２）Hitomi et al. Anal. Biochem (2009)
（３）Hitomi et al. Amino Acids (2009)

transglutaminase, polyamine, calcium

講演番号：4SY24-4
講演日時、会場：3月25日14:45～ J校舎14会場

ビフィズス菌の共生戦略

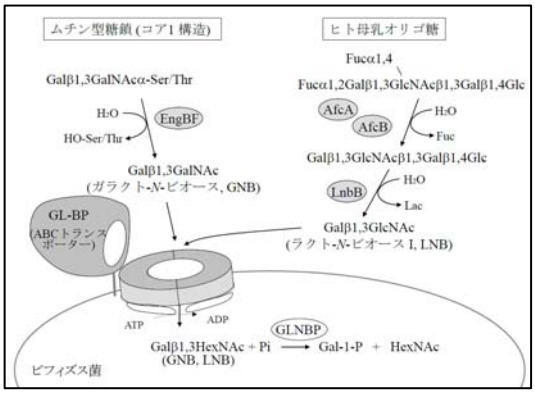
The foraging strategy of bifidobacteria in human intestine.

○片山 高嶺、芦田 久[1]、熊谷 英彦、山本 憲二（石川県大・資源研、[1]京大院・生命）

○Takane Katayama, Hisashi Ashida[1], Hidehiko Kumagai, Kenji Yamamoto (Ishikawa Pref. Univ., [1]Kyoto Univ.)

ビフィズス菌は健康なヒトの腸管に生息し、宿主の健康に好影響を与えるプロバイオティクスとして知られている。ビフィズス菌の産生する乳酸や酢酸は、腸管内の pH を下げることで有害菌の増殖を抑えるのみならず、これら有機酸は腸管上皮細胞の栄養源として使用されたり、G タンパク質共役型受容体を介して炎症反応やエネルギーバランスを調節している。また、ビフィズス菌は腸管上皮細胞の増殖を *in vivo* で促進することも知られている。

ビフィズス菌は宿主の小腸下部から大腸に生息しているが、宿主が摂取した糖成分は宿主自身による消化吸収および消化管上部に生息する腸内細菌によって消費されてしまうため、本菌の生息する消化管下部には容易に分解し得る糖成分はほとんど届かない。そのため、ビフィズス菌は多種多様な糖質分解酵素（グリコシダーゼ）を分泌生産して、難分解性とされる糖成分から栄養を獲得しているとされている。我々は、宿主腸管内における本菌の生息を理解するためには、その特異な糖代謝経路を理解することが重要であると考えて研究を行ってきた。その過程で、ある種のビフィズス菌がヒト由来の糖質に作用する特異なグリコシダーゼ群を有していることを見出した（下図）。従来、ビフィズス菌は食餌由来の難分解性オリゴ糖（食物繊維）を利用して腸管内で生息していると考えられてきたが、実はヒト自身が分泌する糖質を利用しているとも考えられ、ビフィズス菌とヒトの共生を考える上での新しいパラダイムとなった。本講演では、ビフィズス菌が有する母乳オリゴ糖およびムチン型糖鎖の分解経路上にある酵素群の機能を中心に紹介することで、ビフィズス菌の共生戦略にせまりたい。特に、母乳オリゴ糖の資化経路は、腸内細菌の中でもビフィズス菌に極めて特異的に存在しており、このことはビフィズス菌の発見以来の課題であった「母乳栄養児の腸管では何故ビフィズス菌優勢なフローラが形成されるのか」という疑問を解く端緒になると考えている。



ヒト由来の糖質に作用するビフィズス菌の酵素

本研究成果の多くは、北岡本光博士（農研機構・食総研）、伏信進矢准教授（東大院・農生科）、浦島匡教授（帯畜大・畜産衛生）との共同研究によるものである。

bifidobacteria, human milk oligosaccharides, mucin-type *O*-glycans

講演番号：4SY24-5
講演日時、会場：3月25日15:15～ J校舎14会場

腸管内ポリアミン濃度コントロールによる寿命伸長効果

Longevity is promoted by upregulation of gut bacterial polyamine production

○松本 光晴（協同乳業・技術開発）
○Mitsuharu Matsumoto (Kyodo Milk Industry Co.)

ヒト大腸内に生息する腸内常在菌は約 1,000 種類、糞便 1 g あたり 10^{11}－10^{12} 個存在し、宿主の健康に強く関与している。長年、腸内常在菌の解析が盛んに行われてきたが、近年の 16S rRNA 遺伝子を用いた系統分類学的解析が明らかにした腸内菌叢の構造的複雑性（大部分を占める難培養性細菌の存在と個体差の大きさ）は、これまで一般的であった“善玉菌”対“悪玉菌”、腸内菌叢の改善＝*Bifidobacterium* の増加という図式を描くことさえ不可能にし、「理想的な腸内環境とはどのようなものか？」という定義付けが困難な状況である。

演者らは、腸内環境における宿主への影響力は、腸内常在菌の菌種構成より代謝産物の方がより直接的で大きいと考え、代謝産物に着目し研究を進めてきた。数多く存在する腸内常在菌の代謝産物の中から、細胞の増殖や分化に関与し、非常に多岐に渡る機能を有し、全生物種（原核生物～哺乳類および高等植物）に共通に存在する物質であるポリアミンに着目してきた。特に、ポリアミンの有する①抗炎症作用、②核酸安定化作用、③腸管バリア機能の充実化作用、④オートファジー促進作用、は健康と疾病に密接に関与している。これまで、様々な被験者を用いて、プロバイオティクス *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512 投与で腸管内ポリアミン濃度が上昇し、抗炎症作用、抗変異原活性、アトピー性皮膚炎の軽減等を確認してきた。

疫学調査にて老年病の主要因は慢性炎症であることが認められている。また、加齢に伴い細胞のポリアミン合成能は低下する。そこで、腸内細菌にポリアミンを産生させ宿主に供給することで、上述した生理機能により寿命伸長効果が得られると仮説を立て、10 ヶ月齢マウスに週 3 回、1 年間 LKM512 を投与する実験を行った。その結果、腸内ポリアミン濃度の上昇と共に寿命伸長効果が得られた。また、LKM512 投与群は腫瘍や潰瘍の発生頻度も低下し、毛並みも良く活発であった。演者らが知る限り、食品成分で、カロリー制限無しでの哺乳類に対する寿命伸長効果が得られた成分は、レスベラトロールに次ぐ報告であり、重要な知見である。また、この実験では LKM512 投与による結腸組織のアンチエイジング効果が強く認められ、大腸と老化が関連している可能性も示唆された。

一方で、個体差が大きく複雑な腸内菌叢に特定の目的物質を安定的に産生させるのは容易ではない。LKM512 投与でも 1－2 割の被験者はポリアミン濃度が一定レベルに達しない。そこで腸内ポリアミン濃度を適正濃度に上昇させる技術の開発が重要となる。我々は、統一食事摂取試験を実施し、食事由来成分のバイアスを極力減らした糞便を回収し、メタボロミクス解析で糞便内ポリアミン濃度と相関性がある物質を探索し、腸管内ポリアミン濃度制御物質として利用できる可能性を検討したので紹介する。

Polyamine, Intestinal microbiota, Probiotics

講演番号：4SY24-6
講演日時、会場：3月25日15:45～ J校舎14会場

食物中のポリアミンと長寿

The role of food polyamine on longevity

早田邦康（自治医科大学さいたま医療センター）
Kuniyasu Soda (Jichi Medical Universtiy, Saitama Medical Center)

ポリアミンは細胞の増殖や分化に必須の物質で、遺伝子発現や細胞内シグナルなどの細胞機能にも重要な働きを有している。細胞内でのポリアミン合成は加齢とともに低下するが、腸管（食物に含有、もしくは腸内細菌が合成するポリアミン）からの供給が重要であることもわかっている。実際に、高ポリアミン食である納豆（平均 66.4±3.7g／日）を２ヶ月間程度継続摂取すると、血中ポリアミン濃度（免疫細胞の濃度）が徐々に上昇する。ポリアミンは末梢血単核球の leukocyte function associated antigen-1（LFA-1）を選択的に抑制する。LFA-1 は接着分子とも呼ばれ、免疫細胞の活性化に必須である。免疫細胞の活性化は炎症を誘発するが、生活習慣病や老化は慢性の軽微な炎症によって誘発される。ところが、LFA-1 発現は加齢とともに増加し、生活習慣病進行の原因の一つであると考えられている。そこで、合成ポリアミンを加えて大豆の２−３倍程度のポリアミン濃度になるように調整した餌（高ポリアミン餌）を２４週齢のマウスに投与し続けたところ、血中ポリアミン濃度が上昇し、LFA-1 発現増加が抑制され、５０週齢以後の生存率が対照群のマウスの生存率より高くなった。高ポリアミン餌群では、老化とともに進行する腎臓の組織学的変化や加齢に伴って進行する肝臓や腎臓での Senescence marker protein 30 の発現低下が抑制されていた。さらに、老化に伴う遺伝子変化が抑制されていることもわかった。最近になり、スペルミジンがオートファジーを誘導し、線虫などの生物や細胞レベルでの長寿に寄与していることが報告された。これらの下等な生物ではスペルミンが欠損しても成長や生存に影響はないが、哺乳類ではスペルミンの欠損はさまざまな障害を生じる。我々の検討でも、スペルミンの活性はスペルミジンより高く、高ポリアミン食の摂取後に血中に上昇するのはスペルミンが主体である。よって、ヒトを含めた哺乳類の長寿には、活性の強いスペルミンの寄与が大きいと考えられた。一方、殆ど全ての細胞内で合成されるポリアミンは、生物から成り立っている食物にも含まれるが、その濃度は食物間で大きな差がある。日本食やポリフェノールリッチと考えられている地中海食などの健康長寿食は、高ポリアミン食であることもわかっている。

Polyamine, Longevity, Spermine

講演番号：4SY25-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ J校舎15会場

超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析の食品総合評価への応用

Application of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry to comprehensive evaluation of food

○馬場健史（阪大院・工・生命先端）
○Takeshi Bamba (Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

超臨界流体は，液体の溶解性と気体の拡散性の両方の性質を持ち，さらに温度や圧力を変化させることによりその密度が連続的かつ大幅に変化させることができることから，溶媒物性（溶解力，誘電率，拡散係数，粘度など）を精密に制御することにより使用目的に応じた溶媒性能を付与できる高機能の媒体である．また，有害で高コストの有機溶媒の使用量を軽減でき，さらに効率の向上も見込めることから，超臨界流体の利用は低環境負荷で低コストの点から注目されている．これまでに分離・精製，反応など様々な分野において超臨界流体の利用が検討されているが，さらに超臨界流体の効果的な適用技術の開発が進むことにより様々な分野における有効利用が期待できる．

超臨界流体を移動相として用いる超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）は，温度や背圧を変化，すなわち，移動相の状態を変化させることによりGCやHPLCにない幅広い分離モードを選択できる特徴を有する．また，HPLC用の各種カラムが使用でき，カラムや移動相に添加するモディファイヤーを選ぶことによって，幅広い化合物の分離に適用可能である．さらに，低粘性であるためカラム背圧が低いことを利用して，高速モードでの分離やカラム長を伸ばすことにより分離能を向上させることが可能ある．我々のグループでは，各種カラムにおける分離特性に関する知見の取得を行うとともに検出器として様々な質量分析計の接続を試み，多成分の一斉分析を目的とするメタボローム解析や残留農薬分析へ適用技術の開発に取り組んでいる．

さらに，我々のグループでは，変化しやすい成分をマイルドにかつ効率よく抽出できる超臨界流体抽出（SFE）のオンライン化についても積極的に取り組んでいる．抽出操作時に酸化を受けやすい成分を試料より抽出しそのままに分析できるオンラインSFE-SFC/MSは，食品中の抗酸化物質や酸化代謝物などの高精度のプロファイリングを可能にする画期的な手法として期待できる．また，SFEをオンライン化は，揮発成分のプロファイリングにおいてもメリットがある．通常，GCで分けて分析する必要がある揮発成分も同時に抽出・分析できることから，食品成分の総合的な評価において威力を発揮する有用技術である．

本講演では，食品の安全性，品質，機能性の評価におけるSFC/MS適用技術の開発と応用研究について紹介し，食品の総合評価の有用なツールとなりうる超臨界流体利用技術の可能性についても言及したい．

Supercritical fluid chromatography, Mass spectrometry, Metabolic profiling

講演番号：4SY25-2
講演日時、会場：3月25日14:05～ J校舎15会場

残留農薬検査へのオミクス解析技術の導入

Introduction of omics analysis technology to pesticide residues inspection

○安藤 孝（宮崎県総合農業試験場）
○Takashi Ando (Miyazaki Agricultural Research Institute)

平成18年に食品衛生法が大幅改正され、それまでは、いくつかの農産物といくつかの農薬成分の組み合わせにのみ定められていた残留農薬基準が、農畜水産物や加工食品など全ての食品と全ての農薬成分（平成23年10月末現在で約830成分）の組み合わせに設定された。この法改正（いわゆるポジティブリスト制度）に伴い、農業生産現場では、LC-MS/MSやGC-MSなどを整備し、残留農薬の自主検査を展開してきたが、予期せぬ農薬の使用実態や隣接農場からのドリフトなど、従来のターゲット分析では見落としてしまうことが懸念され、より多くの食品とより多くの農薬成分を分析できる網羅的検査システムの構築が望まれるようになった。

そこで、食品の安全性評価技術として、超臨界流体技術とオミクス解析を残留農薬検査に融合的に取り入れることで、網羅的かつ迅速な分析を可能にし、検査の有効性を高めることを目的として、抽出・分離・分解など幅広い応用範囲を持つ超臨界流体技術や、ノンターゲット測定を得意とする飛行時間型精密質量計を活かした残留農薬検査システムの構築を試みた。

GC-MSによる疎水性農薬成分測定のための抽出法として、操作が簡便で、選択性が高く、溶媒使用量の少ない超臨界流体抽出を採用し、抽出効率を上げるために脱水剤（平成17年2月特許取得）を開発することで、高い回収率の抽出技術を完成させた。また、飛行時間型精密質量計を用いた親水性農薬成分のノンターゲット測定では、分析後の測定データからいつでも農薬成分を検索できるライブラリ検索ソフトを平成20年に完成させた。

これらの研究の結果、400農薬成分を2時間で測定できるシステムを構築することができ、年間6,000検体の残留農薬検査を可能にした。

本シンポジウムでは、上記の成果を報告すると共に、これから開発を目指すオミクス解析技術による農薬代謝物検索技術について議論を深めたい。

Pesticide residues, Supercritical fluid extraction, Profiling

講演番号：4SY25-3
講演日時、会場：3月25日14:40～ J校舎15会場

タイトル　食品の安全性評価用バイオセンシングシステムの開発

Title　Development of the biosensing system for safety assessments of food

○今石浩正、森垣憲一、後藤達志、森大気（神戸大学・遺伝子実験セ）

○Hiromasa Imaishi, Kenichi Morigaki, Tatushi Goto, Taiki Mori (Res.Cent.Envi.Gen.)

近年、海外から輸入される食料品の増加などにつれ、輸入農産物中の残留農薬や内分泌攪乱作用を有する化合物、ダイオキシン類などのヒトへの安全性について強い懸念が持たれるようになってきた。一方、食品中にも極微量であるが、ヒト生体内中で代謝活性化を受け毒性を持つ化合物になるいわゆる“潜在的危険化学因子”などがあることも明らかになっている。

現在、これら食品の安全性評価には、ガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー（GC/MS）や、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などの各種機器分析法を用いた化合物分析や、実験動物を用いた安全性評価法などが利用されている。特に、マウス、ラットなどの小動物や、イヌ、サルなどの動物を用いた毒性試験の結果は重要であり、カビ毒、貝毒などを含む食品中の化合物や環境負荷化学物質などの安全性評価試験においてきわめて重要な知見が得られている。しかしながら、これら機器分析やモデル生物を用いた実験では、各生物個体間での薬物代謝活性化能力の差異や、マウスやラットなどの哺乳動物から得られた結果をヒトへと応用していることや、既存の食品危険因子については分析可能であるが、ヒトの生体内で生じる潜在的危険化学物質などには対応できないこと、などが問題となっている。そこで、従来のGC/MSやHPLCなどの機器分析や、モデル動物を用いた安全性評価と併用または一部置き換え可能な新たな技術が望まれている。　本研究では、これら問題の解決の為に、広く生物界に存在し、薬物代謝活性化反応の初発段階である第I層反応において最も重要な働きをするチトクロームP450（以下P450またはCYPとする）モノオキシゲナーゼに着目した。薬物動態学では、本来毒性を持たない化合物が生体内酸化反応を経て極めて高い毒性を持つ”活性中間体“とよばれる化合物へと変化する”代謝活性化反応“が知られており、P450はこの代謝活性化反応を触媒する主酵素である。一例として、食品中の焼きコゲなどに多量に含まれる本来発ガン性を持たないベンツピレンが、ヒトのP450であるCYP１A1により酸化され発ガン性をもつ化合物へと変換することが知られている。特に、ヒトには57種類のP450分子種が存在するが、最近の知見から、P450により100万種類もの化合物が代謝されると推定した報告もある。したがって、食品中に含まれる多くの潜在的危険化学物質とP450との相互作用を直接かつ網羅的に評価できる測定系は、食品中の危険因子の予測・検出に対して有効な分析法であると考えた。

そこで我々は、これらヒトP450酵素遺伝子を導入した組換え体大腸菌からヒト組換えP450酵素タンパク質を精製した後、溶存酸素濃度をモニター可能な構造を持つ微細センサーを用いることにより食品中に残留している極微量の農薬、環境負荷化学物質および潜在的危険化学物質を含む広い意味での“化合物”と、ヒトP450酵素との直接的な相互作用を高感度に検出・評価した。すなわち、現在までその毒性が明らかになっていない潜在的危険化学物質までをも含めた新たな食品の安全性評価用バイオセンシングシステムを試作した。本シンポジウムでは、これらバイオセンシングシステムの性質とその応用に関して概説する。This work was supported by the Programe for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry (BRAIN)

P450, food, biosensing

講演番号：4SY25-4
講演日時、会場：3月25日15:15～ J校舎15会場

感性ナノバイオセンサ

Kansei Nano-biosensors

○都甲　潔（九大院・シス情）
○Kiyoshi Toko (ISEE, Kyushu University)



味と匂いを測るセンサをここでは「感性ナノバイオセンサ」と呼ぶこととする．この場合の「感性」とはもちろん味覚と嗅覚に係る化学感性である．

味覚センサは，脂質と高分子を混合して作った脂質/高分子膜を味物質の受容部分としている．脂質分子はその自己組織化能でもって，親水基を水相側に，疎水鎖を膜内部に向ける配置をとる．味覚センサは，５基本味（酸味，甘味，うま味，苦味，塩味）を数値化することができる．味覚の世界に初めて「味のものさし」が提供されたのである．

図に，インテリジェントセンサーテクノロジー社から販売されている味覚センサ（味認識装置TS-5000Z）を示す．日本発のこの技術は，現在，全世界の食品メーカー，医薬品メーカー，公設センター等において味や品質の保証，新しい味や望む味の創造等に利活用されている．

視覚における色の立体模型に倣い，匂いの質について同様な模型を作ることも可能になりつつある．この目的のため，単分子膜で修飾された，つまり自己組織化単分子膜（SAM）を形成した金属表面と化学物質との相互作用を電気化学的測定により検出することを可能とするマルチチャネル電極を作製した．その結果，匂いを可視化した匂いの地図を得ることができた．

また，味覚センサを応用した形で農薬検知センサの開発もなされている．原理は市販農薬に含まれる界面活性剤を検出するというもので，その結果，本手法は農産物（特に葉物）の残留農薬の簡易迅速なスクリーニングを可能とする．現在10 ppbの高感度検出に成功し，ポータブルタイプの農薬センサの開発も同時に試みられている．

さらに食中毒細菌やウイルスを早期に検出するセンサの開発も行われ，既に衛生指標細菌としての大腸菌や大腸菌群については１日営業時間での検出が可能となっている．測定原理は表面プラズモン共鳴（SPR)法に抗原抗体反応を組み合わせたもので，モノクローナル抗体についても市販抗体より感度の高い抗体を得ることに成功している．

以上，種々の分野を融合したセンサ技術の長足の進歩で，味の計測については既に実用化し世の中に浸透しつつあり，続いて匂いの計測，そして食品・農産物の安全を確保する技術も実用レベルに達しつつある．

参考図書　１）都甲 潔，飯山 悟：トコトン追究 食品・料理・味覚の科学（講談社，2011），
２）都甲 潔，感性の起源（中央公論新社，2004）．

Taste sensor, Electronic nose, Agricultural chemicals

講演番号：4SY25-5
講演日時、会場：3月25日15:50～ J校舎15会場

プロテオーム解析による食品の機能性評価

Proteomic Approach to The Actions of Various Food Factors

○榊原 陽一（宮崎大農・応生科）
○Yoichi Sakakibara (Univ. of Miyazaki)

【目的】近年、食品に含まれる機能性成分が注目されており、様々な試験法により食品の機能性が評価されている。我々は、プロテオーム解析を用いた食品機能性評価法の確立を目的に、はじめに手軽にできる蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法の確立を行った。次いでこの方法を発展し、ブランド豚肉評価技術や、食品成分の抗酸化ストレス活性を評価するため酸化傷害タンパク質のプロテオーム解析技術を検討した。さらに、より多くの食品成分の機能性をまとめて解析することを目的に、プロテオームデータをもとにクラスター解析による、食品機能性成分の系統的分類を試みた。

【方法】蛍光ディファレンシャル解析は、蛍光色素として同仁化学研究所の IC3-OSu（ex=550nm, em=570nm）および IC5-OSu（ex=640nm, em=660nm）の２種類のインドシアニン化合物を用いた。これらの蛍光色素はスクシンイミド活性エステルを持ち、タンパク質中のリジン残基の側鎖アミノ基を標識する。これらの波長の異なる２つの蛍光色素を用いて、プレラベルにて２種類の試料タンパク質を蛍光標識し、その後混合した分析用試料を二次元電気泳動的にて分離し、それぞれの蛍光波長でゲルイメージを取得した。HepG2 細胞を食品成分の存在下にて培養を行い、その後細胞ライゼートを抽出してタンパク質試料とした。酸化傷害タンパク質のプロテオーム解析には、ヒドラジド型の蛍光色素を使用した。蛍光スキャナは、パーキンエルマー社の ProXPRESS 2D を使用し、イメージ解析ソフトは Progenesis を使用した。タンパク質スポットの同定は、MALDI-TOF 型質量分析装置を用いてペプチドマスフィンガープリント法により行った。また、食品成分の系統的分析は、発現解析ソフト GeneSpring GX により分析した。

【結果】蛍光色素 IC3-OSu および IC5-OSu を用いた蛍光ディファレンシャル解析は、プロテオームの変化を内部標準法により適切にかつ手軽に定量解析できることが示された。また、特別な飼料で付加価値を高めたブランド豚肉の評価にも利用できる可能性が示唆された。ヒドラジド型の蛍光色素を用いて、酸化傷害タンパク質を特異的に検出できるプロテオーム解析技術は、食品の抗酸化活性の評価に応用できることが示された。次に、ヒト肝ガン由来細胞株である HepG2 細胞に種々の約 50 種の食品成分を作用し、タンパク質発現パターンをクラスター解析により系統的に分析した。その結果、共通の基本骨格をもつ食品成分のサブクラスターが見出された。これら結果から、プロテオーム解析は食品成分の機能性に関連するバイオマーカーの探索のみでなく、食品成分の構造・機能の相関などの解析が可能であることが示唆された。

本研究は科学技術振興機構（JST）の支援による宮崎県地域結集型共同研究事業および A-Step（FS ステージ探索タイプ）により推進された。

Proteomics, Food Factor, Anti-oxidative Activity

講演番号：4SY25-6
講演日時、会場：3月25日16:25～ J校舎15会場

食の機能 / 安全性における酸化ストレス制御機能の重要性
Importance of Reguration of Oxidative Stress in Food Functionality/Safety Research

○大澤俊彦、加藤陽二[1]（愛知学院大、兵庫県大[1]
○Toshihiko Osawa, Yoji Kato

食品の加工・保存の過程で起きる酸化的劣化により生じる過酸化脂質やタンパク質酸化修飾物の摂取は、食リスクの大きな原因である。我々は、今までに、過剰な活性酸素・フリーラジカルが脂質やタンパク質、核酸などの生体構成成分と反応して酸化修飾物を生成することを明らかにしてきた。また、食品を含む環境中の重金属やヒ素、二酸化チタンやアルミニウム塩、大気汚染浮遊粒子、また、最近では、化粧品に多く用いられ始めたカーボンナノチューブやタバコの煙中の超微細炭素粒子などは、生体に対して過剰な酸化ストレスを生じることが注目されてきている。われわれは、食の機能性/安全性の評価に応用できる新規な酸化ストレスバイオマーカーの化学的同定、LC/MS/MS による微量定量法の確立、さらには、モノクローナル抗体の作製を進めてきた。なかでも、最近特に重点的に研究中の「過剰な炎症反応由来の酸化ストレスバイオマーカー」を中心に紹介し、特に、尿や血液、唾液など、非侵襲的に得られる生体試料を対象にした酸化ストレス評価法のヒト臨床系への応用の研究動向を概説し、「抗体チップ」や「イムノクロマト」を用いた簡便な酸化ストレスバイオマーカー評価系を確立研究の現状と将来性を紹介する。

また、酸化ストレス制御食品の開発も進め、重要なゴマリグナン代謝物であるセサミノールカテコールやクルクミン代謝物であるテトラヒドロクルクミン、アントシアニン代謝物など、生体内で機能性発現が期待される代謝物を単離・精製し、高分解能 NMR や MS などの機器分析法を駆使して抗酸化性食品因子の作用機構の解明、さらには、ヒト臨床系の応用できる酸化ストレスバイオマーカー評価系を用いた機能性食品因子を用いて、健康危害因子低減化の可能性を紹介する。

Oxidative stress, food functionality, food safety

講演番号：4SY26-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ J校舎16会場

食品の機能性に時間生物学的視点が必要か？

Chronobiological insight into nutritional and food functionality is required ?

下位　香代子（静岡県大院生活健康）
Kayoko Shimoi (Grad Sch Nutri Environ, Univ Shizuoka)

食品の機能として、がん、糖尿病、肥満、血管関連疾患など生活習慣病のリスクを軽減する働きが考えられるようになって久しく、種々の食品の中からそのような予防的機能を有する食品因子が数多く見いだされ、作用機構について多くの研究がなされてきた。さらに、各個人により遺伝的な背景やライフスタイルが違うことから「個人間の変動」を意識した研究の取り組みがなされてきた。しかし、最近、血圧や体温、ホルモン分泌、薬物代謝、免疫などの生理機能に概日リズムがあり、体内時計により制御されていることが分子レベルで明らかになりつつある。また、疾病の発症も、例えば、虚血性心疾患は早朝から午前中に発症しやすく、日内リズムがある。食品の機能性がより効果的であるためには、「個体内における生理機能の変動」に着目して、食品の機能性を時間生物学的視点から考えてみることが必要ではないかと思われる。

一方、経済のグローバル化に伴い、現代社会は 24 時間型社会となり、生活が夜型化し、睡眠時間が短縮している。また、夜勤・交代勤務で働く人の割合も増加している。このような社会背景をもとに、睡眠障害、うつ病、メタボリック症候群などの罹患率が増加していると言われている。食べる時刻によって肥満になる可能性があることが時計遺伝子の発現解析から明らかにされている。さらに、夜が明るい地域であるほど、男性では前立腺がんが、女性では乳がんが増えることが報告されている。健康を維持するための食品の機能性を「体内時計」の視点から考えることが必要な時代となっているのではないかと思われる。

以上のような理由から、本シンポジウムを企画した次第であるが、「食品の機能性に時間生物学的視点が必要か？」という問への答えを見い出し、本シンポジウムが新たな研究の発展へとつながることを期待し、イントロダクションをつとめたい。

functional food, circadian rhythm, chronobiology

講演番号：4SY26-2
講演日時、会場：3月25日13:45～ J校舎16会場

マウス体内時計と食・栄養の相互作用

Interaction between circadian clock and food/nutrition in mice

○柴田重信（早稲田大・理工）
○Shigenobu Shibata(Waseda University)

我々の体には、約 24.5 時間周期のリズムを刻む概日リズム（サーカディアンリズム）と呼ばれる体内時計が備わっている。体内時計は昼間を活動的に、夜間を安静的にさせる。体内時計を司るのが時計遺伝子であり、1997 年の Clock 遺伝子の発見以来十数種が同定され、体内時計の分子機構が解明されてきた。

（１）脳の中の視交差上核に主時計があり、大脳皮質や海馬などの脳部位に脳時計があり、心臓・肝臓・腸・肺・骨格筋などに末梢時計があり、肝臓の時計はエネルギー代謝に、腸の時計は栄養の吸収などに関わる。主時計が指揮者で、脳時計や末梢時計がそれぞれの楽器であり、全体として時計のハーモニーを形成している。しかし調和が崩れると、時差ボケのような症状になり、種々の疾病のリスクになり得る。

（２）一日の周期が 24.5 時間の体内時計は、0.5 時間ずつ後ろに遅れていくが、朝の光が体内時計を一時的に 30 分程度進めるので、24 時間に合わせること（リセットと呼ぶ）ができる。最近の研究では規則正しい食事も体内時計をリセットすることがわかってきた。このようなリセットを給餌性リセット機構と呼び、主時計が衰えた状態でも発揮することから、光リセットとは異なったリセット機構をおこなう「腹時計」である可能性も指摘されている。リセット効果がある食餌量・食事内容などの詳細を明らかにする必要がある。人に近い食餌パターンでのリセット効果を確かめ、炭水化物・タンパク質・脂質の役割についても検討した。

（３）薬を飲むときに、朝 2 錠で夕方 1 錠というように、必ずしも朝、昼、夕に同じ量の薬を飲むとは限らないは、主効果を最大にし、副作用を最少にするという「時間薬理学」という考えに基づく。同じ食餌量を 1 食にしたり、朝食と夕食の比を変えた 2 食にすると、エネルギー代謝が変わり「夜食は太る」という現象が現れる。このように栄養素を取る時刻により、栄養の効果が異なってくることを明らかにする学問を「時間栄養学」と呼ぶようになった。つまり朝食と夕食では栄養素の働きが異なる可能性が考えられ、朝食や夕食に良い食餌内容を提案する必要がある。また、食物の嗜好性と体内時計の関係を見いだし、夜食シンドロームの成因要因を調べた。

（４）インビボ、インビトロのマウスや細胞での体内時計スクリーニング系を有効利用し、体内時計の位相や周期に影響を与える食品成分の検索を行っている。

（５）交代制勤務や、時計遺伝子に変異があると、食生活リズムが乱れ、結果として肥満・糖尿病になりやすい事が分かってきた。また交代制勤務の人は心疾患、乳がんや前立腺癌になりやすいこともわかってきた。このようなリズムの乱れを補正する食事や機能性食品を開発する必要がある。

Circadian, chronobiology, clock gene

講演番号：4SY26-3
講演日時、会場：3月25日14:20～ J校舎16会場

時間薬理学：薬と食事のタイミング

Chronopharmacology：the timing of drug and food intake

○大戸　茂弘、小柳　悟、松永　直哉（九大院薬薬剤学）

○Shigehiro Ohdo, Satoru Koyanagi, Naoya Matsunaga (Pharmaceutics, Grad Pharm Sci, Kyushu Univ)

生体には体内時計が存在し、その本体は視神経が交差する視交叉上核（SCN）に位置し、時計遺伝子により制御されている。一方で、医薬品適正使用の向上を目指し、投薬時刻により薬の効果が大きく異なることがわかってきた（時間薬理学：chronopharmacology）。また、医薬品の添付文書および治験計画書などに服薬時刻が明示され、時間を考慮した製剤、すなわち時間制御型 drug delivery system （chrono-DDS）や時刻により処方内容を変更した製剤も臨床応用されるに至っている（時間薬剤学）。しかし、時間治療のさらなる展開を図るには、薬物活性の日周リズムの成因を体内時計の分子機構の側面より解明しなければならない。このような背景から以下の点を明らかにした。

(1) 薬物の作用点となる標的分子、薬物を輸送するトランスポーターおよび薬物代謝酵素に日周リズムが存在すること、それらの分子の転写制御に体内時計の分子機構が関与していることを明らかにした。一方、薬物を薬理活性発現部位に選択的に送達することを標的指向化ターゲティングという。受容体や酵素などが標的分子となるが、癌細胞では、トランスフェリンなどの受容体が過剰発現しており、癌細胞へ選択的に薬物を送達できる分子として注目されている。この標的分子には日周リズムが存在するため、そのリズムを考慮して抗癌剤を効率よく細胞内に送達することができる。(Cancer Res. 2003, 2004,2005, 2010,2011)。

(2) 癌や肝炎の治療に幅広く使用されているインターフェロン(IFN)は、うつ病や自殺を引き起こすことから厚労省より警告がなされていた。IFN を反復投与することにより、SCN の時計遺伝子の日周リズムが変容することを明らかにし、それを克服するための至適投薬設計を構築することに成功した(Nature Med. 2001, JBC 2010)。従来、薬物濃度を持続的に維持する投与方法が主流であったが、投薬時刻をも考慮することで、生体の恒常性を破綻させることなく治療できることが示唆された。

(3) SCN の時計遺伝子の発現リズムが薬の投薬時刻に依存して変化すること(JBC 2005)、また肝臓の末梢時計遺伝子のリズムが交感神経系により制御されていること（Proc Natl Acad Sci USA, 2003)、さらに摂食条件の繰り返し操作により、薬物活性日周リズムの位相（ピークを示す時間）を制御することに成功した。一般に、生体リズムは、生活パターン、治療状況、疾患の症状など様々な要因により影響される。例えば、栄養液の投与方法によりコーチゾールの日周リズムは大きく異なる。通常の食事リズムにあわせて栄養液を昼間投与した場合、コーチゾールは朝最高値、夜最低値を示す。一方、栄養液を夜間投与あるいは一日中連続投与した場合には、コーチゾールの日周リズムは変容する。また生体リズムの変容が種々の疾患発症リスクを高めることも知られている。以上のことから、栄養の与え方により薬物活性や疾患発症リズムを制御することも可能である。

以上の研究を通して、生体リズムマーカーのモニタリング、薬物誘発リズム障害の防止および生体リズムの操作を基盤にした新規時間薬物送達方法の構築が効率よく行われることが期待される。薬物療法の最終ゴールが治療の個別化であるとすれば、栄養の与え方も考慮して個々の生体リズムにマッチした薬物送達方法を構築することが必要不可欠といえよう。本講演では、これまで蓄積された時間薬理学の基礎および臨床の研究成果について紹介する。

Chronopharmacology, Drug, Food

講演番号：4SY26-4
講演日時、会場：3月25日14:55～ J校舎16会場

食を介した生体リズムの積極的な制御を目指して

Nutritional regulation of the circadian clock

○大石 勝隆（(独）産総研・バイオメディカル・生物時計、東大・新領域・メディカルゲノム）
○Katsutaka Oishi (AIST)

地球上のほとんど全ての生物には、地球の自転周期に一致した約24時間周期のリズムを刻む体内時計が存在する。哺乳類の体内時計中枢は、脳内視床下部の視交叉上核（SCN）に存在し、睡眠・覚醒や、体温、血圧、糖・脂質代謝、内分泌、免疫機能などの様々な生理機能のサーカディアンリズム（概日リズム）を制御している。体内時計は、脳内視床下部のみならず、心臓や肝臓、腎臓や皮膚などのほとんど全ての末梢臓器にも存在しており、SCNの中枢時計に対して、末梢時計と呼ばれている。近年の時計遺伝子の発見により、生理機能の概日制御メカニズムが分子レベルで明らかとなってきた。

一方、社会の24時間化に伴う生活リズムの乱れは、睡眠障害やうつ病、神経症などの精神疾患の原因となるばかりでなく、肥満や糖尿病、高血圧、動脈硬化などの生活習慣病の原因となることが明らかとなってきた。中枢時計が光による制御を受ける一方で、末梢時計においては、食餌が強力な同調因子となっていることが知られている。我々は、核内受容体を介した脂肪酸代謝の概日リズムが時計分子によって直接的に制御されている一方で、個体の代謝状態が体内時計に作用する可能性について研究を行ってきた。一連の研究結果から、哺乳類の体内時計は、食餌のタイミングのみならず、食餌の内容によっても大きく影響を受ける可能性が示された。本講演では、体内時計の調節因子としての食の可能性について紹介したい。

体内時計によって支配されている生体リズムの積極的な制御法を開発するためには、生体リズムの乱れたモデル動物の存在が求められる。現在は、時計遺伝子の欠損マウスなどを用いた体内時計の研究が主流であるが、睡眠障害などの乱れた生体リズムを改善する物質の探索においては、野生型の遺伝的背景を持つリズム障害モデル動物が有用であると考えた。最近になって我々は、慢性的な心理ストレス負荷による睡眠障害モデルマウスの開発に成功した（特願2010-225589)。本モデルマウスは、遺伝的に野生型であり、脳波測定の結果からも、睡眠覚醒リズムの消失や、深睡眠の減少、睡眠覚醒の断片化が認められる。行動リズムの解析からは、休息時間帯（明期）前半の過活動と、活動時間帯（暗期）の活動量の減少が認められる。さらに、慢性的なストレス負荷による馴化や衰弱が認められないため、長期間にわたる実験も可能である。本モデルマウスを用いることにより、睡眠障害のバイオマーカー開発や、乱れた生体リズムや睡眠障害、慢性疲労などを改善する食品成分の探索が可能であるものと期待される。

circadian rhythm, nutrition, sleep disorder

講演番号：4SY26-5
講演日時、会場：3月25日15:30～ J校舎16会場

機能性食品成分と生体イベントのクロノコミュニケーション

Chrono-communication between physiological events and functional food factors

○榊原 啓之[1,2]、青島良輝[2]、下位 香代子[1,2]（[1]静岡県大・環境研、[2]静岡県大・院・生活健康）
○Hiroyuki Sakakibara[1,2], Yoshiki Aoshima[2], Kayoko Shimoi[1,2]（[1]Institute Environ. Sci., University of Shizuoka, [2]Grad. Sch. Nutr. Environ. Sci., University of Shizuoka）

我々の身体内で展開されている多くのイベントは、一日の中で活性が高い時間帯と低い時間帯が約24時間周期で繰り返されている（概日リズム）。例えば、一般的に体温や血圧は夕刻に高い。血中因子では、コルチゾールやテストステロンは早朝、コレステロールやカテコールアミン類は日中、好中球やリンパ球は夜中、成長ホルモンは真夜中に最大値を示す。内因性の抗酸化システムであるスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）やカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）の活性は、何れも睡眠期に高値を示す。また、睡眠期には組織の修復能力が高まっている。この様に、様々な生体イベントが一日の中でも異なっていることを、機能性食品成分の評価を動物を用いて実施する時にも考慮すべきである。

これまでに報告されている大部分のマウスやラット等のげっ歯類を用いた機能性食品研究は、成分の投与や機能性の評価が明期に実施されている。明期は夜行性のげっ歯類にとって、睡眠期にあたる。一方、我々ヒトは、活動期に機能性食品成分（あるいは機能性成分を含む食品）を摂取している。以上の背景より、明期に実施した動物試験により得られた結果をヒトに外挿する場合、その解釈には注意が必要な場合があるのではないだろうか。我々は、近年、機能性食品成分と体内イベントの相互作用の時間的な違い（クロノコミュニケーション）について研究をおこなっている。本講演では、我々が得た動物試験の結果を中心に、以下のポイントについて紹介する。

1. 暗期（活動期）にマウスの生体リズムに影響を与えない実験環境について
2. フラボノイド類の体内への吸収量は摂取する時間帯によって異なるのか

Chrono-communications, Circadian rhythm, Functional food factors

講演番号：4SY26-6
講演日時、会場：3月25日16:00～ J校舎16会場

時計遺伝子を調節する食品因子

Regulation of circadian clock gene expressions by food components

○小堀 真珠子、大池 秀明（食総研）
○Masuko Kobori, Hideaki Oike (NARO, FRI)

ヒトを含む多くの生物は、1日周期の体内時計である“サーカディアンリズム”を有している。このリズムは、時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群によって生み出され、そのアウトプットとして、睡眠覚醒、ホルモン分泌、体温、エネルギー代謝などの生理機能が約24時間周期で制御されている。体内時計の乱れはホルモンバランスを乱し、エネルギー代謝効率を低下させること等から、肥満や高血圧を始めとする生活習慣病のリスクを上昇させると考えられる。また最近の研究により、全身のほとんどの体内時計（末梢時計）は、明暗周期を基準に時刻合わせを行う中枢時計とは異なり、食事情報により時刻合わせを行うことが明らかになってきた。つまり、食事時刻や食事内容といった食生活を介した生活習慣病予防に、体内時計が重要な役割を果たすと考えられる。

このような背景から、私達は体内時計を調節する食品成分に関する研究を行ってきた。シンポジウムでは、これまでに見出した、以下の知見について紹介する。

・高食塩食の摂取による末梢体内時計の前進
マウスに4%高食塩食を2-4週間自由摂取させることにより、肝臓、腎臓、肺など末梢組織の体内時計が約3時間前進する。

・コーヒーの飲用によるマウスの自発活動リズム周期の伸長
マウスに市販のインスタントコーヒー、あるいは相当する濃度（0.04%）のカフェイン溶液を1週間自由摂取させることにより、自発活動周期が伸長する。これは、中枢の体内時計が伸長した結果であると考えられた。

・アミノ酸と糖の混合栄養液による肝臓体内時計の時刻合わせ
マウスに栄養液を腹腔注射し、マイクロアレイ（ジェノパール®）により肝臓の代謝関連遺伝子の発現変化を解析したところ、すべての必須アミノ酸を含むアミノ酸と糖の混合栄養液により、時計遺伝子であるPer2、Dec1の発現量が一過的に上昇することを見出した。これは、肝臓の体内時計が単独の栄養素ではなく、栄養素の組み合わせにより時刻調節されることを示している。

これらの研究成果が、生活習慣病の予防に有効な食事や食品開発、並びに規則正しい食生活の見直しにつながることを目指している。

circadian rhythm, amino acids, high-salt diet

講演番号：4SY27-1
講演日時、会場：3月25日13:30～ J校舎35会場

解糖系代謝物によるTORC2活性化機構～酵母を用いる糖尿病研究の可能性～

Activation of TORC2 by a glycolytic metabolite: study of diabetes using the yeast system

野村 亘、○井上 善晴（京大院・農・応生科）
Wataru Nomura, ○Yoshiharu Inoue (Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

糖代謝は細胞の成長や増殖を担保するためのエネルギー生産において、極めて重要な役割をもつ。しかしながら、余剰の糖は生体内メイラード反応を引き起こすなど一種の代謝ストレスの要因であり、糖尿病とその合併症の発症を引き起こすことからも、糖のホメオスタシスは厳密に制御される必要がある。解糖系から生成する代謝物であるメチルグリオキサール（MG）は、糖尿病との関連が古くから指摘されている。しかしながら、血中MGレベルの上昇が糖尿病の原因なのか、あるいは結果なのかについての明確な答えは、現段階では得られていない。われわれは出芽酵母をモデル生物として、MGが細胞機能に及ぼす影響について解析を進めている[1)]。最近われわれは、MGが酵母のグルコーストランスポーター（Hxt）のHECT型ユビキチンリガーゼRsp5依存的エンドサイトーシスを誘導すること、ならびにHxtのグルコース取り込み活性を阻害することを見いだした[2)]。さらに、酵母の全てのグルコーストランスポーター（*HXT1*～*HXT17*）を遺伝的に欠失させた変異株で哺乳類のGLUT1ならびにGLUT4を発現させた組換え体を用いた解析から、MGはGLUT1ならびにGLUT4を阻害することを明らかにした[2)]。これらのことは、MGはグルコースの取り込みを抑制することで、高血糖状態の持続に関与している可能性を示唆している。

一方、われわれはMGがTOR（target of rapamycin）複合体2（TORC2）を活性化することを発見した。すなわち、MGは酵母ホスホリパーゼCであるPlc1とTORC2依存的にPkc1（酵母Cキナーゼ）のThr^{1125}ならびにSer^{1143}を介して、Mpk1 MAPキナーゼカスケードを活性化することを見いだした。これまでTORC2の活性調節因子についてはほとんど分かっていなかったが、今回初めてMGがTORC2の活性化因子として機能していることを明らかにすることができた。TORC2は酵母から哺乳類に至る真核生物において高度に保存されており、哺乳類TORC2（mTORC2）は、インスリンシグナル伝達系においてAktやPKCαの活性化に必要である。しかしながら、mTORC2の活性制御機構も酵母同様ほとんど分かっていない。われわれは、前駆脂肪細胞である3T3-L1細胞を用いた検討から、MGはmTORC2が標的とするAkt-Ser^{473}、ならびにPKCα-Ser^{657}のリン酸化を促進し、それはPLC阻害剤により抑制されることを明らかにした。以上のことは、MGがTORC2の活性化因子として機能することを示すとともに、その活性化機構は種を超えて保存されていることを意味している。

インスリンシグナル伝達系は血糖値の上昇に伴う細胞応答を引き起こすとともに、シグナル伝達を遮断する機構も同時に活性化させる。本シンポジウムでは、MGのインスリンシグナル経路への関与とインスリン抵抗性の可能性についても合わせて議論したい。

(1) Inoue, Y., Maeta, K. and Nomura, W. (2011) *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 278-284
(2) Yoshida, A., Wei, D., Nomura, W., Izawa, S. and Inoue, Y. *J. Biol. Chem.* (in press)

TORC2, methylglyoxal, insulin resistance

講演番号：4SY27-2
講演日時、会場：3月25日14:05～ J校舎35会場

タイトル：イソプレノイドによるエネルギー代謝調節機構

Title：Regulatory Mechanisms for Energy Metabolism by Isoprenoids

○後藤 剛[1,2]、高橋 信之[1,2]、河田 照雄[1,2]（[1]京大院・農、[2]京大・生理化学ユニット）

○Tsuyoshi Goto, Nobuyuki Takahashi, Teruo Kawada ([1]Graduate School of Agriculture, [2]Research Unit for Physiological Chemistry, Kyoto University)

イソプレノイド関連化合物は自然界に広く存在し、現在までに30,000種以上の物質が同定されている。イソプレノイド関連化合物は生体膜構成成分や光合成色素、植物の防御物質などとして機能しており、多彩な生理作用を有することが知られている。さらに、いくつかのイソプレノイド関連物質は核内受容体型転写因子の活性制御因子として機能することも示されている。核内受容体型転写因子はリガンドによって活性化される一連の転写因子群であり、生体のエネルギー代謝調節において重要な役割を担っている。本講演では、核内受容体型転写因子の活性調節を介した、外因性・内因性イソプレノイドによるエネルギー代謝調節機構について述べる。

種々の核内受容体型転写因子の中で、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして肥満に伴う代謝異常症の発症と深く関連することが知られる、peroxisome proliferators-activated receptor γ(PPARγ)に着目した。PPARγの転写活性に対して、各種イソプレノイド関連化合物が与える影響についてレポーターアッセイによって評価した。PPARγ活性に変化を来したイソプレノイドについて、培養細胞や実験動物などを用いてその機能を評価した。

レポーターアッセイにより、sesquiterpeneの１種であるファルネソール(FOH)にPPARγ活性化能を見出した。FOHは培養脂肪細胞においてもPPARγを活性化させることが示唆され、FOHの肥満モデル動物への投与は肥満に伴う糖・脂質代謝異常症の改善作用を示したが、個体レベルでは脂肪組織におけるPPARγの活性化を誘導しないことが示唆された。FOH投与時の代謝異常改善作用機構について更に検討したところ、FOHは他の核内受容体型転写因子であるPPARα、farnesoid X receptor (FXR) の活性化を介して代謝異常改善作用を発揮することが示唆された。また、FOHのPPARγ活性化作用について更に検討を進めたところ、コレステロール合成の中間体で、FOHの二リン酸体であるファルネシル二リン酸(FPP)にFOHよりも強いPPARγ活性化能が認められた。薬理的手法を用いて脂肪細胞内のFPPレベルを変動させたところ、細胞内FPPレベルの増減に伴い、脂肪細胞におけるPPARγ標的遺伝子の発現が増減することが示唆された。

以上の結果より、外因性・内因性イソプレノイドは核内受容体型転写因子の活性調節を介して生体内のエネルギー代謝を制御しうることが示唆された。

isoprenoid; nuclear receptors; metabolic disorders

講演番号：4SY27-3
講演日時、会場：3月25日14:40～ J校舎35会場

胆汁酸代謝調節によるメタボリックシンドロームへのアプローチ

Bile acids signaling pathway for the control of metabolism-Mechanism and its application-

○渡辺　光博（慶應大　医　腎内代　分子代謝システム医学）
○Mitsuhiro WATANABE (School of Medicine, Keio University)

胆汁酸は疎水性作用と親水性作用を有する両親性物質であり、食事性の脂質が高濃度に存在する腸管において、腸管壁に脂質が吸着するのを防ぎ、かつ、生体内に効率よく脂質を取り込む際に重要な役割を担っている。これらのメカニズムにより胆汁酸は、食事により摂取されたコレステロール、脂質をミセル化し消化・吸収に重要な分子として良く知られている。しかし、最近になり胆汁酸はこれらの働き以外に様々な重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。

胆汁酸の血中濃度は食間では約 5μM 程度であるが、食事後、肝臓や門脈中だけではなく全身血中で約 15μM にまで上昇する。さらに、胆汁酸の受容体である FXR や TGR5 は、肝臓や小腸だけでなく様々な組織で発現が認められ、これらのことは胆汁酸が単に消化のために存在するのではなく、食事とリンクする全身のシグナル伝達分子として重要であることを示唆している。

胆汁酸の代謝に対する影響を、分子生物学的手法、肥満・糖尿病モデルマウスを用いて検討したところ、胆汁酸、FXR アゴニストが、肝臓 TG 含量、肝臓からの VLDL 分泌を抑制し、その結果、血清 TG を低下させることが明らかとなった。本研究により、胆汁酸または FXR をターゲットにした抗 TG 血症、脂肪肝に対する新規治療薬の可能性が示唆された。さらに、脂肪蓄積抑制に伴う体重増加抑制、糖代謝改善が確認され、胆汁酸とエネルギー代謝の関わりを明らかにした。我々は細胞内で T4 を T3 に変換する酵素である D2 に着目し、胆汁酸が細胞膜中の GPCR である TGR5 を介し、胆汁酸-D2 パスウェイを明らかにした。本研究により、新しい作用メカニズムを持ち、副作用の少ない、エネルギー消費亢進による肥満・糖尿病治療へと発展する可能性が示唆された。

我々が明らかにしたメカニズムの臨床応用として、人にコール酸を投与することはコレステロールの増加を引き起こす等の問題があり、残念ながらできない。しかし、このような新しい胆汁酸の機能を臨床に還元する知見が、胆汁酸吸着レジンを用いた検討により、我々のデーターも含め複数のグループより報告されている。高脂血症治療薬として使用されている胆汁酸吸着レジンが肝臓での胆汁酸合成を亢進させことに着目し、胆汁酸を投与した時と同様に胆汁酸吸着レジン投与群ではエネルギー代謝が亢進し、肥満が改善され、血糖、インスリンが低下し、糖尿病の改善が観察されることを明らかにした。胆汁酸吸着レジンは、2008 年 1 月に FDA より糖尿病治療の適応が追加された。胆汁酸吸着レジンは高コレステロール血症治療薬であり、コレステロールを低下させ、さらに最近の臨床試験により血糖改善の可能性が明らかにされ、両者の低下により、心血管疾患に有効な薬剤と考えられる。本薬剤は、重篤な副作用が少ない薬剤であり、肥満、糖尿病治療薬として将来の期待が持てるものと考えている。

bile acid, metabolic syndrome, bile acid binding resine

講演番号：4SY27-4
講演日時、会場：3月25日15:15～ J校舎35会場

メタボリックシグナルとしてのステロール

Sterols as metabolic signals

○佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Ryuichiro Sato(Dept. of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo)

肝臓では、1日およそ1g程度のコレステロールが合成され、この量は食事から吸収する量の数倍にも及ぶ。この事実は、コレステロール合成阻害剤のスタチンが優れたコレステロール代謝改善効果を持つことを良く説明している。炭素数２のアセチルCoAを出発物質として、20数段階に及ぶ酵素反応を介して、炭素数27のコレステロールは合成され、細胞内では膜の構成成分として重要な役割を演じる。従って、細胞内の膜中のコレステロール量は厳密に調節されており、一部の膜タンパク質はコレステロールを結合して自らの立体構造を変化させる、Sterol sensing domainを膜貫通領域に持つ。Sterol sensing domainを介した制御機構は、転写因子SREBP活性化に始まり、コレステロール合成、細胞内コレステロール輸送などの調節を行っている。一方我々の体内では、複雑なステロイド骨格を完全分解することはできず、体の各所で余剰になったコレステロールはHDLに取り込まれ、肝臓へと戻ってきた後に、炭素数24の胆汁酸へと異化される。胆汁酸は、胆汁成分として小腸管腔内へと分泌された後、小腸下部で再吸収を受け、分泌胆汁酸の95％程度が肝臓へと戻る（腸肝循環）。この過程で一部の胆汁酸は糞中へと排泄され、この経路が体内で唯一のコレステロール体外排泄経路となる。胆汁酸は、小腸、肝臓において、核内受容体FXRのリガンドとして働き、種々の遺伝子応答の制御に寄与する(1)。さらに、一部の胆汁酸は全身血流にも5～15μM程度の濃度で存在し、これをリガンドとして機能するGタンパク質共役受容体TGR5が機能する。TGR5は，小腸下部のL細胞表面では小腸管腔内の胆汁酸を結合し、インクレチンGLP-1の分泌を促す。さらに、げっ歯類では褐色脂肪組織、ヒトでは骨格筋において、血中の胆汁酸を結合し、ミトコンドリア機能を促進し、熱産生、脂肪酸β酸化亢進を介してエネルギー消費上昇をもたらし、抗肥満効果を持つことになる。このような事実から、我々は胆汁酸の機能を模するTGR5リガンド活性を有した食品成分を探索するアッセイ系を構築し、胆汁酸と同程度の結合活性を有する柑橘成分Nomilinを見いだした(2)。Nomilinを含む高脂肪食をマウスに長期間投与すると、体重増加は有意に抑制され、血糖値、インスリン濃度も著しく改善された。

以上、コレステロール、胆汁酸を介した代謝調節の詳細を示し、ステロールをメタボリックシグナル分子として捉えた際に、それらの機能を調節しうる食品成分の可能性について論じる。食によるメタボリックシグナルの制御を介し、代謝改善を目指す、新たな健康科学の方向性を示す。

(1) Hirokane, H., Nakahara, M., Tachibana, S., Shimizu, M. and Sato, R. (2004) Bile acid reduces the secretion of very low density lipoprotein by repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4. ***J. Biol. Chem.*** 279, 45685-45692.

(2) Ono, E., Inoue, J., Hashidume, T., Shimizu, M., and Sato, R. (2011) Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 410, 677-681.

Cholesterol, Bile acids, TGR5

講演番号：4SY27-5
講演日時、会場：3月25日15:50～ J校舎35会場

*Lithospermum erythrorhizon*の赤色色素、シコニンの生理活性とその応用

Biological activities and utilizations of shikonins, red pigments in *Lithospermum erythrorhizon*

○**Seung-Jin Ma**（Mokpo National University, Republic of Korea）

The root of *Lithospermum erythrorhizon* has been used as a traditional folk remedy for treatment of blood circulation, injuries and burns in Korea. Especially its bright red pigments suggested to be main biological constituents in the root were used in Korean traditional liquor‘Hongju’.

Six kinds of shikonin derivatives including shikonin were isolated as red pigments from the extracts of the root and their biological activities were investigated. Stabilities of the derivatives in the liquor were also investigated because the bright red color, one of the most important characters in Hongju, is easily changed to colorless during the long term of distribution and storage.

The isolated compounds showed strong biological activities such as antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity *et al.* and shikonin showed strongest activities in the derivatives. Shikonin also showed to be most stable, brightest red color and lowest hydrophobic, which indicated the compound would be more useful materials for food industry. However, shikonin was a minor compound to be consisted in below 5% among its derivatives. So, the enzymatic method to liberate their derivatives was investigated to produce shikonin from the extracts for increasing the utilization. Enzymatic properties of commercial enzymes that are related to the hydrolysis of an acyl group in triglyceride were investigated. We found esterase originated from pig liver showed strong activity for producing shikonin from the crude extract including its derivatives.

This study also deals with our new approach with subcritical water extraction to get shikonin from the extracts.

Lithospermum erythrorhizon, shikonins, red pigments

ランチョンシンポジウム

本大会でのランチョンシンポジウムは事前チケット制で行います．あらかじめ京都女子大学 B 校舎 2 階にてランチョンシンポジウムチケットを受け取り，12:25 までに会場にお越しください．チケットは 3 月 23 日（金）〜24 日（土）の朝 8:15 より配布します．空席がある場合は，チケットがなくても入場できます．

3LS01　**JABEE** ランチョンシンポジウム「農芸化学における人材育成」

3 月 24 日（土）12:30〜13:40（J 校舎　2 階　224）
世話人：江坂宗春（広島大院生物圏科学，JABEE 対応委員会委員長），
　　佐藤隆一郎（東大農生科，日本農芸化学会理事，JABEE 対応委員），金沢和樹（神戸大院農，JABEE 対応委員）
座　長：江坂宗春（広島大院生物圏科学，JABEE 対応委員会委員長），
　　金沢和樹（神戸大院農，JABEE 対応委員），浅野行蔵（北大院農，JABEE 対応委員），
　　大島敏久（九大院農，JABEE 対応委員）

12:30　3LS01–01　**JABEE と人材育成**……°江坂宗春（広島大院生物圏科学）
12:40　3LS01–02　**バイオベンチャーを担う若者たちへ**……°金　武祚（(株)ファーマフーズ）
13:00　3LS01–03　**バイオ系人材育成とキャリアデベロップメント**……°丸　幸弘（(株)リバネス）
13:20　3LS01–04　**アグロイノベーション創出人材の養成　—農工大の取組から—**……°西河　淳（農工大）
13:40　**おわりに**……°佐藤隆一郎（東大院農生科）

講演番号：3LS01-01
講演日時、会場：3月24日12:30～ J校舎35会場

ＪＡＢＥＥと人材育成

JABEE and human resource development

○江坂宗春（広島大院生物圏科学、日本農芸化学会JABEE対応委員長）
○Muneharu Esaka (Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Unv.)

日本技術者教育認定機構、すなわちJABEE（Japan Accreditation Board for Engineering Education）は、技術者教育プログラムの 審査・認定を行う非政府団体である。JABEEは、1999年に設立されており、すでに10年以上の歳月が過ぎた。その間、2005年には、ワシントンアコードへの加盟が認められ、国際的にも認知された技術者教育認定機関になった。また、2009年に一般社団法人化され、2010年3月には、文部科学省から産業技術系専門職大学院の認証評価機関として認定された（JABEEの詳細は、http://www.jabee.org/を参照）。

JABEE修了生は，ワシントンアコード加盟国のプログラム修了生と同じ技術者教育を受けた者として認められるとともに、技術士の第一次試験が免除され、登録を行えば、すぐに技術士補となれる。実務経験（通常4年間）を経た後、第二次試験に合格すれば、正式に技術士になれる。

これまでに、全体では、435プログラムがJABEE認定を受け、認定プログラムからの修了生の累計は約15万人になる。認定・審査分野は16分野あるが、農学系としては3分野、「農業工学関連分野」が19プログラム、「農学一般関連分野」が12プログラム、「森林および森林関連分野」が5プログラムの計36プログラムがJABEE認定を受けている。そのうち、農芸化学会が所属する「農学一般関連分野」は、農学系17 学会が加盟する農学会技術者教育推進委員会のもとに、「生物工学および生物工学関連分野」とも連携しながら、審査、普及、指導等の活動を行っている。

「農学一般関連分野」では、この３年間、新規プログラムがなく、審査は、中間審査や、継続審査、変更時審査のみである。JABEE全体でも新規プログラムは頭打ちでJABEE自体が大きな壁に突き当たっている。そのような中、JABEEの改善が諮られ、2012 年度、認定基準が改定される。

日本農芸化学会は、「農学一般関連分野」の中では一番大きな学会であるが、農芸化学領域が含まれるJABEE認定プログラムは5プログラムのみである。しかし、生物工学および生物工学関連分野でも5プログラムが認定されており、あわせて、10プログラムが認定されている。

日本農芸化学会では、JABEE対応委員会を組織し、JABEEに対応した活動を行ってきているが、これまでに、以下のようなJABEE・教育シンポジウムを全国大会時に開催している。

- 2007年度　「日本農芸化学会とJABEE」
- 2008年度　「農芸化学における魅力ある大学教育とJABEE」
- 2009年度　「農芸化学分野の大学院における技術者、研究者養成教育の改革」
- 2010年度　「農芸化学における教育改革と分野別質保証」
- 2011年度　「JABEEとキャリア教育」（東日本大震災で中止）

近年、大学における人材育成の重要性が指摘され、多くの大学で教育改革が進んでいる。　このような背景から、今回「JABEEと人材育成」と題したシンポジウムを開催することになった。

JABEE, education, human resource development

講演番号：3LS01-02
講演日時、会場：3月24日12:40～ J校舎35会場

バイオベンチャーを担う若者達へ

To the young men who bear bio venture

○金 武祚（ファーマフーズ）
○Mujo Kim (Pharmafoods)

１ドル７０円台という歴史的な円高は、輸出に頼る日本の産業にとって大きな痛手となり、経済界は厳しい状況が続くだろう。こんな時こそ、価格競争に走るのではなく、付加価値の高い製品を生み出す新産業を立ち上げることが望まれる。
ここに、オリジナリティーのある日本型バイオベンチャーの台頭が望まれる。本来バイオテクノロジーの研究は、オリジナリティーのある着想から基礎研究を経て展開される。しかし、ベンチャー企業は小規模であり、人材面、資金面で限られている中、研究開発推進において、現行の社会的、経済的な制約がある。

私たちは「たまご」に着目したユニークなバイオベンチャーを目指した。 たまごを温めると21日でヒヨコが生まれる。つまりたまごには生命の発生、個体の成長に関与する生理活性成分が詰まった「バイオのカプセル」である。これを素材として、新しいバイオビジネスを展開しようとした。
今まで私たちは、ニワトリのたまごから特異的鶏卵抗体を大量調整するシステムの確立とその実用化を行ってきた。このシステムで、抗体食品、抗体化粧品、そして抗体医薬の展開が可能をなることから、新しいニーズを掘り起こし、新しい市場空間を作るべく挑んできた。

ベンチャーを起業して東証マザーズに上場するまでのプロセスを経験した者の立場から見ると、バイオベンチャーにはいくつかの課題があると思われる。
一つ目は、バイオテクノロジーの研究では基礎研究が円滑に行える環境・施設をもつことが不可欠である。 二つ目は、人的資本も必要不可欠である。特にこの分野においては、人の数ではなく、その能力や知識などの質が問題であり、自主的に研究を行うメンバーが最も主要となる。 三つ目は、資金調達が問題となる。研究開発では、分析装置など購入一つとっても、短期的に豊富な資金が必要となる。

これらの課題を解決しつつ、その都度壁を乗り越えて企業活動を継続するには世の中に役立つという高い「志」を持つことが必要であり、長期展望に立ち、やり遂げるという「勇気」を持つことである。
ここに、誰よりも新しいことに敏感であり、そして正義感に燃える若い研究者達の活躍が大いに期待されるところである。

egg, antibody, venture

講演番号：3LS01-03
講演日時、会場：3月24日13:00～ J校舎35会場

バイオ系人材育成とキャリアデベロップメント

Career Development of Human Resources in Biological Sciences

○丸 幸弘（株式会社リバネス 代表取締役 CEO）
○Yukihiro Maru（Leave a Nest Co.,Ltd）

日本の科学・技術者の強みはゼロから知恵を生み出すところにあったはずだが、なぜいま知識製造が低迷しているのだろうか。それは“知識や知恵を生みだす人が稼ぐ”というイメージがなく、右へ倣えの教育風土が強いからであろう。海外を見ると、シンガポールでは生み出された知恵に価値がつき、正当な対価が得られる。アメリカの大学教育では、リーダーに必要な資質を徹底的に鍛え、社会で使える実力を身につけるカリキュラムが確立されている。義務教育において日本の学力は上位に位置しているが、大学・大学院になるとアメリカやアジアの人材に押され、世界で活躍し得る優秀な人材は海外へと流出してしまう。

このような状況を鑑み、株式会社リバネスでは、産業界が大学等教育機関と連携して人材育成を行っていくことが重要であると考え、理系に特化した人材育成に力を入れている。平成 14 年度には経済産業省「バイオ人材育成システム開発事業」採択を受け、「バイオコミュニケーター®育成プログラム（現サイエンスブリッジコミュニケーター®）」を開発。このプログラムは次世代育成活動を通じて即戦力人材育成を実現するモデルであることが特徴である。具体的には、インターンシップとして参加した大学生・大学院生が先端科学実験教室をプロジェクト型で運営することで，リーダーシップ・プレゼンテーション・コミュニケーション能力を育成し，社会の即戦力として活躍できる素地を形成するものである。これまでに 130 名の若手人材を輩出しており、日本のみならず世界を見据えて、アカデミアや製造業、サービス業など多様なキャリアを形成している。さらに、平成 21 年度より、経済産業省「産学人材育成パートナーシッププログラム開発・実証」の採択を受け、東京大学・東京工業大学・東京農工大学の 3 大学および、産業技術を伝える人材にニーズを持つ企業とコンソーシアムを組むことで、産業技術コミュニケーターの育成と産業界でのキャリアパス構築を行っている。

これからの世の中にイノベーションを起こすには、サイエンスの専門知識を持ちながら高いコミュニケーション能力と自ら考え行動するリーダーシップ人材の育成が重要な課題になると考え、2002 年、理系の大学生・大学院生 15 人の仲間と共に「リバネス」というベンチャー企業を興した。「博士を取ったらリバネスへ」をキャッチフレーズに、設立以来リバネスが取り組んできた博士人材の専門性を活かした人材育成とキャリアデベロップメントについても紹介したい。

Career Development、science communication、

講演番号：3LS01-04
講演日時、会場：3月24日13:20～ J校舎35会場

アグロイノベーション創出人材の養成　―農工大の取組から―

Agro-Innovation program for developing human resources

西河　淳　（農工大・アグロイノベーションセンター）
Atsushi Nishikawa (Tokyo Univ. of Agri. and Tech., Center for Agro-Innovation)

産業界ではイノベーションを創出しうる人材として博士人材を求めている。当然のことながらイノベーションの創出は、大学における基礎研究の延長線上に単純に置くことはできない。それは、たとえ学術的に優れた発見や発明があっても、それを現実世界でイノベーションとして展開するまでには、社会の動向や文化的背景の理解、決断力、支援者・理解者の確保、専門外の人的ネットワークの構築なども必須であり、実践的な力量が求められるからである。そこでこのような博士人材を育成するためには、博士課程における高度に専門的な研究活動に加え、複数専門領域を経験し、多次元的な思考プロセスと実務を実践すること、課題探求能力を養うこと、社会性・公益性を広く認識すること、豊かなコミュニケーション能力や高度なマネジメント能力を身につけることなどが必要と思われる。

東京農工大学では、文部科学省科学技術振興調整費「イノベーション創出若手研究人材養成」プログラムに採択され、アグロイノベーション高度人材養成センターを設置し、H20年度より産業界を目指す全国の国公私立大学や研究機関等の農学系博士課程学生・ポスドク（博士人材）を対象とした人材養成、就職支援に取り組んでいる。本事業では、人材養成に向けた様々なプログラムを実施しているが、なかでもグループワーク等を合宿形式で行うワークショップと、3ヶ月以上にわたる企業等でのインターンシップを二つの大きな柱としている。事業の企画・運営には、農林水産省や全国100を超える連携協力企業、国際機関等の協力を得、全国の6連合大学院農学研究科等が連携して取り組んでいる。また、大学の教職員に対してもFDセミナー等を通してキャリア支援教育の必要性や本事業への理解を得ることにより、博士人材が本取組に参加し易い環境の整備等を進めている。

実績として、これまでにワークショップには全国36大学から178人、うち農芸化学系専攻からは約60人が参加しており、その中の57名(同約20名)が様々な分野・業種の企業等においてインターンシップに取り組み、インターンシップ先にそのまま採用された事例も多数ある。さらに、これまで博士人材の採用実績がなかった企業がインターンシップの受入れを契機として新たに博士人材の採用制度を創設するなど、企業側の博士人材の積極的な活用に向けた取り組みにも影響を与え徐々に広がりつつある。

本シンポジウムでは、事業に参加した農芸化学分野の学生の事例も幾つか披露し、キャリア教育の重要性や今後の人材育成のありかたについて我々の取り組みや考えを紹介する。

http://www.tuat.ac.jp/~agroc/index.html　　連絡先：agro-inn@cc.tuat.ac.jp　042-367-55618

innovation, education, internship

ランチョンセミナー　プログラム

本大会でのランチョンセミナーは事前チケット制で行います. あらかじめ京都女子大学B校舎2階にてランチョンセミナーチケットを受け取り，12:25 までに各会場にお越しください．チケットは 3 月 23 日(金)は，朝 8:15 から，3 月 24 日(土)，25 日(日)は朝 8:30 より配布します．空席がある場合は，チケットがなくても入場できます.

3 月 23 日（金）12:30〜13:20

LS 1　株式会社島津製作所　　B18 会場（B 校舎 5F B514）

座長　　尾島 典行（株式会社島津製作所）

S10-GERMS 法と MultiNA による微生物同定法

田村 廣人，細田 晃文（名城大学 農学部）

LS 2　日本ベクトン・ディッキンソン株式会社　　B19 会場（B 校舎 4F B420）

座長　　中辻 憲夫（京都大学 物質ー細胞統合システム拠点（iCeMS）拠点長/再生医科学研究所 発生分化研究分野（幹細胞医学研究センター長））

ヒト多能性幹細胞から作製されるモデル細胞 - 神経変性疾患モデルと心筋モデル -

饗庭 一博（京都大学 物質 - 細胞統合システム拠点）

LS 3　協和発酵バイオ株式会社　　C01 会場（C 校舎 5F C501）

オルニチンの最新の機能開発研究動向

秋月 さおり（協和発酵バイオ株式会社ヘルスケア商品開発センター 機能開発グループ）

LS 4　ライフテクノロジーズジャパン株式会社　　C10 会場（C 校舎 5F C504）

微生物研究から植物研究の未来をつなぐ新技術 〜ゲノム解析 , クローニング , 表現系解析の未来形〜

（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）

LS 5　財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所　　C27 会場（C 校舎 3F C305）

農芸化学分野に大きな影響を与えるメタボローム解析手法

柴田 大輔（財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所 産業基盤研究開発部）

3 月 24 日（土）12:30〜13:20

LS 6　キッコーマン株式会社　　B18 会場（B 校舎 5F B514）

司会　　小幡 明雄（キッコーマン株式会社 研究開発本部）

バランスは「おいしさ」に繋がるか？

メタボリックプロファイリングの食品・生薬研究への応用

福崎 英一郎（大阪大学大学院 工学研究科 生命先端工学専攻）

「おいしさ」の理解に繋がる細胞・抗体の利用について

大倉 哲也（農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品機能研究領域）

LS 7　メルク株式会社　　B19 会場（B 校舎 4F B420）

タンパク質調製時の強い味方 NDSB

若松 馨（群馬大学 工学研究科）

LS 8　味の素株式会社　　**C01 会場（C 校舎 5F C501）**

司会　　鬼頭 守和（味の素株式会社 研究開発企画部）

アミノ酸と生活習慣病 - アミノ酸解析はどこまで疾病リスクを予想できるのか？ -

安東 敏彦（味の素株式会社 アミノインデックス部）

LS 9　ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社　　**C10 会場（C 校舎 5F C504）**

ロシュ 454GS FLX を利用した作物 DNA マーカーの開発　　田畑 哲之（かずさ DNA 研究所 植物ゲノム研究部）

ロシュ 454 次世代シークエンサーを用いた生物学と農学分野の論文例

宋 碩林（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 ゲノムシークエンス LCM 部）

LS 10　タカラバイオ株式会社　　**C24 会場（C 校舎 4F C404）**

座長　　向井 博之（タカラバイオ株式会社 製品開発センター長）

新規遺伝子解析技術のご紹介 - 新 PCR 酵素を使った簡単クローニングおよび遺伝子解析術 -

上森 隆司（タカラバイオ株式会社 製品開発センター）

LS 11　エッペンドルフ株式会社　　**C26 会場（C 校舎 4F C412）**

- 微生物機能探索・虎の巻 -

有用脂肪酸・アミノ酸・核酸生産，酵素機能開発に見る「微生物の探・観・拓」

小川　順（京都大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻）

LS 12　和光純薬工業株式会社　　**C27 会場（C 校舎 3F C305）**

マルチジーントランスフェクション技術の新展開

新製品 Episomal 型ベクター「pEBMulti」（動物細胞用）のご紹介

船越 拓（和光純薬工業株式会社 試薬開発部）

Episomal 型 ベクターを用いたマルチカラーイメージングの新展開

三輪 佳宏（筑波大学大学院 人間総合科学研究科）

---

3 月 25 日（日）12:30〜13:20

LS 13　株式会社資生堂　　**B18 会場（B 校舎 5F B514）**

司会　　岸本 治郎（株式会社資生堂 新成長領域研究開発センター）

食品やヒトに存在する D- アミノ酸とその機能性分子としての可能性

「D- アミノ酸研究の展開と展望 : 分布 , 機能 , 代謝 , 食品・医薬への応用へ」

吉村　徹（名古屋大学大学院 生命農学研究科）

「皮膚における遊離 D-アミノ酸の発見と , 明らかになりつつある皮膚生理機能」　　東條 洋介（株式会社資生堂）

LS 14　サントリーウエルネス株式会社　　**C01 会場（C 校舎 5F C501）**

司会　　北川 義徳（サントリーウエルネス株式会社 健康科学研究所）

インフルエンザ感染症 - その感染様態と免疫 -　　高橋　和郎（大阪府立公衆衛生研究所）

プロテクト乳酸菌と免疫機能　　井田　正幸（サントリーウエルネス株式会社 健康科学研究所）

SHIMADZU

リボソームに含まれる遺伝情報に基づく微生物の迅速・簡便同定

S10-GERMS法とMultiNAによる微生物同定法

発表日：3月23日(金) 時間：12:30～13:20 会場：B18会場（B校舎 5F B514）

名城大学 農学部：田村 廣人先生、堀田 雄大先生、細田 晃文先生

近年、種々のバイオマーカーを指標としたMALDI-TOF-MSを用いた微生物同定法が報告されている。本セミナーでは、リボソームの持つ遺伝情報（遺伝子とタンパク質）を融合した再現性と信頼性の高い種および株レベルでの迅速・簡便微生物同定法（S10-GERMS法）を紹介する（図1）。また、本法とMultiNAを用いたPCR-RFLPによる微生物同定法のそれぞれの特徴を比較紹介する（図2）。

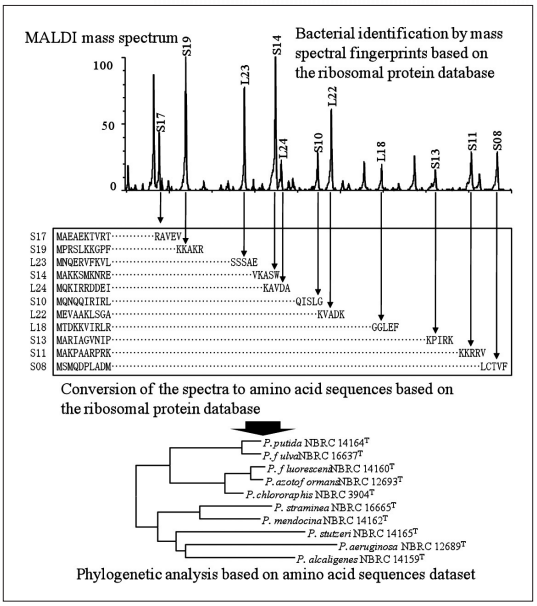


図1. S10-GERMS法による微生物同定

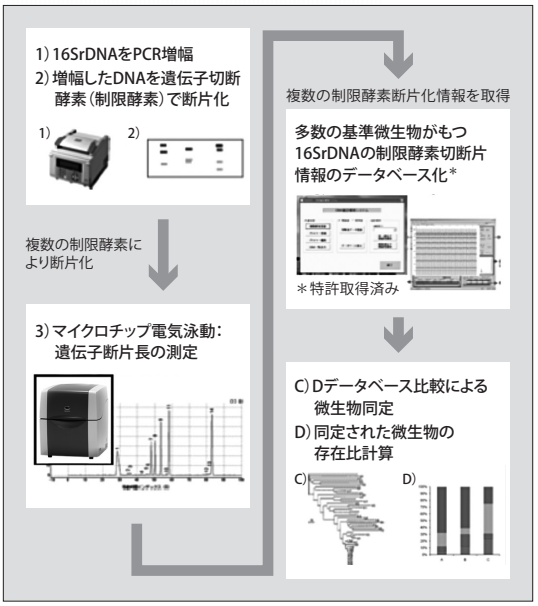


図2. PCR-RFLPによる定量的微生物同定



マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計

AXIMA Performance

日本農芸化学会2012年度大会

ランチョンセミナー2（LS 2）

日 時　3月23日(金) / 12:30 - 13:20

会 場　京都女子大学　B19会場（B校舎 4F B420）

ヒト多能性幹細胞から作製されるモデル細胞
ー神経変性疾患モデルと心筋モデルー



座 長　中辻 憲夫 先生

京都大学　物質ー細胞統合システム拠点　拠点長
再生医科学研究所　発生分化研究分野　教授

演 者　饗庭 一博 先生

京都大学　物質ー細胞統合システム拠点

BD
Helping all people live healthy lives

疾患モデル動物（主にげっ歯類）は、これまでに多くの重要な知見をもたらしてきたが、ヒトとげっ歯類という種による相違から、ヒト疾患を正確に模倣できていないなどの限界がある。また、心臓への薬の副作用が、新薬として承認された後に明らかになることもある。このことは既存の心毒性アッセイではその副作用を検出できていなかったことを示している。
ヒトES細胞やヒトiPS細胞などのヒト多能性幹細胞から得られる分化細胞は、ヒト細胞であるためヒトでの反応を模倣でき、また分化細胞が多量に供給可能なためハイスループットアッセイの構築も可能である。そのため、疾患発症機序研究及び創薬の初期研究での最適なモデル細胞として、疾患モデル細胞や心毒性アッセイへの活用が進められてきている。
本セミナーでは、我々が確立した部位特異的遺伝子導入法を用いたヒト多能性幹細胞由来の神経変性疾患モデル細胞と心筋モデル細胞について報告したい。

※整理券は12時25分を過ぎると無効になります. 午前のプログラムは12時5分に終了予定です. 整理券をお持ちの方は, セッション5分前の12時25分までにご来場ください。
12時25分までにご来場されない場合には, 整理券は無効となり, 整理券をお持ちでないセミナー参加者にご提供いたしますことをご了承ください。

共催：日本農芸化学会2012年度大会/日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

ion torrent　applied biosystems　invitrogen　gibco　molecular probes

日本農芸化学会 2012 年度大会 共催
ライフテクノロジーズ ランチョンセミナー

プログラム No. LS 4

会期 2012 年 3 月 23 日（金）12：30 ～ 13：20

場所 C10 会場（京都女子大学 C 校舎 5F C504）

微生物研究から植物研究の未来をつなぐ新技術
～ゲノム解析、クローニング、表現系解析の未来形～

微生物や植物の研究の発展は将来の私たちの生活を取り巻く環境に深くかかわりを持ちます。新たな技術はこれまで技術的な障壁で停滞していた研究に大きなブレイクスルーをもたらすことができます。本セミナーでは様々な研究領域にわたってブレイクスルーをもたらしうる、3 つの新しい技術を中心に紹介いたします。

PART 1 ゲノム研究

半導体センサーチップによる DNA シーケンサが登場したことで、ゲノム解読のスピードとコストは劇的に変わりました。わずか数万円の半導体センサーチップを利用することで、誰もが簡単に研究対象の生物種のゲノム情報を得られるようになります。ゲノム情報の活用により、モデル生物や培養細胞に頼らない生命現象の理解が急速に進むとともに、遺伝子導入や発現解析、表現系の解析まで、バイオ実験のワークフローはより簡便に、迅速なものへ変わっていきます。ベンチトップ次世代シーケンサを中心に、ゲノム研究にスピードをもたらす研究ツールをご紹介します。



Ion PGM™ システム

PART 2 藻類研究

従来の藻類研究に使用されてきたクローニングツールは十分最適化されておらず、必ずしも使いやすいものではありませんでした。また、各研究室で使用されている細胞は全く同一では無く、完全にキャラクタライズされているとは言い切れないのが現状だと思います。さらに、培地の調製は煩雑で時間がかかる、細胞の増殖速度、収量など期待に反する結果になるなどの問題がありました。
本セミナーでは、市販製品としては初の光合成微細藻類の遺伝子改変･発現システムである、モデル生物 *Synechococcus elongatus* および *Chlamydomonas reinhardtii* 用の GeneArt® Algae engineering kit をご紹介します。
本キットに含まれる完全にキャラクタライズされた細胞株、TOPO® 技術を利用した高効率クローニング・発現ベクター、GIBCO® ブランドの高品質で再現性の高い培地は、藻類研究分野の発展をさらに加速させます。



PART 3 表現系解析

観察時間の短縮化は多くの実験を効率化することができます。個々の細胞の生存率、染色体量、細胞周期などを定量的に解析するにはフローサイトメトリーがよく用いられます。フローサイトメーターは登場以来、細胞フォーカシング技術にほとんど変化がなく、解析スピードにおける潜在的なボトルネックでした。本セミナーで紹介いたします細胞フォーカシング技術はこれまで不可能だったサンプルスピードでの解析が可能となり、実験時間の大幅な短縮につながります。時間的な制約が無くなったことで実験操作を簡便化することもできるようになりました。スピーディーな細胞解析ソリューションに加え Molecular Probes® の検出手法を交えてご紹介いたします。



Attune® Acoustic Focusing Cytometer

共催：日本農芸化学会 2012 年度大会・ライフテクノロジーズジャパン株式会社

研究用にのみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。
The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.
© 2012, Life Technologies Japan Ltd. All rights reserved. Printed in Japan. LSW013-A1202IH

ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023　東京都港区芝浦 4-2-8
TEL.03（6832）9300　FAX. 03（6832）9580

大阪：〒564-0052　大阪府吹田市広芝町 10-28
TEL.06（6389）1201　FAX. 06（6389）1206

http://www.lifetechnologies.com

life technologies™



Kazusa DNA Research Institute
かずさDNA研究所

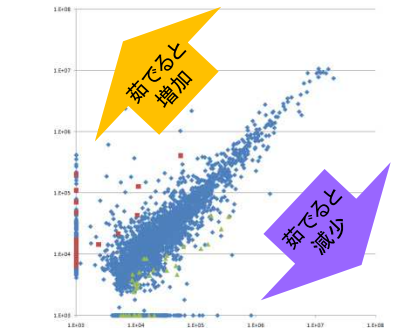
農芸化学分野に大きな影響を与えるメタボローム解析手法

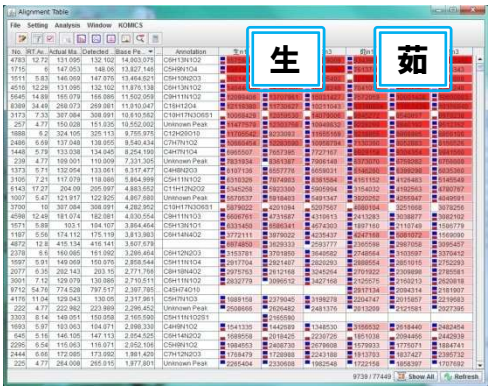
ランチョンセミナー LS-5
2012年3月23日（金）12:30 ～ 13:20
C27会場（京都女子大学、C校舎 3階 C305）

産業基盤研究開発部
部長 柴田 大輔

ゲノム生物学の一分野として始まったメタボロミクスの考え方は、単に生物学だけではなく、応用科学にも大きな影響を与え始めている。とりわけ、種種雑多な成分を一斉に解析する手法（メタボローム解析）は従来の分析化学の手法とは一線を画し、全体像のなかで細部を捉えることを可能にした。本講演では、様々な農芸化学分野でどのようにメタボローム解析が適用できるのかを紹介する。

～ かぼちゃを茹でると変化する成分の一斉解析 ～







従来法の1000倍の早さで
化学式を推定

機能性食品開発
新規食品開発
育種・栽培技術開発
発酵食品開発
医薬品開発
その他

多種多様な研究開発分野で応用が可能

技術の背景：ミリマスレベルでの超精密質量分析が可能になり、食品成分、血中成分、微生物成分、医薬品成分、農作物成分が「（化学式レベルで）まる裸で見えるよう」になりました。しかし、膨大なデータ量の前に立ち往生している研究開発者は多いでしょう。かずさDNA研究所では、生体成分（メタボローム）分析の最先端技術開発の一環として、通常は1ヶ月近くかかる解析を30分以内で実現するソフト（PowerSuite）を開発しました。

技術内容：液体クロマト-Orbitrap-質量分析装置から出力される生データから、１）内部基準補正を行い0.5ppm以下の精度で成分ピークを抽出し、２）全ピークに化学式を与え、３）化合物データベースとリンクし、４）MS/MS情報を付け、５）複数の試料間で互いに比較して表示する。

これにより、複雑なメーラード反応生成物、血中抱合体、焼肉中の発がん性成分の分析など、多彩な応用が可能となっています。

財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所 バイオ産業技術支援センター
E-mail: biosup-met@kazusa.or.jp　Tel: 0438-52-3919

LS 6　日本農芸化学会2012年度大会

キッコーマン株式会社　ランチョンセミナー

バランスは「おいしさ」に繋がるか？

2012年3月24日（土）　12:30-13:20

B18会場（B校舎 5F B514）

演題１

「メタボリックプロファイリングの食品・生薬研究への応用」

福崎　英一郎　先生

大阪大学大学院工学研究科　生命先端工学専攻　教授

食のグローバル化にともない、安心・安全が担保された日本産食品の海外需要は増加傾向にある。国や地域によって異なる嗜好に応えるためには、食品の二次機能を正確に表現する必要がある。我々はメタボロリックプロファイリングの手法を用いて食品中の代謝プロファイルと定量的記述試験（QDA法）による官能得点との相関を解析し、モデル化を行った。生薬評価への適用例も併せて紹介する。

演題２

「”おいしさ”の理解に繋がる抗体の利用について」

大倉　哲也　先生

独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構

食品総合研究所　食品機能研究領域　上席研究員

我々は、物質バランスと食品の構造変化の観点から「おいしさ」に迫ろうとしている。物質バランスは米の物理的な構造変化に伴う酵素の分布を抗体で見ていくことで、「おいしさ」の理解にバランスが大事であることと、食べ方で「おいしさ」が変化するのではないか、ということを話してみたい。

kikkoman

おいしい記憶をつくりたい。

メルクミリポア
ランチョンセミナーのご案内

タンパク質調製時の強い味方 NDSB



日本農芸化学会 2012 年度大会

日時：2012 年 3 月 24 日 (土) 12：30 ～ 13：20

場所：B19 会場（B 校舎 4F B420）プログラム No. LS - 7

演者：群馬大学工学研究科　若松 馨 教授

講演内容

「タンパク質調製時の強い味方 NDSB」

NDSB はタンパク質を安定化させ、凝集を防止する低分子化合物です。

NDSB 存在下で生体組織からタンパク質を抽出すると抽出効率が高まるだけでなく、凝集も効果的に防止するので、精製や濃縮過程でのロスが低減できます。また、立体構造決定においては結晶化を促進し、NMR スペクトルの質を向上させます。さらに、NDSB は小さく、ミセルを形成しないので、限外濾過などで容易に除去することもできます。

最近では透析膜や限外濾過膜へのタンパク質の非特異的な吸着を防止したり、抗体の活性を保持するなどの効果があることもわかってきました。

NDSB の使用法について、具体的なガイドラインとともに応用例について解説します。

メルク株式会社

メルクミリポア事業本部 バイオサイエンス事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒1-8-1 アルコタワー5F

製品の最新情報はこちら

メルク製品 www.merck4bio.jp

お問合せ▶ On-Line:www.merck-chemicals.jp/jpts Tel: 0120-189-390 Fax: 0120-189-350

ミリポア製品 www.millipore.com/nihon

お問合せ▶ On-Line:www.millipore.com/jpts Tel: 0120-633-358 Fax: 03-5434-4859

Merck Millipore is a division of MERCK

日本農芸化学会 2012 年度大会ランチョンセミナー：LS - 8

aminoindex
アミノ酸解析サービス

アミノ酸と生活習慣病

アミノ酸解析はどこまで疾病リスクを予想できるのか？

演者：味の素株式会社アミノインデックス部
安東 敏彦

血液中のアミノグラムは常に一定になるようにコントロールされていますが、多くの疾病では臓器の代謝が変化し、アミノグラムも影響を受けることが報告されています。実際、生理学的な状態と関連したアミノ酸濃度の具体的な異常は、肝不全、腎不全、癌、糖尿病、筋肉機能不全などを含めて、様々な病気で報告されています。このことから、逆に、ある疾病によって引き起こされるアミノグラムの変化から疾病の有無を知ることができるのではないかと考えられました。

しかし過去の研究では、特定の代謝異常等を除いて単一のアミノ酸濃度の動きから栄養状態や疾病の有無を判断することは難しいとされていました。そこで、複数のアミノ酸の組み合わせを統計的に解析する方法を開発し、アミノ酸濃度からなる指標を作成しました。この「アミノインデックス」と名付けた指標は、がんのリスクスクリーニング検査としてすでに実用化されており。近々に、生活習慣病などへも応用されようとしています。

本セミナーでは、なぜアミノ酸で健康状態が分かるのかという基本的な考え方と、がんや生活習慣病への応用の実際を紹介します。



日時：3 月 24 日 (土) / 12:30 - 13:20
場所：京都女子大学
会場：C01 会場（C 校舎 5F C501）

味の素株式会社

本ランチョンセミナーは整理券制です
定員：250 名

日本農芸化学会2012年度大会

ランチョンセミナーのご案内

2012年 3月 24日（土）12：30〜13：20
発表番号：LS-9
C10会場　（C校舎 5F C504）

演題 1　ロシュ４５４ GS FLXを利用した作物DNAマーカーの開発

田畑 哲之 先生
かずさDNA研究所
植物ゲノム研究部

第二世代シークエンサーの出現によって、ゲノムワイドなDNAマーカー開発が、従来と比較して著しく迅速安価に行うことが可能となった。われわれは、ロシュ４５４GS FLXと従来型シークエンサーによる塩基配列分析と情報解析技術を組み合わせて、トマト、イチゴをはじめとする多様な農作物を対象にSSRマーカーや SNPマーカーの開発を進めている。本セミナーでは、DNAマーカー開発の現状、手法、利点や問題点を概説する。

演題 2　ロシュ454 次世代シークエンサーを用いた生物学と農学分野の論文例

宋 碩林
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
ゲノムシークエンスLCM部

ロシュ４５４のゲノムシークエンス（GS）テクノロジーは、2005年の発売以来ゲノム研究をリードし続けています。スタンダードモデルのGS FLXに加え、世界初のパーソナルモデル、GSジュニアの登場で、次世代シークエンスはより身近な研究手法となりました。４５４GSの特長は他にない約500bpのロングリード、スピーディな実験が可能で、誰でも扱いが簡単なインフォマティクスツールです。その実用性は、幅広い分野でトップ専門誌に発表されている1500以上の論文実績からも明らかです。更にGS FLXはGS FLX+にアップグレードされ、現在約700-800bpの超ロングリードを達成しています。

ランチョンセミナーへのご参加には
整理券（無料）が必要です。

整理券発券デスク：京都女子大学B校舎2階
当日の8：30より　但し整理券がなくなり次第終了となります

お問い合わせ
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
AS事業部（研究用試薬・機器）
本社：〒105-0014　東京都港区芝２丁目６番１号
TEL.03-5443-5287　FAX.03-5443-7098
E-mail：tokyo.as-support@roche.com
ＵＲＬ：http://www.roche-biochem.jp

TaKaRa

日本農芸化学会2012年度大会
タカラバイオ株式会社　ランチョンセミナーLS10

新規遺伝子解析技術のご紹介

ー新PCR酵素を使った簡単クローニングおよび遺伝子解析術ー

日時：3月24日（土） 12:30 -13:20
会場：C24会場（C校舎　4階　C404）

座長：向井　博之（タカラバイオ株式会社　製品開発センター長）
演者：上森　隆司（タカラバイオ株式会社　製品開発センター）

タカラバイオでは、研究者の皆様の様々なニーズにお応えするべく
常に高品質な遺伝子工学用試薬の開発に努めてまいりました。本セミナーでは、

クルードサンプルや難反応性ターゲットに対する特異的増幅成功率が
飛躍的に向上した新規 PCR 酵素 「Tks Gflex™ DNA Polymerase」を中心に

「高性能 PCR 酵素（PrimeSTAR®シリーズ）」
「遺伝子解析の様々な場面、用途に応じて卓越した性能を発揮する
逆転写試薬（PrimeScript®シリーズ）」

など関連製品をご紹介しながら、これらを用いた新しいクローニング技術
（In-Fusion®テクノロジー）の実験例や応用例をご紹介します。

タカラバイオ株式会社
東日本販売課　TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282　タカラバイオウェブサイト http://www.takara-bio.co.jp/
西日本販売課　TEL 077-543-7297 FAX 077-543-7293　クロンテックウェブサイト http://clontech.takara-bio.co.jp/

発表日：3 月 24 日 (土) / 12:30 - 13:20
会　場：C26 会場（C 校舎 4F C412）

Eppendorf Luncheon Seminar

京都大学大学院農学研究科
応用生命科学専攻
小川　順　教授

もれなく
ピペット型
ボールペン
プレゼント！



ー微生物機能探索・虎の巻ー

有用脂肪酸・アミノ酸・核酸生産、酵素機能開発に見る「微生物の探・観・拓」

「微生物機能の探索と開発」という分野では「何ができるのか」が最重要であり、それを達成する手段としての微生物種には固執しないのが信条である。したがって、研究は目的にかなう微生物を探すことから始まる。時として、有るか無いかも定かでない段階から始まるその作業は、発見の確率を上げるべく創意工夫が展開される腕の見せ所であるが、地道なモチベーションを必要とする泥臭いものである。その正攻法はより多くを効率良く評価することにつきるが、それでも見つかるとは限らない。
しかし、転んでもタダでは起きない思いがあると、しぶとい観察の末に予期せぬ発見に出くわしたりするのが微生物機能探索の面白さである。苦労の末出会った微生物は愛着を持って磨き上げられ、その機能が開拓されてゆく。本セミナーでは、論文からだけでは見えてこない、そんな研究の経緯を振り返ってみたい。

eppendorf

エッペンドルフ株式会社 101-0031 東京都千代田区東神田 2-4-5
HP：www.eppendorf.com/jp E-mail: info@eppendorf.jp Tel: 03-5825-2361 Fax: 03-5825-2365

eppendorf is a registered trademark. All rights reserved, including graphics and images.

Wako

日本農芸化学会
2012年度大会
和光純薬工業株式会社

ランチョンセミナー LS12

マルチジーン トランスフェクション技術の新展開

■ 日時…3月24日(土)　12：30～13：20
■ 会場…C27会場（C校舎 3F C305）

演題 1
12：30～12：40

新製品Episomal型ベクター「pEBMulti」（動物細胞用）のご紹介

船越 拓
（和光純薬工業株式会社 試薬開発部）

演題 2
12：40～13：20

Episomal型ベクターを用いたマルチカラーイメージングの新展開

三輪 佳宏
（筑波大学大学院 人間総合科学研究科 講師）

これまで、複数の遺伝子を安定導入するためには、長期間にわたる薬剤選択とその後の発現確認が必要でした。また選別したクローンがたまたま片寄った性質を示すclonal heterogenicityの問題を回避するために、複数のクローンを用いて同じ実験を繰り返さなければならず、多くの時間と労力が必要とされてきました。そこでタンパク質同士の相関や、タンパク質複合体の解析などには、より簡便な複数遺伝子の安定導入法が求められています。

本セミナーでは、多様なベクターと蛍光タンパク質の特性を駆使し、ライブセルイメージングの研究を精力的に進めておられる、筑波大学 三輪佳宏 先生を講師としてお招きし、マルチジーントランスフェクション技術の応用とその可能性についてご紹介いただきます。

また、Epstein-Barr Virus由来のゲノム複製ユニットを用い、ヒト細胞においてプラスミド状態で娘細胞に分配される新規ベクター「pEBMulti」を開発いたしました。これにより、ゲノムDNAへの組込みなしに目的遺伝子の安定発現細胞を樹立することが可能になりましたのでご紹介いたします。

和光純薬工業株式会社
本　　社：〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
東京支店：〒103-0023 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号
営 業 所：北海道・東北・筑波・東海・中国・九州

問い合わせ先
フリーダイヤル：0120-052-099　フリーファックス：0120-052-806
URL：http://www.wako-chem.co.jp
E-mail：labchem-tec@wako-chem.co.jp

株式会社資生堂　ランチョンセミナー

食品やヒトに存在するD-アミノ酸とその機能性分子としての可能性

2012年3月25日（日）12:30～13:20
B18会場（B校舎 5F B514）

演題1

「D-アミノ酸研究の展開と展望：分布、機能、代謝、食品・医薬への応用へ」 吉村 徹 先生 名古屋大学大学院 生命農学研究科

D-アミノ酸は長らく、細菌に特異的に存在し細胞壁ペプチドグリカンの構成成分など、限られた機能しかもたないと考えられていた。しかし近年の分析技術の進展に伴い、哺乳動物を含む真核生物にも様々なD-アミノ酸が存在し、多彩な生理機能を有することが明らかとなって来た。例えば、D-セリンは哺乳動物脳内に存在し、記憶や学習などに関与するN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型受容体のコアゴニストとして機能する。これに関連して、脳脊椎液や血清中のD-セリン濃度が統合失調症を始めとする様々な神経疾患に関係するとの報告がなされている。また遊離型D-アスパラギン酸には、脳ホルモンの分泌制御や生殖機能との関連が示唆されている。哺乳動物を含む真核生物にはD-アミノ酸生成を触媒する各種アミノ酸ラセマーゼが存在するが、経口投与したD-アミノ酸が生理作用を示す例も報告されており、D-アミノ酸を臨床的にあるいは機能性食品等に応用しようとする研究も始まっている。本セミナーではD-アミノ酸の機能や食品等における分布、D-アミノ酸の代謝とその関連酵素について紹介する。

30分

演題2

「皮膚における遊離D-アミノ酸の発見と、明らかになりつつある新たな生理機能」 東條 洋介 株式会社資生堂

皮膚は天然保湿因子等としての目的で遊離アミノ酸を恒常的に産生することから遊離アミノ酸の多い組織として知られるが、これまでは全てがL体で構成されていると考えられてきた。そこで我々はD体とL体を切り分けた生体内アミノ酸一斉含量解析を可能とする二次元ミクロHPLC分析法を用い、皮膚中遊離D-アミノ酸含量を初めて解析した。本セミナーでは皮膚組織における遊離D-アミノ酸組成の違いや加齢による含量変化を分析方法を交えて述べると共に、真皮線維芽細胞に対してコラーゲン産生促進作用や抗酸化作用を有することがわかった遊離D-アスパラギン酸等、最近明らかになった遊離D-アミノ酸の皮膚機能への関与について紹介する。

15分

座長：岸本 治郎（株式会社資生堂）

SHISEIDO

インフルエンザ感染症　　その感染様態と免疫

大阪府立公衆衛生研究所　高橋和郎

インフルエンザはおもに患者の咳、くしゃみの中のウイルスを含んだ微小な粒子である飛沫（＞数μ）や飛沫核（＜数μ）を鼻腔や口腔から吸い込むことにより感染、発症する疾患である。ウイルスは局所における防御機構と戦いながら気道粘膜上皮細胞で増殖し、その増殖の程度に相関して炎症反応を惹起し、症状を発現させる。一般的症状は発熱、咽頭痛、咳であるが、下気道へ感染が進むと痰の分泌が亢進し、喘鳴を認め気管支炎に進行、さらに高齢者、小児では肺炎に進みやすい。また、小児では中耳炎や熱性けいれん、脳炎、脳症の合併症を伴うことがある。一般的に感染後インフルエンザ様疾患 38.5℃以上の発熱かつ咽頭痛あるいは咳）を呈する場合は約半数であり、30%がそれ以外の軽症であり、20%は不顕性感染で発症しない。発症するか否か、また、重症化への進展を規定する要因は多岐に及ぶ。これにはウイルス側と宿主側の要因に分けられる。ウイルス側には暴露されたウイルス量、毒力（臓器における増殖力、インターフェロン抵抗性など）などがあり、宿主側では自然免疫力、暴露されたウイルス株に対する過去の感染で獲得した免疫力（抗体価や細胞性免疫力）の程度が要因となる。

インフルエンザウイルスに対して未感染のヒトにおける感染後の免疫応答について考えてみる。ウイルスが気道粘膜上皮細胞に感染すると TLR3 を介してインターフェロンーα(IFN-α)が産生されウイルスに対して抑制的に作用する。また他の炎症性サイトカイン、特に IL-6 が気道に分泌される。マクロファージからは TNF-α が分泌され、これもウイルスに対して抑制的に作用する。ウイルスに感染している間に鼻腔、気道中に IgA 抗体が産生されウイルスの排除に関与する。特にウイルスの膜に位置するヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)に対する抗体はウイルスの感染性を抑制する中和抗体であり、気道中には特異 IgA 抗体が 3-5 か月間検出され、血中には特異 IgG 抗体が年余にわたり維持される。細胞性免疫も誘導され、細胞障害性 CD8 キラーT 細胞は気道内のウイルスの排除を促進する。CD4 ヘルパーT 細胞もマウスモデルでは抗体産生を促進させることによりウイルスの排除に関与する。

自然感染を受け獲得した免疫は再感染を防御するのであろうか？　インフルエンザの発症を防御するのに関与する重要な要因は抗体であると考えられている。ヒト血中の HA に対する抗体価は発症抵抗性や気道内のウイルス増殖抑制と相関する。HA に対する抗体価（HI 抗体価）が 40 の場合約半数の人がその同じウイルスに対して発症を免れ、320 の場合約９割の人が発症を免れる。Ａ型に自然初感染後発症し、血中 IgG 抗体は長く維持されるが、抗原性が類似する他のＡ型には再感染する。この理由には２点あり、第１点は血中 IgG 抗体価が１年以内に漸減すること、第２には、初感染で産生される HA に対する抗体の種類が少ないために再感染すると考えられる。数回自然感染を受けることにより多くの種類の HA 抗体を獲得し、より幅広い免疫を獲得し、発症を防御する。複数回自然感染を受けても再感染が起こる主要な原因はウイルス HA 抗原の変異である。ウイルスは毎年 HA 蛋白のアミノ酸２－３か所の変異を起こすので、場合により抗体の反応性が１/８以下に低下するウイルスが出現し流行を引き起こす。

インフルエンザは気道の局所感染であるので、感染初期に最も有効な防御要因は気道に産生される IgA 抗体である。しかし IgA 抗体は初感染後３－５か月で消失する。国外で認可されている経鼻弱毒生ワクチンは自然感染と同様に鼻腔内、血中に特異 IgA を、血中に特異 IgG を誘導する。IgA 抗体は HA の抗原性がある程度変化しても中和活性を保持するので(heterotypic)、健常成人ではシーズン前に接種すると有効率は高い。しかし、５歳以下の小児には症状が出る副反応が出現する頻度が高いので適応は認められていない。現行の皮下接種ワクチンは血中には特異 IgG 抗体を誘導するが、気道には IgA 抗体を誘導しないので、発症を防御する有効性はやや劣る。

インフルエンザの防御のためにはワクチン接種を適度に受け、自然感染を数度受けて強い免疫を獲得し、その後はウイルスの抗原変異に応じて感染を受け（ブースター)、高い抗体価を維持して高齢期に備えるのが賢明な対処法である。

プロテクト乳酸菌と免疫機能

サントリーウエルネス株式会社　健康科学研究所　井田　正幸

乳酸菌は環境変化に適応してその形態、細胞外多糖組成、脂肪酸組成などを変化させることがいくつか報告されている。我々は乳酸菌を高温培養することにより、細胞壁が厚くなる現象を観察した。この壁の厚みは乳酸菌の種によって様々であるが、いくつかの乳酸菌種を検討した結果、そのほとんどが高温培養によって細胞壁を厚くすることが明らかとなった。

乳酸菌の免疫調節作用はよく知られているが、環境変化（塩濃度、pH）によってその作用が変化することがいくつか報告されている。高温培養という環境変化を負荷した我々の場合でも、抗原提示細胞からの IL-12 誘導作用が変化すること、そしてその作用は細胞壁の厚みに相関することが示唆された。これらのデータは乳酸菌の生育環境が免疫調節作用に影響を及ぼすことを示唆している。

Lactobacillus pentosus　S-PT84 株は厚い細胞壁を持っており、常温付近において約 60nm、37℃培養では平均値として 80nm を超えることが示されている。S-PT84 株だけでなく、60nm を超える細胞壁厚みを持つ乳酸菌はいくつも存在しており、かつ IL-12 誘導作用が高いことから、細胞壁の厚みは Th1 サイトカイン誘導に重要ではないかと考えられる。我々は細胞壁の厚い乳酸菌群を“プロテクト乳酸菌”と呼称し、免疫機能に対する効果を継続して検証している。本セミナーでは、プロテクト乳酸菌の機能について、いくつかデータを紹介したい。

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製（コピー）及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。
Copyright © 2012 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

日 本 農 芸 化 学 会　2012 年 度 大 会 講 演 要 旨 集　（オンライン）
Proceedings (online) of the Annual Meeting 2012 Kyoto of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
2012 年 3 月 5 日公開　　Published online 5 March 2012　　ISSN 2186-7976

発行者　　公益社団法人日本農芸化学会　　JSBBA　　http://www.jsbba.or.jp/
PUBLISHER　113-0032 東京都文京区弥生 2-4-16 学会センタービル 2 階　　Phone 03-3811-8789

データ作成者 株式会社ダイナコム　　DYNACOM　　http://www.dynacom.co.jp/
ASSISTS　　261-7125 千葉県千葉市美浜区中瀬 2-6-1WBG マリブイースト 25 階　　Phone 043-213-8131
小宮山印刷工業株式会社　　COMOIYAMA PRINTING　　http://www.kopas.co.jp/
162-0808 東京都新宿区天神町 78　　Phone 03-3368-3023